

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Produção de glicose-6-fosfato desidrogenase de
Saccharomyces cerevisiae geneticamente modificada através de
processo descontínuo alimentado

Ângelo Samir Melim Miguel

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

São Paulo
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia de Fermentações

Produção de glicose-6-fosfato desidrogenase de
Saccharomyces cerevisiae geneticamente modificada através de
processo descontínuo alimentado

Ângelo Samir Melim Miguel

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior

São Paulo
2006

Todo caminho trilhado com sacrifício e esperança conduz à vitória.
E esta vitória dedico aos meus pais, Ângelo e Lúcia, pelo amor, carinho e dedicação,
e que me ensinaram a construir, na simplicidade, o meu sonho; ao meu irmão Saulo,
pela mão estendida e pelo ânimo que me passava nos momentos difíceis.
A vocês, o meu eterno obrigado!

Ângelo Samir Melim Miguel

Produção de glicose-6-fosfato desidrogenase de
Saccharomyces cerevisiae geneticamente modificada através de
processo descontínuo alimentado

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
orientador/presidente

Prof^a Dr^a. Thereza Christina Vessoni Penna
1^o. examinador

Prof. Dr. João Carlos Monteiro de Carvalho
2^o. examinador

Prof^a. Dr^a. Inês Conceição Roberto
3^o. examinador

Prof^a. Dr^a. Marília Amorim Berbert de Molina
4^o. examinador

São Paulo, 12 de maio de 2006.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, gostaria de agradecer ao Prof. Adalberto Pessoa Junior pela orientação, pelo constante estímulo e confiança depositada em mim, e pela amizade que surgiu ao longo deste trabalho.

Agradeço imensamente ao Prof. Tit. Michele Vitolo e Prof. João Carlos Monteiro de Carvalho pela atenção e disponibilidade dispensada, pois muito contribuíram muito para o desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a Profa. Tit. Thereza Christina Vessoni Penna e ao Prof. José Abrahão Neto pela amizade e por todos os ensinamentos transmitidos.

A todos os colegas do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da FCF/USP, que me proporcionaram uma agradável convivência ao longo destes anos, meus sinceros agradecimentos. Em Especial, agradeço a Carlota, Eliane, Dante, André, Pérola, Luiz Carlos, Éster, Marina e Vanderson pelas proveitosas discussões, sugestões e, sobretudo, pelo estímulo e carinho sempre demonstrados.

Não poderia deixar de agradecer aos funcionários das secretarias do departamento e da FCF – Juarez, Miriam, Elza, Jorge, Elaine e Benê – que sempre me atenderam da melhor forma possível. Agradeço também a todos os funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas da USP pela gentileza e atenção constantes.

Agradeço a FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – pela bolsa de Doutorado Direto.

De forma particular, agradeço a todos os meus familiares e amigos, em especial meus pais e irmãos, que sempre me apoiaram e incentivaram a seguir com fé o caminho que escolhi. Sem a força transmitida por estas pessoas, não seria possível a realização deste trabalho.

Finalmente, agradeço a Deus pela presença constante em minha vida.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	v
NOMENCLATURA E ABREVIACÕES.....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1.1. Utilização de leveduras em processos biotecnológicos.....	4
1.1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
1.1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-181.....	8
1.2. Processos fermentativos.....	9
1.2.1. Fatores que influenciam no cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10
1.2.2. Fontes de carbono e nitrogênio.....	11
1.2.3. Processo fermentativo descontínuo alimentado.....	14
1.3. Enzimas.....	16
1.3.1. A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase.....	18
1.3.2. Aplicações da glicose-6-fosfato desidrogenase.....	20
CAPÍTULO II – PREPARO DO INÓCULO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-181 PARA PRODUÇÃO DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH)	
2.1. Resumo.....	22
2.2. Introdução.....	23
2.3. Materiais e métodos.....	24
2.3.1. Materiais	24

2.3.2. Preparo da suspensão de leveduras congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.	24
2.3.3. Preparo do inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-181.....	25
2.3.3.1. 1ª. Condição de preparo do inóculo.....	25
2.3.3.2. 2ª. Condição de preparo do inóculo.....	25
2.3.3.3. 3ª. Condição de preparo do inóculo.....	26
2.3.4. Métodos analíticos.....	26
2.3.5. Parâmetros de cultivo.....	26
2.4. Resultados e discussão.....	27
2.5. Conclusão.....	32
2.6. Agradecimentos.....	32

CAPÍTULO III – INFLUÊNCIA DA CONSTANTE DE TEMPO (K) NA SÍNTESE DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH) POR PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO USANDO *Saccharomyces cerevisiae* RECOMBINANTE

3.1. Resumo.....	34
3.2. Introdução.....	35
3.3. Materiais e métodos.....	36
3.3.1. Materiais	36
3.3.2. Microrganismo e preparo do inoculo.....	37
3.3.3. Processo descontínuo alimentado.....	37
3.3.4. Rompimento celular.....	38
3.3.5. Métodos analíticos.....	38
3.3.6. Parâmetros de cultivo.....	38
3.4. Resultados e discussão.....	39
3.5. Conclusão.....	44
3.6. Agradecimentos.....	45

CAPÍTULO IV – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE MICRONUTRIENTES NO MEIO DE CULTIVO DE *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 PARA PRODUÇÃO DE GLICOSE-6-FOSFATO

DESIDROGENASE

4.1. Resumo.....	47
4.2. Introdução.....	48
4.3. Materiais e métodos.....	50
4.3.1. Materiais	50
4.3.2. Microrganismo e preparo do inóculo.....	50
4.3.3. Cultivos em agitador rotativo.....	51
4.3.4. Planejamento experimental e análise estatística.....	52
4.3.5. Rompimento celular.....	52
4.3.6. Métodos analíticos.....	52
4.3.7. Parâmetros de cultivo.....	53
4.4. Resultados e discussão.....	53
4.5. Conclusão.....	61
4.6. Agradecimentos.....	62

CAPÍTULO V – INFLUÊNCIA DA VAZÃO DE ALIMENTAÇÃO EXPONENCIALMENTE CRESCENTE E DECRESCENTE NA SÍNTESE DA ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH) DE *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 EM PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO

5.1. Resumo.....	64
5.2. Introdução.....	65
5.3. Materiais e métodos.....	66
5.3.1. Materiais.	66
5.3.2. Microrganismo e preparo do inóculo.....	67
5.3.3. Processo descontínuo alimentado.....	67
5.3.4. Rompimento celular.....	68
5.3.5. Métodos analíticos.....	68
5.3.6. Parâmetros de cultivo.....	69
5.4. Resultados e discussão.....	69
5.5. Conclusão.....	77

5.6. Agradecimentos.....	77
--------------------------	----

CAPÍTULO VI – INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE GLICOSE E DO TEMPO DE ALIMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Saccharomyces cerevisiae* RECOMBINANTE CULTIVADA POR PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO

6.1. Resumo.....	79
6.2. Introdução.....	80
6.3. Materiais e métodos.....	81
6.3.1. Materiais	81
6.3.2. Microrganismo e preparo do inóculo.....	81
6.3.3. Processo descontínuo alimentado;;;;.....	82
6.3.4. Rompimento celular.....	83
6.3.5. Métodos analíticos.....	83
6.3.6. Parâmetros de cultivo.....	83
6.4. Resultados e discussão.....	84
6.5. Conclusão.....	97
6.6. Agradecimentos.....	97

CAPÍTULO VII – INFLUÊNCIA DO AMINOÁCIDO LEUCINA NA PRODUÇÃO DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE POR *Saccharomyces cerevisiae* W303-181

7.1. Resumo.....	99
7.2. Introdução.....	100
7.3. Materiais e métodos.....	101
7.3.1. Materiais	101
7.3.2. Microrganismo e preparo do inoculo.....	102
7.3.3. Cultivos em agitador rotativo.....	102
7.3.4. Rompimento celular.....	103
7.3.5. Métodos analíticos.....	104

7.3.6. Parâmetros de cultivo.....	104
7.4. Resultados e discussão.....	105
7.5. Conclusão.....	110
7.6. Agradecimentos.....	110
CONCLUSÕES.....	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	113
APÊNDICE 1 – Determinação da equação da vazão de alimentação exponencialmente crescente.....	125
APÊNDICE 2 – Determinação da equação da vazão de alimentação exponencialmente decrescente.....	128
APÊNDICE 3 – Determinação da concentração celular por massa seca.....	1131
APÊNDICE 4 – Determinação da concentração celular por densidade ótica a 600 nm.....	132
APÊNDICE 5 – Rompimento celular em vórtice.....	133
APÊNDICE 6 – Determinação da atividade enzimática de G6PDH....	134
APÊNDICE 7 – Dosagem de proteínas pelo método de Lowry.....	135
APÊNDICE 8 – Determinação do valor do k_{La}	137
APÊNDICE 9 – Determinação da concentração de açúcares reduzidos totais pelo método de Somogyi.....	138

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1	Estrutura da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) de <i>Leuconostoc mesenteroides</i> (dímero). O substrato G6P e a coenzima NADP ⁺ aparecem ligados a seus sítios específicos (VOUGHT <i>et al.</i> , 2000).	19
FIGURA 2.1	Concentração celular (X) em função do tempo de cultivo da etapa de inóculo para a primeira (-●-), segunda (-■-) e terceira (-▲-) condições de preparo do inóculo.	30
FIGURA 2.2	Logaritmo neperiano da concentração celular (Ln X) em função do tempo de cultivo da etapa de inóculo, onde verifica-se o período de fase de crescimento exponencial (-) para a primeira (●) ($R^2=0,9909$), segunda (■) ($R^2=0,9753$) e terceira (▲) ($R^2=0,9830$) condições de preparo do inóculo.	31
FIGURA 3.1	Volume de solução de glicose (15 g/L) adicionada à dorna em função do tempo de cultivo para os diferentes valores de K, K (h^{-1}) = 0,2 (-◆-), K = 0,3 (-△-), K = 0,5 (-■-), K = 0,7 (-○-) e K = 0,8 (-□-). O volume de glicose adicionada foi calculado pela a equação 3.1.	40
FIGURA 3.2	Massa celular (M_X) em função do tempo de cultivo para os diferentes valores da constante de tempo K (h^{-1}) = 0,2 (-◆-), K = 0,3 (-△-), K = 0,5 (-■-), K = 0,7 (-○-) e K = 0,8 (-□-).	43
FIGURA 3.3	Massa de glicose (M_S) em função do tempo de cultivo para os diferentes valores da constante de tempo K (h^{-1}) = 0,2 (-◆-), K = 0,3 (-△-), K = 0,5 (-■-), K = 0,7 (-○-) e K = 0,8 (-□-).	43
FIGURA 3.4	Atividade de G6PDH em função do tempo de cultivo para os diferentes valores da constante de tempo K (h^{-1}) = 0,2 (-◆-), K = 0,3 (-△-), K = 0,5 (-■-), K = 0,7 (-○-) e K = 0,8 (-□-).	44
FIGURA 4.1	Curva de nível da atividade específica de G6PDH ($G6PDH/g_{prot}$) em função dos valores codificados de concentração de adenina (X_1) e uracila (X_4).	58
FIGURA 4.2	Curva de nível da atividade específica de G6PDH ($G6PDH/g_{prot}$) em função dos valores codificados de concentração de triptofano (X_2) e histidina (X_3).	59
FIGURA 4.3	Concentração celular (X) (-●-), concentração de glicose (S) (-■-) e atividade de G6PDH por litro de meio cultivado (G6PDH) (-◆-) em função do tempo. Cultivo conduzido em	60

agitador rotativo com a *S.cerevisiae* W303-181 para a produção de G6PDH usando um meio de cultivo otimizado, composto por glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina 68 mg/L, histidina 66 mg/L, uracila 47 mg/L e triptofano 80 mg/L.

- FIGURA 4.4** Velocidade específica de crescimento celular (μ_X) (—) e velocidade específica de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) (--) em função do tempo. Cultivo conduzido em agitador rotativo com a *S.cerevisiae* W303-181 para a produção de G6PDH usando um meio de cultivo otimizado, composto por glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina 68 mg/L, histidina 66 mg/L, uracila 47 mg/L e triptofano 80 mg/L. 61
- FIGURA 5.1** Volume de solução de glicose (10 g/L) adicionada à dorna em função do tempo de cultivo para os diferentes valores de K , na vazão de alimentação exponencialmente crescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-O-), e na vazão de alimentação exponencialmente decrescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-□-), K = 0,5 (-△-) e K = 0,8 (-◇-). O cultivo em regime descontínuo alimentado foi conduzido com *S. cerevisiae* W303-181 e a de adição de glicose (substrato) foi calculada de acordo com a equação 1 para a vazão de alimentação exponencialmente crescente e equação 2 para a vazão de alimentação exponencialmente decrescente. 70
- FIGURA 5.2** Concentração celular (X) em função do tempo de cultivo para os diferentes valores de K , na vazão de alimentação exponencialmente crescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-O-), e na vazão de alimentação exponencialmente decrescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-□-), K = 0,5 (-△-) e K = 0,8 (-◇-). 71
- FIGURA 5.3** Concentração de glicose (S) em função do tempo de cultivo para os diferentes valores de K , na vazão de alimentação exponencialmente crescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-O-), e na vazão de alimentação exponencialmente decrescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-□-), K = 0,5 (-△-) e K = 0,8 (-◇-). 74
- FIGURA 5.4** Atividade de G6PDH por litro de meio cultivado (G6PDH) em função do tempo de cultivo para os diferentes valores de K , na vazão de alimentação exponencialmente crescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-O-), e na vazão de alimentação exponencialmente decrescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-□-), K = 0,5 (-△-) e K = 0,8 (-◇-). 74

FIGURA 5.5	Velocidade específica de crescimento celular (-) e velocidade específica de produção de G6PDH (--) em função do tempo de cultivo de <i>S. cerevisiae</i> W303-181 em regime descontínuo alimentado nas vazões de alimentação. A: vazão exponencialmente crescente $K=0,2 \text{ h}^{-1}$; B: vazão de alimentação exponencialmente decrescente, $K = 0,2 \text{ h}^{-1}$; C: vazão de alimentação exponencialmente decrescente, $K = 0,5 \text{ h}^{-1}$ e D: vazão de alimentação exponencialmente decrescente, $K = 0,8 \text{ h}^{-1}$.	76
FIGURA 6.1	Volume da solução de glicose a 80 g/L adicionada em função do tempo para os cultivos alimentados durante 5 h (-) e 11 h (--).	85
FIGURA 6.2	Período de alimentação (\leftrightarrow), concentração celular (X) (-●-), concentração de glicose (S) (-■-), atividade de G6PDH (-◆-), velocidade específica de crescimento celular (μ_X) (-) e de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) (--) em função do tempo para os cultivos em regime descontínuo alimentado. 6.2A e 6.2B: referente ao cultivo C1 (alimentação nas primeiras 5 h com glicose 80 g/L).	86
FIGURA 6.3	Período de alimentação (\leftrightarrow), concentração celular (X) (-●-), concentração de glicose (S) (-■-), atividade de G6PDH (-◆-), velocidade específica de crescimento celular (μ_X) (-) e de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) (--) em função do tempo para os cultivos em regime descontínuo alimentado. 6.3A e 6.3B: referente ao cultivo C2 (alimentação nas primeiras 11 h com glicose 80 g/L).	89
FIGURA 6.4	Volume da solução de glicose a 80 g/L adicionada em função do tempo para os cultivos alimentados durante 3 h (-) e 5 h (--).	90
FIGURA 6.5	Período de alimentação (\leftrightarrow), concentração celular (X) (-●-), concentração de glicose (S) (-■-), atividade de G6PDH (-◆-), velocidade específica de crescimento celular (μ_X) (-) e de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) (--) em função do tempo para os cultivos em regime descontínuo alimentado. 6.5A e 6.5B: referente ao cultivo C3 (início com 10 g/L de glicose e alimentação com glicose a 50 g/L durante 3 h).	91
FIGURA 6.6	Período de alimentação (\leftrightarrow), concentração celular (X) (-●-), concentração de glicose (S) (-■-), atividade de G6PDH (-◆-), velocidade específica de crescimento celular (μ_X) (-) e de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) (--) em função do tempo para os cultivos em regime descontínuo alimentado. 6.6A e 6.6B: referente ao cultivo C4 (início com 10 g/L de glicose e alimentação com glicose a 50 g/L durante 5 h).	92

- FIGURA 6.7** Volume da solução de glicose a 80 g/L adicionada em função do tempo para os cultivos alimentados durante 5 h. 94
- FIGURA 6.8** Período de alimentação (\leftrightarrow), concentração celular (X) (-●-), concentração de glicose (S) (-■-), atividade de G6PDH (-◆-), velocidade específica de crescimento celular (μ_X) (-) e de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) (-) em função do tempo para os cultivos em regime descontínuo alimentado. 6.8A e 6.8B: referente ao cultivo C5 (início com 5 g/L de glicose e alimentação com glicose a 65 g/L durante 5 h). 96
- FIGURA 7.1** A: Concentração celular (X); B: Teor de açúcares redutores totais (ART) e C: Atividade de G6PDH (G6PDH) em função do tempo de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em agitador rotativo a 100 rpm e 30 °C por 24 h. (-○-) Cultivo C1 (meio de cultivo G+YNB); (-□-) Cultivo C2 (meio de cultivo G+YNB+ leucina 80 mg/L); (-◇-) Cultivo C3 (meio de cultivo G+YNB+ leucina 160 mg/L); (-△-) Cultivo C4 (meio de cultivo G+YNB+ leucina 240 mg/L) e (-×-) Cultivo C5 (meio de cultivo ME+EL). 108
- FIGURA 7.2** Velocidade específica de crescimento celular (-) e de produção de G6PDH (-), em função do tempo de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em agitador rotativo a 100 rpm e 30 °C por 24 h. A: Cultivo C1 (meio de cultivo G+YNB); B: Cultivo C2 (meio de cultivo G+YNB+ leucina 80 mg/L); C: Cultivo C3 (meio de cultivo G+YNB+ leucina 160 mg/L); D: Cultivo C4 (meio de cultivo G+YNB+ leucina 240 mg/L) e E: Cultivo C5 (meio de cultivo ME+EL). 109

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1	Algumas espécies de leveduras que apresentam interesse biotecnológico.	6
TABELA 2.1	Tempo de duração das seguintes etapas: ativação celular (Ativ.), pré-inóculo (P-inóc.), inóculo (Inóc.) e tempo total de preparo do inóculo (t_T) no primeiro, segundo e terceiro métodos de preparo do inóculo (1 ^o M, 2 ^o M e 3 ^o M).	28
TABELA 2.2	Parâmetros de cultivo do inóculo de <i>S. cerevisiae</i> W303-181.	28
TABELA 3.1	Parâmetros relacionados ao processo descontínuo-alimentado conduzido com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-181.	42
TABELA 4.1	Planejamento experimental, experimentos de confirmação e resultados dos cultivos conduzidos com <i>S. cerevisiae</i> W303-181 para a produção de glicose-6-fosfato desidrogenase.	55
TABELA 5.1	Parâmetros relacionados ao processo descontínuo alimentado, nas vazões de alimentação exponencialmente crescente e decrescente, conduzidos com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-181.	72
TABELA 6.1	Parâmetros de cultivo dos cultivos de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-181 em biorreator descontínuo alimentado para a produção de glicose-6-fosfato desidrogenase, sob diferentes concentrações iniciais de glicose e diferentes tempos de alimentação.	87
TABELA 7.1	Tipo de meio e teor de leucina para cada cultivo.	103
TABELA 7.2	Parâmetros de cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303-181 para a produção de glicose-6-fosfato desidrogenase.	107

NOMENCLATURA E ABREVIACOES

dX/dt	velocidade de crescimento celular (g/L.h)
dS/dt	velocidade de consumo de substrato (g/L.h)
dU/dt	velocidade de formação de produto, HK e/ou G6PDH (U/L _{meio} .h)
Da	Dalton, 1 Da corresponde a massa molar de 1 átomo de hidrogênio
EDTA	cido etilenodiaminotetraacético
G6PDH	enzima glicose 6-fosfato desidrogenase
k_{La}	coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (h^{-1})
NAD ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP ⁺	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NADPH	nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
PMSF	phenylmethylsulfonyl fluoride
Pr_{enz}	produtividade em G6PDH (U/L.h)
$Pr_{enz,fa}$	produtividade em G6PDH ao final da alimentação (U/L.h)
Pr_X	produtividade em células (g/L.h)
$Pr_{X,fa}$	produtividade em células ao final da alimentação (g/L.h)
rpm	revolução por minuto
r^2	coeficiente de determinação referente à regressão linear
S	concentração de substrato (g/L)
ΔS	variação da concentração de substrato (g/L)
S_i e S_f	concentração inicial e final de substrato (g/L)
tg	tempo de geração (h)
vvm	volume de ar por volume de meio por minuto
X	concentração celular (g/L)
ΔX	variação da concentração celular (g/L)
X_i e X_f	concentração inicial e final de células (g/L)
$Y_{P/S}$	fator de conversão de substrato em G6PDH (U/g)
$Y_{X/S}$	fator de conversão de substrato em células (g/g)
μ_X	velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
$\mu_{Xmx}$	velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})
μ_{G6PDH}	velocidade específica de formação de G6PDH (U/gh)
$\mu_{G6PDHmax}$	velocidade específica máxima de formação de G6PDH (U/gh)
M_X	massa celular (g)
M_{xi} e M_{xf}	massa celular inicial e final (g)
u	atividade de G6PDH (U)

u_i e u_f	atividade de G6PDH inicial e final (U)
M_S	massa de substrato (g)
M_{Si} e M_{Sf}	massa inicial e final de substrato (g)
%Viabilidade.	porcentagem de viabilidade celular (%)
Prot.....	concentração de proteínas (g/L)
Prot _{prod}	proteínas produzidas (g)
Δ Prot.....	variação da concentração de proteína (g/L)
Prot _i e Prot _f	Concentração de proteínas inicial e final (g/L)
PGK1.....	promotor de fosfogliceratoquinase 1
MSR.....	metodologia de superfície de resposta
p.....	nível de significância descritivo
i.....	representa a variável independente
a.	intercepto
b _i	coeficientes lineares
c _i	coeficientes quadráticos
d _{if}	Interações entre coeficientes
X_1	valor codificado da concentração de adenina
X_2	valor codificado da concentração de triptofano
X_3	valor codificado da concentração de histidina
X_4	valor codificado da concentração de uracila
K.....	constante de tempo (h^{-1})
X_{prod}	células produzidas (g/L)
G6PDH _{prod}	enzimas produzidas (U/L)

RESUMO

Este trabalho tem como finalidade estudar e estabelecer alguns parâmetros no processo fermentativo descontínuo alimentado de uma levedura recombinante *Saccharomyces cerevisiae* W303-181, visando aumentar a obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH). Foram feitas a padronização e otimização do preparo de inóculo de *S. cerevisiae* recombinante. Foram três as condições estudadas. Reduziu-se o tempo de preparo do inóculo de 114 h, da primeira condição, para 64 e 48 h para a segunda e terceira condições, respectivamente. Essas duas últimas condições mostraram-se adequados para dar continuidade com os processos fermentativos. Foi feito um estudo de otimização da concentração de micronutrientes (adenina, histidina, triptofano e uracila) no meio de cultivo usando a metodologia de superfície de resposta. Concluiu-se que, ao empregar o meio de cultivo cujas concentrações dos micronutrientes tenham sido otimizadas, a atividade específica de G6PDH atingiu 7927 U/L, 3,2 vezes maior que para o meio controle. Estudou-se a influência da constante de tempo (K), na síntese de G6PDH em processo descontínuo alimentado com vazão de alimentação exponencialmente crescente e decrescente, utilizando meio de cultivo otimizado e não otimizado. Os valores estudados de K para vazão de alimentação exponencialmente crescente foram 0,2, 0,3, 0,5, 0,7 e 0,8 h⁻¹ e, para a decrescente, foram 0,2, 0,5 e 0,8 h⁻¹. Dentre os cultivos com vazão exponencialmente crescente e com meio de cultivo não otimizado, encontrou-se para K=0,2 h⁻¹ uma atividade enzimática (558 U/L) 4,1 vezes maior que para a levedura selvagem. Dentre os cultivos nas vazões exponencialmente crescente e decrescente, encontrou-se para a vazão crescente e K=0,2 h⁻¹ os maiores níveis de produção de G6PDH (847 U/L). Foram estudados a influência da concentração inicial de glicose e o tempo de alimentação do processo descontínuo alimentado com vazão de alimentação exponencialmente crescente e K=0,2h⁻¹. Verificou-se que a concentração inicial de glicose não favoreceu a formação de biomassa ou a produção de enzimas. Contudo, determina e as máximas velocidades específicas de crescimento celular e de produção de G6PDH, com as maiores velocidades correspondendo às menores concentrações iniciais. Por fim, foi estudada a influência da concentração de leucina na síntese da G6PDH e verificou-se que teores de leucina entre 0-240 mg/L não influenciaram o crescimento celular ou a produção de enzima nos cultivos estudados.

ABSTRACT

The purpose of this work is to study and to establish some parameters in the fed-batch process of a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*, aiming to increase the production of the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH). The recombinant *S. cerevisiae* inoculum preparation was standardized and optimized. Three methods were studied. The inoculum preparation time was reduced to 114 h, from the first method, to 64 and 48 h for the second and third methods, respectively. These two last methods were adequate in order to proceed with the fermentation process. It was evaluated the best micronutrients (adenine, histidine, tryptophan and uracil) concentration in the cultivation medium to produce G6PDH, using a response surface methodology. We concluded that using cultivation medium with optimized micronutrients concentration, the G6PDH activity reached 7927 U/L, 3.2 fold higher than the not optimized medium. The influence of the time constant (K) on the G6PDH synthesis was studied at fed-batch bioreactor under exponentially increasing and decreasing feeding rates, using optimized medium cultivation and not optimized medium. The values for K at increasing rates were 0.2, 0.3, 0.5, 0.7 and 0.8 h⁻¹, and for decreasing rates were 0.2, 0.5 and 0.8 h⁻¹. Among K values for exponentially increasing rates with not optimized cultivation medium, K=0.2 h⁻¹ shows higher G6PDH production (558 U/L), 4.1 fold higher than wild yeast. Among cultivations proceeded with exponentially increasing and decreasing feeding rates and using an optimized medium, increasing rate and k=0.2 h⁻¹ shows the higher G6PDH production (847 U/L) too. The initial glucose concentration and feeding time was studied at fed-batch bioreactor under exponentially increasing feeding rate with K=0.2 h⁻¹. It was verified that initial glucose concentration does not favor mass or G6PDH production. Although, it determines the maximum G6PDH production and the maximum growth rates, with higher rates at lowest initial glucose concentration. At the end, the influence of leucine on G6PDH production was evaluated. It was verified that concentrations values between 0-240 mg/L did not show influence on cell growth or G6PDH production, at the studied cultivations.

INTRODUÇÃO

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (EC1.1.1.49) é a primeira enzima do processo oxidativo da via das pentose-fosfato, sendo encontrada em células animais, vegetais e microorganismos, podendo se destacar a levedura *S. cerevisiae*.

Essa enzima pode ser utilizada em *kits* para medidas de teores de glicose, frutose, manose, ATP (BOROSS *et al.*, 1987; AGUERO, 1998) e de atividade enzimática de hexoquinase e creatino-quinase (ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1997). Pode, também, ser utilizada para a determinação de glicose em sistema de reator em fluxo contínuo (MORI *et al.*, 1999; FREY *et al.*, 1999). Ainda, em biossensores, pode ser usada para monitorar rapidamente a concentração sérica de glicose-6-fosfato (BASSI *et al.*, 1999). A comercialização da G6PDH já existe há vários anos, pois esta enzima apresenta uma série de características viáveis à sua aplicação. No entanto, o desenvolvimento de tecnologia nacional para sua produção é de grande interesse, uma vez que toda enzima consumida no país é importada.

Contribuindo para o desenvolvimento de processos fermentativos para a produção de enzimas, o presente trabalho tem por objetivo dar continuidade à linha de pesquisa do Laboratório de Enzimologia Industrial do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Universidade de São Paulo. Esse laboratório já vem desenvolvendo, nos últimos anos, processos fermentativos para a obtenção da G6PDH a partir do cultivo, em biorreatores, de *S. cerevisiae* isolada de fermento comercial de padaria (ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1996; 1997; SILVA *et al.*, 2001). Esses estudos proporcionaram um ganho de produtividade através da verificação da influência de variáveis importantes como pH, temperatura, K_La (constante volumétrica de transferência de oxigênio), fontes de carbono e nitrogênio (ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1996; SILVA, 2000; SILVA *et al.*, 2001).

Ganhos de eficiência mais significativos poderiam ser obtidos através da modificação genética da levedura. Em função disso, a Prof^a Dra Carla Columbano de Oliveira, do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da USP, desenvolveu, com sucesso, uma cepa de *S. cerevisiae* geneticamente modificada superprodutora de G6PDH. Essa nova cepa, a *S. cerevisiae* W303-181, carrega um plasmídeo contendo uma seqüência que codifica a síntese de G6PDH sob regulação do promotor PGK1 (fosfogliceratoquinase 1) (LOJUDICE *et al.*, 2001).

Em estudos recentes com a *S. cerevisiae* W303-181, LOJUDICE *et al.* (2001) concluíram que os custos de produção de G6PDH poderiam ser significativamente reduzidos, uma vez que níveis de G6PDH 14 vezes maiores que a cepa disponível comercialmente puderam ser produzidas. ROSSI (2002) estabeleceu alguns parâmetros de cultivo em agitador rotativo, aumentando a produtividade da enzima em 21 vezes em relação à levedura selvagem. NEVES (2003) estudou o pH, a relação carbono/nitrogênio, a agitação, a aeração e as formas de condução do processo em biorreator de bancada. DANESI *et al.* (2005) estudaram a relação carbono/nitrogênio (C/N) empregando melaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Esses autores verificaram que os maiores níveis de produção de G6PDH foram encontrados para relação C/N 10. Além disso, verificaram que a produtividade em G6PDH era 3,7 vezes maior para esses substratos do que para glicose como fonte de carbono e YNB (*yeast nitrogen base*) como fonte de nitrogênio.

Contudo, a determinação de condições operacionais ótimas para processos fermentativos usando microrganismos recombinantes é muito complexa, devido à complexidade adicional no processo de segregação ou da instabilidade estrutural do plasmídeo (SHENE *et al.*, 2000).

Processos fermentativos em regime descontínuo alimentado, conduzidos em reatores de tanque agitado, são freqüentemente utilizados pela indústria (SCHINELLE *et al.*, 1996; FURLAN *et al.*, 2001). Desta forma, o presente trabalho tem como finalidade estudar a produção de G6PDH, em regime descontínuo alimentado, usando a *S. cerevisiae* W303-181. Através de cultivos em biorreator de bancada, serão avaliadas diferentes vazões e formas de alimentação do biorreator, buscando aumentar a produção da enzima.

OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é produzir a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) por processo fermentativo descontínuo alimentado utilizando a levedura *S.cerevisiae* W303-181. Com esta finalidade, os seguintes objetivos específicos foram definidos:

- Otimizar e padronizar das condições de preparo do inóculo, visando reduzir o seu tempo de preparo.
- Testar o sistema em biorreator com volume variável, alimentação somente com a fonte de carbono no início do processo, vazão de alimentação exponencialmente crescente e decrescente, na forma de pulsos.
- Otimizar o meio de cultivo de *S. cerevisiae* W303-181, visando determinar a influência da concentração dos micronutrientes (adenina, histidina, triptofano e uracila) na produção de G6PDH.
- Estudar a concentração inicial de substrato e o tempo de alimentação em processo descontínuo alimentado, utilizando meio de cultivo otimizado e vazão de alimentação exponencialmente crescente, visando aumentar a produção de G6PDH;
- Estudar a influência do aminoácido leucina na formação de biomassa e produção de G6PDH.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Utilização de leveduras em processos biotecnológicos

As leveduras são fungos unicelulares que se encontram distribuídos nos mais diversos ecossistemas. Têm um importante significado no âmbito sócio-econômico e da saúde. São descritas como o mais velho organismo domesticado pelo homem e vêm sendo empregadas na fabricação de bebidas alcoólicas e de pães há milênios. Hoje em dia as leveduras têm numerosos outros papéis, não se limitando ao tradicional fabrico de alimentos fermentados (WALKER, 1998).

A tecnologia de leveduras abrange todos os processos que exploram a atividade das leveduras. Produtos biotecnológicos, obtidos de leveduras, abrangem importantes setores como o de alimentos, bebidas, químicos, enzimas industriais, farmacêuticos, agrícolas e ambientais. Várias são as espécies de leveduras de interesse biotecnológico, algumas delas estão listadas na Tabela 1.1. A biotecnologia de leveduras pode ser definida como exploração da fisiologia das leveduras. A fisiologia e a biotecnologia de leveduras estão intrinsecamente ligadas e, dessa forma, somente um conhecimento aprofundado do crescimento celular e processos metabólicos das leveduras tornará possível a sua aplicação industrial (WALKER, 1998).

Até meados da década de 70, a biotecnologia, enquanto ciência, tinha como principal objetivo desenvolver sistemas de produção de biomoléculas de interesse comercial, geradas pelo metabolismo de microrganismos (CASTRO, BRANDÃO, 2004). Contudo, a partir dessa década, novas tecnologias foram desenvolvidas, permitindo o isolamento e a purificação de genes específicos num processo chamado de clonagem gênica. A engenharia genética, mais especificamente, tecnologia do DNA recombinante, tem revolucionado várias áreas da biologia básica e aplicada. Muitas dessas técnicas são provenientes da microbiologia, bioquímica, imunologia e genética microbiana, permitindo que as análises do DNA ganhassem novo enfoque. O DNA tornou-se, então, uma molécula fácil de ser analisada, sendo possível isolar regiões específicas, obtê-las em grande quantidade e determinar a sua seqüência numa velocidade de milhares de nucleotídeos por dia. Dessa forma, a

tecnologia do DNA recombinante pode ser usada para estudar mecanismos de replicação e expressão gênica, na determinação de seqüência de um gene e conseqüentemente da proteína que ele codifica, ou no desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir substâncias úteis, tais como insulina humana, hormônio do crescimento, vacinas e enzimas industriais em grande quantidade (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

As leveduras têm sido muito usadas desde o início dos anos 80 para a produção em larga escala de proteínas intra e extracelulares de origem humana, animal e de plantas. As leveduras são adequadas a este uso por apresentarem facilidade de crescimento e manipulação genética e, também, pela habilidade de conduzir modificações pós-traducionais específicas de células de eucarióticos (CASTRO, BRANDÃO, 2004). Dentre as leveduras, destaca-se a *Saccharomyces cerevisiae*. Extensivamente estudada e conhecida, a *S. cerevisiae* é tida como hospedeiro ideal para expressão de proteínas heterólogas entre elas, a enzima glicose-6-fosfato desidrogenase. Contudo, leveduras não-convencionais (leveduras que não pertençam ao gênero *Saccharomyces*), exibem algumas vantagens na tecnologia de clonagem quando comparadas com a *S. cerevisiae*. As leveduras não-*Saccharomyces* estão sendo estudadas e aplicadas nos diversos setores biotecnológicos. Dentre elas, destaca-se a *Pichia pastoris*, uma levedura metilotrófica, ou seja, capaz de crescer em meio de cultura contendo metanol como única fonte de carbono (WALKER, 1998).

TABELA 1.1 - Algumas espécies de leveduras que apresentam interesse biotecnológico.

Levedura	Uso e uso potencial na indústria
<i>Candida spp.</i>	Uso distribuído de acordo com a espécie, por exemplo: <i>C. albicans</i> (ácido 6-aminopenicilâmico, vitamina B6); <i>C. boidinii</i> (NAD, FAD, cetonas e ácido cítrico); <i>C. tropicalis</i> (triptofano).
<i>Hansenula polymorpha</i>	Levedura metilotrófica usada na expressão de genes heterólogos.
<i>Kluyveromyces marximus</i> e <i>Kluyveromyces lactis</i>	Enzimas como lactase e pectinase.
<i>Phaffia rhodozyma</i>	Astaxantina (corante para alimentos).
<i>Pichia spp.</i>	Uso potencial para a expressão de proteínas heterólogas; <i>P. guilliermondii</i> (síntese de riboflavina e biomassa); <i>P. methanolica</i> (síntese de álcool oxidase).
<i>Saccharomyces spp.</i>	<i>S. cerevisiae</i> (usado no fabrico do pão, extrato de levedura, vitaminas, cerveja, vinho, álcool, glicerol, invertase e na alimentação animal); numerosas proteínas via recombinação de DNA, <i>S. bayanus</i> (usado na fermentação da champagne).
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Usado na fermentação do rum e na deacidificação de vinhos; candidato para a produção de etanol, biomassa e expressão de proteínas heterólogas.
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Usado na produção de biomassa, ácido cítrico e enzimas (por exemplo: lípase). Uso potencial na expressão de proteínas heterólogas.

Fonte: WALKER, G. M. Yeast Physiology and Biotechnology, p.267.

1.1.1. *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura é uma fonte biológica para obtenção de produtos de interesse na indústria farmacêutica e de alimentos, como por exemplo, invertase, hexoquinase, glicose-6-fosfato desidrogenase, glicose oxidase, proteases e outras, além da possível utilização de sua própria biomassa celular como fonte de proteínas na alimentação animal e humana (PESSOA JR *et al.*, 1996; SILVA, 1998; BENÍTEZ *et al.*, 1996).

As células de *S. cerevisiae* são elípticas, medindo cerca de 6 a 8 μm de comprimento e 5 μm de largura (PELKZAR *et al.*, 1996). É uma levedura típica, ascomicética e anaeróbia facultativa, apresenta uma reprodução vegetativa por brotamento. O ciclo de vida de leveduras do tipo *Saccharomyces* inclui duas fases: haplóide e diplóide. Quando células diplóides são colocadas em um meio de esporulação, o crescimento vegetativo cessa, as células esporulam e cada célula diplóide é transformada em um asco, normalmente consistindo de quatro esporos haplóides (BYERS, 1981).

Essa levedura tem representado o ponto central na evolução da microbiologia, bioquímica e genética, inclusive no desenvolvimento de novos processos microbianos e tornou-se um microrganismo modelo em genética e biologia molecular, culminando com seu completo seqüenciamento (ENTIAN, 1997). Extensivamente estudada, é considerada um microrganismo seguro (GRAS – *generally recognized as safe*) e, por essa razão, é cultivada em escala industrial no setor farmacêutico e de alimentos há anos (Da SILVA *et al.*, 1990; MURPHY *et al.*, 1999; ZIGOVA, 2000).

A *S. cerevisiae* tem se mostrado útil para estudos de controle de expressão gênica. Por ser um organismo eucariótico, é um hospedeiro adequado para produção elevada de proteínas citossólicas solúveis e secretadas. São capazes de promover modificações pós-traducionais em proteínas, como a glicosilação e/ou outras modificações necessárias para a ótima atividade biológica e estabilidade protéica (ZIGOVA, 2000). Por essa razão, são atrativas para estudo de expressão de proteínas heterólogas (Da SILVA *et al.*, 1990; ZIGOVA, 2000). A maioria dos vetores usados na super expressão de proteínas em leveduras baseia-se no plasmídeo natural 2 μ multi-cópia. Mas vetores contendo regiões centroméricas que determinam a presença de uma única cópia por célula também têm sido desenvolvidos

(ROMANOS *et al.*, 1992). O gene da fosfogliceratoquinase 1 (PGK 1) de *S. cerevisiae* codifica um dos mais abundantes níveis de mRNA e de determinadas proteínas na célula, compreendendo entre 1% e 5% do total celular (OGDEN *et al.*, 1986). Portanto, o promotor PGK 1 é uma opção atraente para obtenção de altos níveis de expressão de proteínas, como é o caso da G6PDH (LOJUDICE *et al.* 2001). Mais recentemente, CHU *et al.* (2004) mostraram que esse promotor foi utilizado, com sucesso, para a produção de interferon- α 2a. ALTINTAS *et al.* (2003) também usaram, com sucesso, o promotor PGK para a expressão de uma enzima bifuncional, com atividade amilolítica e glicoamilolítica.

1.1.2. *Saccharomyces cerevisiae* W303-181

Para obter uma cepa de levedura que expressasse a G6PDH em níveis elevados, LOJUDICE *et al.* (2001) construíram plasmídios que contêm a região de codificação da G6PDH sob o controle de dois fortes promotores de transcrição: promotor PGK1 (fosfogliceratoquinase 1) e promotor GPF, que foi construído pela fusão dos promotores GAL1 e PGK1 (ROSSI, 2002).

O promotor GPF tem a vantagem de manter a característica do promotor GAL1 e possuir uma parte única para iniciar a transcrição. A seqüência de bases que codifica a G6PDH foi isolada por PCR usando o DNA genômico como *template* e pares de *primers* com finais 5'-3'. A reação PCR mostrou mobilidade eletroforética 1,5 Kb em gel de agarose, que era o tamanho esperado da seqüência. Esse fragmento de DNA foi submetido a uma digestão com enzimas de restrição (BamHI e XbaI) e ligado ao plasmídio YCpSUPEX1 o qual tinha sido digerido pelas mesmas enzimas de restrição. Os fragmentos de DNA ligados ao plasmídio foram transformados dentro de células de *E. coli*. O DNA do plasmídio foi isolado e projetado em clones contendo G6PDH e o plasmídio resultante foi denominado YCpGPF-G6PD (ROSSI, 2002).

O promotor PGK1 foi amplificado por PCR de DNA genômico usando pares de *primers* complementares com final 3'-5'. O fragmento de DNA obtido mostrou o tamanho correto (0,6 Kb) e foi submetido à digestão com as enzimas de restrição XhoI e BamHI. Esse fragmento foi clonado em um vetor Yeplac 181 junto com a seqüência codificadora da G6PDH e o terminador PGK1, os quais foram isolados do plasmídio YCpGPF-G6PD. O novo plasmídio foi então denominado YEpPGK-G6PD (ROSSI, 2002).

A cepa modificada geneticamente por LOJUDICE *et al* (2001) produziu maior atividade específica de G6PDH, quando comparada com os tipos selvagens. Especificamente, as cepas carregando os plasmídios YCpGPF-G6PD e YEpPGK-G6PD mostraram um aumento de 6 e 14 vezes, respectivamente, na atividade de G6PDH quando comparados com as cepas parentais que cresceram nas mesmas condições. No mesmo artigo publicado por esses autores, verificou-se que tanto a *Saccharomyces cerevisiae* de origem comercial como cepa parental cultivada em biorreator apresentavam produtividades de G6PDH similares. Os estudos mostraram que a produção de G6PDH pode ser melhorada pela substituição do promotor de transcrição nativo por promotores que são regulados especificamente por fontes de carbono do meio de cultura usados no crescimento da célula.

LOJUDICE *et al* (2001) desenvolveram, então, a cepa *S.cerevisiae* W303-181, que carrega um plasmídio contendo uma seqüência que codifica a G6PDH sob regulação do promotor PGK1. Essa cepa é auxotrófica para alguns micronutrientes (adenina, histidina, triptofano e uracila) e apresenta um marcador de LEU2 (leucina). Os autores concluíram que o custo da produção da G6PDH pode ser significativamente reduzido pelo uso de uma cepa que contenha níveis da enzima mais altos do que aqueles encontrados em cepas comercialmente disponíveis.

Contudo, a determinação de condições operacionais ótimas para processos fermentativos usando microrganismos recombinantes é muito complexa, devido à complexidade adicional no processo de segregação ou da instabilidade estrutural do plasmídio. O risco de perda do plasmídio pela célula depende das suas características de construção, condições do meio e velocidade com que o microrganismo se desenvolve (SHENE *et al.*, 2000).

A síntese de um produto de gene clonado é influenciada por fatores genéticos e ambientais, assim como da estabilidade do plasmídio e do número de cópias, força de promotor, velocidade de crescimento celular e composição do meio de cultivo (CHIRUVOLU *et al.*, 1996). Além disso, algumas células recombinantes precisam de um meio especial que evite a perda do plasmídio (CHIRUVOLU *et al.*, 1996).

1.2. Processos fermentativos

Diversos produtos biológicos utilizados nas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos são obtidos por processos fermentativos. O aumento de produtos comercializados, como produtos do metabolismo primário (álcool, ácidos orgânicos),

metabólitos secundários (antibióticos), células, enzimas, entre outros, tem levado mudanças significativas no biorreator, visando melhor desempenho e maior segurança de operação.

Existem diversos modos de operação para os processos fermentativos no qual microrganismos são envolvidos. A partir da década de 50, ocorreu o maior desenvolvimento na área de reatores. Segundo SCHIMIDELL e FACCIOTTI (2001), esses reatores podem ser operados do seguinte modo: a) Descontínuo, com um inóculo por tanque ou com recirculação de células; b) Semicontínuo, com ou sem recirculação de células, c) Descontínuo alimentado, com ou sem recirculação de células e d) Contínuo, executado em um ou vários reatores e com ou sem recirculação de células.

Independentemente do modo de operação utilizado, o desenvolvimento de processos fermentativos para produção de enzimas por microrganismo não tem apenas assegurado um suprimento potencialmente ilimitado dessas biomoléculas, como também tornou possível, e em muitas vezes viável, o surgimento de novos sistemas enzimáticos (PARK, 1975).

Novos processos que sejam economicamente viáveis, com reprodutibilidade e confiabilidade, aumentaram a necessidade de controle e melhor acompanhamento do processo. Porém, maiores progressos resultariam de uma melhor compreensão da fisiologia microbiana, interações do microorganismo com o meio e sua habilidade em manipular fluxos metabólicos (BUCKLAND, LILLY, 1993).

Diversos são os estudos feitos com a finalidade de aprimorar e otimizar os processos fermentativos objetivando a produção de enzimas (ZIGOVA, 2000; SHENE, *et al.*, 2000; MIGUEL *et al.* 2003; MØLLER *et al.*, 2004; CORTÉZ *et al.*, 2005; KIM *et al.*, 2005, DAS NEVES *et al.*, 2005, DANESI *et al.*, 2005). No entanto, segundo TONG e INLOES (1990), a real aplicação industrial de qualquer enzima só é viável se as condições utilizadas no processo fermentativo forem favoráveis e se a enzima produzida em larga escala apresentar os mesmos níveis de atividade e produtividade obtidos em escala de bancada.

1.2.1. Fatores que influenciam o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*

Vários são os fatores que influenciam o cultivo de *S. cerevisiae*, como temperatura, pH, concentração das fontes de carbono e nitrogênio e o tipo de processo fermentativo, dentre outros.

ROSSI (2002) estudou, em agitador rotativo, algumas condições de cultivo *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 usando metodologia de superfície de resposta e, as melhores condições encontradas, proporcionaram uma produtividade de G6PDH de 45,55 U/Lh.

NEVES (2003) estudou a produção de G6PDH de *S. cerevisiae* W303-181 em biorreator de bancada frente a dois valores de pH, 4,6 e 5,7. O pH de 5,7 juntamente com a relação C:N 6,7 g/g, glicose 10 g/L, aeração de 2,2 vvm e agitação de 400 rpm favoreceram a produção dessa enzima, cuja atividade específica foi da ordem de 86 U/g_{células}.

Por fim, DANESI *et al.* (2005) estudaram o uso de melão de cana-de-açúcar, (fonte de carbono) e extrato de levedura (fonte de nitrogênio), em diferentes relações C:N (carbono/nitrogênio), para a produção de G6PDH de *S. cerevisiae* W303-181. Esses autores verificaram que, com C:N igual a 10, a produtividade enzimática foi de 5180 U/L, 3,7 vezes mais alta que as previamente obtidas utilizando glicose com fonte de carbono e YNB como fonte de nitrogênio.

1.2.2. Fontes de carbono e nitrogênio

Devem-se considerar as fontes de carbono e nitrogênio como os nutrientes responsáveis pelo crescimento celular. As matérias primas podem perfazer 60 a 80% do custo em uma produção de enzimas por fermentação e a composição do meio deve ser definida com cuidado (LILLY, 1979).

Para melhor desempenho e obtenção do produto desejado, dentro das condições de cultivo, há necessidade de seleção entre essas diversas fontes de nutrientes. Deste modo, pode-se obter melhores condições de processo e, assim, suprir suficientemente as células para biossíntese e geração de energia (WANG *et al.*, 1979 apud SILVA, 2000; CHIRUVOLU *et al.*, 1998; CHEM *et al.* 1993).

O modo de aplicação e a seleção de fontes de carbono é um dos fatores críticos dos processos fermentativos, pois muitos compostos, especialmente açúcares, podem causar intensa repressão catabólica da síntese de várias enzimas, além da redução na velocidade de crescimento de determinados microrganismos (LILLY, 1979). Além disso, há casos em que microrganismos modificados geneticamente precisam ser cultivados em meios específicos para evitar a perda do plasmídeo responsável pela produção da biomolécula de interesse (LOJUDICE *et al.*, 2001).

Várias leveduras podem metabolizar uma variedade de mono e oligossacarídeos supridos externamente, bem como reservas internas de glicogênio e trealose (REED, 1973). No entanto, toda levedura do tipo selvagem pode utilizar glicose como fonte de carbono. O controle da assimilação dos açúcares tem sido estudado basicamente em leveduras de interesse industrial e tecnológico, buscando o entendimento e aperfeiçoamento do processo fermentativo (MEDEIROS, 1989 apud SILVA, 2000).

A glicose é um dos mais importantes “primeiros mensageiros” em células de leveduras. A adição de glicose ou de um açúcar rapidamente fermentescível gera sinais metabólicos e dispara uma ampla variedade de fenômenos regulatórios. O sinal produzido interage com o produto de um gene, regulando sua transcrição por ativação de proteínas repressoras ou pela inibição de proteínas ativadoras (GANCEDO,1992). A concentração de glicose no meio exerce uma função reguladora importante no metabolismo. Por exemplo, para *S. cerevisiae*, a glicose não é somente uma fonte de carbono, mas também regula o mecanismo de crescimento celular (REIFENBERGER *et al.*,1997). O transporte de açúcar pode ser uma fase limitante do catabolismo durante o processo fermentativo (REIFENBERGER *et al.*,1997; DOES, BISSON,1989).

Resumidamente, em *S. cerevisiae*, a captação de glicose é feita através de dois sistemas, um de baixa afinidade e outro de alta afinidade. No sistema de captação de baixa afinidade, a glicose é incorporada, exclusivamente, por difusão facilitada, independente da hexoquinase, que é a enzima responsável pela fosforilação da glicose. Quanto ao sistema de captação de alta afinidade, este é dependente da hexoquinase, das condições de cultivo e da glicose presente no meio. Esse sistema pode, inclusive, ser reprimido por altas concentrações de glicose, contudo, é desreprimido quando as células crescem ou são transferidas para um meio com baixa concentração de glicose (DOES, BISSON, 1989).

A repressão por glicose seria, então, um sistema regulatório global, governando a resposta celular pela disponibilidade de glicose no meio (CARLSON, 1987). Na utilização de sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) como fonte de carbono por células de *Saccharomyces cerevisiae*, inicialmente, é realizada hidrólise extracelular desse dissacarídeo pela enzima invertase (β -D-frutofuranosídeo frutoidrolase E.C. 3.2.1.26) e, em seguida, o transporte dos monossacarídeos para o interior das células. A ação

da invertase sobre a sacarose resulta em uma mistura equimolar de glicose e frutose (WISEMAN, WOODWARD, 1975).

Ainda, um dos mais importantes fenômenos metabólicos em *S. cerevisiae* é o efeito *Crabtree*, que é a fermentação alcoólica sob condições aeróbias. (PRONK *et al.*, 1996). Em cultivos contendo glicose como fonte de carbono, as leveduras facultativas apresentam fermentação alcoólica sob condições limitadas de oxigênio. Em algumas espécies, o etanol é produzido mesmo sob intensa condição aeróbia, um fenômeno conhecido como efeito *Crabtree* (DE DEKEN, 1966; KIERS *et al.*, 1998).

As leveduras têm a habilidade para utilizar um amplo espectro de compostos capazes de servir de fonte de nitrogênio, desde os mais simples, como a amônia e aminoácidos, até estruturas mais complexas, tais como ácidos nucleicos (COOPER, 1982 apud SILVA, 1998). Nesse sentido, SILVA (1998) estudou a influência de diferentes fontes de nitrogênio no cultivo de *S. cerevisiae* visando a produção das enzimas hexoquinase (HK) e glicose-6-fosfato desidrogenase. A maior produção dessas enzimas (4,738 U/mg_{proteína} para HK e 0,379 U/mg_{proteína} para G6PDH) foi encontrada quando se utilizou uma fonte orgânica de nitrogênio associada a outra inorgânica (peptona 4,00 g/L, sulfato de amônio 5,10 g/L, asparagina 0,33 g/L e glutamina 0,31 g/L).

A utilização de aminoácidos é predeterminada pela capacidade celular de transporte através da membrana plasmática, seguindo sua incorporação direta em proteínas recém-sintetizadas ou por seu catabolismo, resultando em íons amônio (após deaminação) ou glutamato (após transaminação) (HORÁK, 1987 apud SILVA, 1998).

Os íons NH_4^+ , presentes quando ocorre a utilização do sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, são considerados tóxicos para as células em elevadas concentrações. Esse íon pode ser assimilado primeiro nos aminoácidos e depois em outras biomoléculas que contenham nitrogênio. Os aminoácidos glutamato e glutamina são o ponto de entrada de NH_4^+ , pois o grupo amino de outros aminoácidos é derivado do grupo amino do glutamato através de reações de transaminação. O NH_4^+ é assimilado pela célula através de uma reação de biossíntese envolvendo o glutamato e catalisada pela enzima glutamina sintase, que apresenta alta afinidade por esses íons. O glutamato, por sua vez, é gerado pela

reação do α -cetogluturato e glutamina na presença de NADPH e H^+ , sendo esta reação catalisada pela enzima glutamato sintase (LENINGHER *et al.* 1995).

A repressão catabólica realizada pelo nitrogênio é um fenômeno de regulação que inibe fortemente a transcrição de genes codificadores de proteínas quando fontes de nitrogênio facilmente utilizáveis (amônia, asparagina ou glutamina) estão presentes no meio de cultivo (ROUSSELET *et al.*, 1995 apud SILVA, 1998). Quando em excesso, a amônia causa um efeito de repressão que ficou conhecido como “efeito amônia”

1.2.3. Processo fermentativo descontínuo alimentado

Vários processos fermentativos têm sido desenvolvidos em função de diferentes aplicações. Dentre eles, o processo descontínuo alimentado tem importância tanto em escala industrial como em pesquisa. Os primeiros a usar o termo descontínuo alimentado foram YOSHIDA *et al.* (1973). Esse processo é definido como uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados ao biorreator durante o cultivo e em que todos os produtos aí permanecem até o final da fermentação. Em alguns casos, todos os nutrientes são gradualmente alimentados ao biorreator. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, a adição dos nutrientes pode ser de forma contínua ou intermitente. Mudança de volume pode não ocorrer, dependendo da concentração de substrato e da taxa de evaporação do sistema (CARVALHO, SATO, 2001). Devido à flexibilidade de utilização de diferentes vazões de enchimento de dornas com meios nutrientes, é possível controlar a concentração de substrato de modo que, por exemplo, o metabolismo microbiano seja deslocado para uma determinada via metabólica, levando ao acúmulo de um produto específico.

Este tipo de processo oferece diversas vantagens em relação aos outros. Entre elas tem-se: 1) produção de elevadas concentrações de células (o que é particularmente importante no caso de produtos associados ao crescimento celular); 2) o melhor controle das condições de adição de substratos durante a fermentação (de grande importância no caso das concentrações de substratos específicos como, por exemplo, a fonte de carbono); 3) o melhor controle dos produtos obtidos ou dos efeitos da repressão catabólica devido à adição de substrato ser limitada a apenas a quantidade necessária para a formação do produto; 4) permite dominar e controlar os desvios no crescimento de microrganismos encontrados na fermentação

descontínua; 5) permite reposição da água perdida no meio por evaporação; 6) é um modo alternativo de operação para fermentações que utilizem substratos tóxicos ou de baixa solubilidade. Além disso, o processo descontínuo alimentado é útil para o estudo de cinética de processos fermentativos, pois permite a manutenção de baixos níveis de substrato por longo período de tempo, que é favorável à estimação de parâmetros cinéticos. Ademais, há evidências que as máximas velocidades de alguns processos podem ser encontradas somente nessas circunstâncias (CARVALHO, SATO, 2001).

Devido à diversidade de aplicações do processo descontínuo alimentado, algumas variações podem decorrer com a finalidade de ajustá-lo à produção de um determinado produto. Dentre eles, tem-se o processo descontínuo alimentado estendido que tem a finalidade de manter, em valores constantes, a concentração de substrato limitante, pelo suprimento contínuo do nutriente. Como o próprio nome sugere, estende-se o período da fermentação, mantendo-se os níveis de concentração de substrato no reator adequados para que as células continuem com atividade fermentativa direcionada para a formação do produto desejado. Há, no entanto, diversas formas de condução de um processo descontínuo alimentado, como: com controle de retroalimentação, alimentação intermitente, alimentação com vazão constante e alimentação com vazão exponencial. CARVALHO, SATO (2001) citam que para a produção da enzima β -galactosidase o processo deve ser conduzido sem retroalimentação e com vazão exponencial de alimentação. Esses autores referem-se, ainda, à produção de células microbianas em processo sem controle da retroalimentação e com vazão de alimentação constante. O sistema descontínuo alimentado pode, ainda, ser conduzido com volume constante e diferentes vazões.

NEVES (2003) ao estudar o processo descontínuo alimentado, utilizando *S. cerevisiae* W303-181 para obtenção de G6PDH, encontrou a maior produtividade de G6PDH quando se alimentava o biorreator somente com glicose, sendo desfavorável a utilização de outros componentes do meio como fontes a serem alimentadas. Ainda, segundo esse autor, foi encontrada a maior atividade específica por grama de células ($72 \text{ U/g}_{\text{células}}$) ao final da fase de alimentação linear decrescente. Já, as maiores produtividades em células e em enzimas ($0,52 \text{ g/h}$ e 47 U/h) foram obtidas no final da fase de alimentação exponencialmente crescente.

Processos fermentativos em regime descontínuo alimentado, conduzidos em reatores de tanque agitado, são freqüentemente utilizados pela indústria (SCHNELLE *et al.*, 1996; FURLAN *et al.*, 2001). Seu uso é especialmente vantajoso em sistemas como bioprocessos ou processos de polimerização, no quais os produtos desejados podem ser obtidos através de operações eficientes.

Uma importante vantagem da operação do regime descontínuo alimentado é que o crescimento celular e a formação de produtos podem ser facilmente estudados. Por esse motivo, vários autores acabaram por estudar o processo descontínuo alimentado visando obtenção de bioprodutos de microrganismos recombinantes. SHENE *et al.* (2000) verificou que a maior produção de β -1,4-endoglucanase ocorreu em processo descontínuo alimentado, comparando esses resultados com os de cultivo contínuo. KAPAT *et al.* (1998) estudaram produção de glicose oxidase recombinante, em processo descontínuo alimentado usando uma cepa de *S. Cerevisiae* recombinante. Esses autores empregaram vazão de alimentação constante de glicose, glicose/galactose e galactose, sendo este último o responsável pela maior atividade encontrada (154 U/mL). CHU *et al.* (2005) estudaram a produção de interferon- α 2a usando uma *S. cerevisiae* recombinante. Esses autores verificaram um aumento de 4 vezes na produção de interferon- α 2a por processo descontínuo alimentado quando comparado com a produção obtida em frascos agitados. LEE *et al.* (2000) estudaram a produção de xilitol usando *S. cerevisiae* recombinante e usaram glicose como fonte de carbono para crescimento celular e xilose como substrato para a conversão a xilitol. Contudo, verificaram que a adição de glicose inibia a conversão de xilose a xilitol, causando acúmulo de etanol. O problema foi resolvido através da otimização da alimentação de glicose e xilose ao biorreator, o que permitiu alcançar uma concentração de xilitol de 1,69 g/L. ALTINTAS *et al.* (2003) usaram uma levedura que expressava uma enzima bifuncional, com atividade amilolítica e glicoamilolítica, para a conversão direta de amido a etanol.

1.3. Enzimas

Enzimas são moléculas (ou compostos moleculares) que aceleram uma reação química por meio de ligações ao(s) reagente(s) em posições e circunstâncias que aumentam a probabilidade da reação. Até recentemente, admitia-se que todos

os catalisadores biológicos (enzimas) fossem protéicos. Entretanto, há pouco mais de uma década, foram caracterizadas certas reações celulares que têm como catalisadores determinadas moléculas de RNA, as quais apresentam um comportamento semelhante ao das proteínas enzimáticas obedecendo também à cinética de Michaelis-Menten. Seu emprego nas reações metabólicas, entretanto, está restrito a alguns casos especiais (MARZZOCO, TORRES, 1999).

O uso crescente desses catalisadores em processos industriais deve-se, portanto, à alta sensibilidade e especificidade de suas reações químicas, bem como ao avanço das pesquisas em genética, somada à tecnologia de processos fermentativos, na área de produção de enzimas.

Segundo VITOLLO, ROCHA-FILHO (1998), a utilização de enzimas em escala industrial é de fundamental importância, devendo ser analisada, no entanto, a relação custo/benefício. Com relação à aplicação na indústria, as enzimas podem ser classificadas em três grandes grupos: a) enzimas utilizadas na produção de alimentos e de ingredientes alimentícios; b) enzimas utilizadas na produção de bebidas e c) enzimas utilizadas na produção de bens variados, como por exemplo reagentes analíticos.

A atividade catalítica de uma enzima provém de uma estrutura terciária precisa, altamente ordenada que justapõe os grupamentos específicos dos aminoácidos de tal modo a formar sítios estereoespecíficos de ligações com o substrato e o centro catalítico. Esta estrutura terciária é mantida principalmente por um grande número de ligações não covalentes fracas, possuindo, em termos práticos, uma estrutura enzimática muito delicada e frágil (SEGEL, 1979). Entretanto, a atividade catalítica da enzima depende da integridade da sua conformação protéica nativa. Esta atividade geralmente se perde caso a enzima seja desnaturada ou dissociada em subunidades (LEHNINGER *et al.*, 1995).

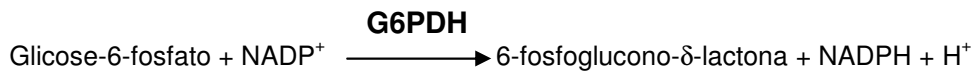
As enzimas possuem um pH ou uma região de pH ótimo na qual sua atividade é máxima. Esta influência do pH na velocidade de uma reação enzimática está relacionada com os sítios ativos nas enzimas. Esses sítios ativos são freqüentemente compostos por grupos ionizáveis que devem se encontrar em uma forma iônica adequada para que mantenham a sua conformação, liguem-se aos substratos, ou catalisem reações (SEGEL, 1979). As enzimas, quando submetidas a valores extremos de pH, tanto ácidos como básicos, podem desnaturar, expondo com isso seus grupamentos hidrofóbicos. A desnaturação em elevados ou em

baixos valores de pH ocorre devido ao decréscimo nas interações eletrostáticas. Em alguns casos, esse tipo de desnaturação pode ser seguido por uma agregação das moléculas protéicas e posterior precipitação. No entanto, em alguns casos pode acontecer de algumas enzimas, que se desnaturaram em valores extremos de pH, serem reativadas quando submetidas a um meio de baixa força iônica (HALL, 1996).

A maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior com a elevação da temperatura. Esse aumento na temperatura proporciona uma maior energia cinética às moléculas de reagente, ocasionando um maior número de colisões por unidade de tempo. Porém, com excesso desta energia cinética a enzima poderá ser desnaturada através do rompimento de suas estruturas terciárias, perdendo a atividade catalítica (SEGEL, 1979). Segundo HALL (1996), na maioria dos casos, a solubilidade de uma enzima é aumentada com a temperatura, desde que esteja situada na faixa de 0 a 40-50 °C. Porém, acima desse limite de temperatura a enzima poderá ser desnaturada através da modificação das ligações não covalentes envolvidas na estabilização das suas estruturas secundárias e terciárias, como nas pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Quando as estruturas secundárias e terciárias de uma proteína são desnaturadas, os grupos hidrofóbicos interagem e reduzem a hidratação da molécula. Essas interações hidrofóbicas levam à agregação seguida de coagulação e precipitação (HALL, 1996).

1.3.1. A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, G6PDH, (D-glicose-6-fosfato: NADP-oxidoreductase, EC1.1.1.49) é encontrada em células animais, vegetais e microorganismos, podendo se destacar a levedura *Saccharomyces cerevisiae*. A enzima é a primeira do processo oxidativo da via pentose-fosfato convertendo a glicose-6-fosfato a 6-fosfoglicono- δ -lactona, sendo classificada bioquimicamente como oxidoreductase. A G6PDH é de grande importância para a sobrevivência das células, uma vez que é responsável pela manutenção de um nível adequado da coenzima reduzida NADPH (SEVERO, 1979) e participa da regulação do ciclo das pentoses. A necessidade celular por G6PDH está relacionada ao fornecimento de NADPH e ribose-5-fosfato. O NADPH é usado em biossínteses redutoras, enquanto que a ribose-5-fosfato é usada na síntese de DNA e RNA. (ÖZER *et al.*, 2001; ROWLAND *et al.*, 1994; COSGROVE *et al.*, 1998).



Na maioria dos microrganismos, a G6PDH apresenta uma subunidade com massa molar de 50-60 kDa, correspondendo aproximadamente a 500 aminoácidos. Esta enzima aparece normalmente na forma de dímeros ou tetrâmeros (ROWLAND *et al.*, 1994), sendo que as G6PDHs provenientes de *Leuconostoc mesenteroides* (Figura 1.1) e *Saccharomyces cerevisiae* são dímeros (COHEN, ROSEMEYER, 1969; ZAITZEVA *et al.*, 1997). O pH ótimo de atividade da enzima é 7,8 e o ponto isoelétrico é 4,6 (OLIVE, LEVY, 1975; ISHAQUE *et al.*, 1974; ROWLAND *et al.*, 1994; COSGROVE *et al.*, 1998). A enzima nativa pura é estável durante muitas semanas tanto a 0 °C como a 20 °C. Pode, ainda, ser mantida por muitas horas a 40 °C, sem apreciável perda de atividade (SIGMA, 1996).

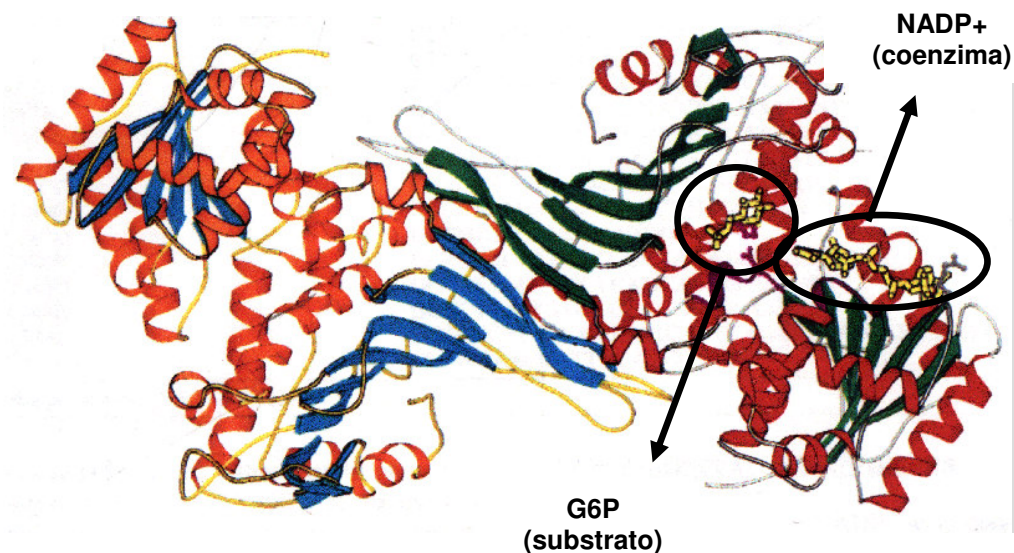


FIGURA 1.1 – Estrutura da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) de *Leuconostoc mesenteroides* (dímero). O substrato G6P e a coenzima NADP+ aparecem ligados a seus sítios específicos (VOUGHT *et al.*, 2000).

1.3.2. Aplicações da glicose-6-fosfato desidrogenase

O mercado da enzima G6PDH movimentou 7 milhões de dólares no mercado mundial de *kits*, no ano de 1995, e foi a quarta enzima mais comercializada para esse fim (GODFREY, WEST, 1996). Esses *kits* podem ser utilizados para medidas de teores de glicose, frutose, manose, ATP (BOROSS *et al.*, 1987; AGUERO, 1998) e de atividade enzimática de hexoquinase e creatino-quinase (ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1997). Usando a G6PDH, é possível determinar glicose na presença de outros sacarídeos, como a frutose (WHYTAKER, 1991; CHATEL *et al.* 1996). Além disso, a G6PDH pode ser empregada para a determinação de glicose em sistema de reator em fluxo contínuo, pois o NADPH formado pela reação enzimática pode ser facilmente detectado espectrofotometricamente ou fluorometricamente (MORI *et al.*, 1999; FREY *et al.*, 1999). Essa enzima pode, ainda, detectar baixíssimos níveis de estreptavidina e biotina por ensaios de bioluminescência em reações de hibridização de DNA, sem perda da atividade enzimática (TEROUANNE *et al.*, 1989; BALAGUER *et al.*, 1989). Como biossensor, a G6PDH pode monitorar rapidamente a concentração de G6P (glicose-6-fosfato) no sangue com menor custo e consumo de tempo do que os métodos tradicionais como cromatografia e espectroscopia. Esse monitoramento é importante porque ele pode refletir diretamente a atividade relativa da G6PDH na via metabólica e tem sido utilizado por possibilitar o controle de G6PDH em eritrócitos humanos e em células de fígado de ratos (BASSI *et al.*, 1999).

CAPÍTULO II

PREPARO DO INÓCULO DE *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 PARA PRODUÇÃO DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH)

Palavras-chave: glicose-6-fosfato desidrogenase, *Saccharomyces cerevisiae*, preparo do inóculo.

2.1. Resumo

Muito comercializada, a G6PDH é empregada para a determinação de teores de glicose, atividade creatino-quinase e hexoquinase. A produção dessa enzima por fermentação é muito interessante e viável economicamente, desde que sejam feitos estudos de aprimoramento do processo, como por exemplo o preparo do inóculo. O objetivo desse trabalho é otimizar e padronizar as condições de preparo do inóculo, avaliando: a) o tempo de preparo; b) a concentração e viabilidade celular e c) o tempo de cultivo no qual a *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 esteja em fase de crescimento exponencial. Três condições de preparo do inóculo foram estudadas. Para a primeira, desenvolvida por NEVES (2003), iniciou-se com repiques do microrganismo em agar inclinado, seguido das etapas de preparo do pré-inóculo e inóculo, cultivo em tubos de ensaio e em agitador rotativo. Tanto o segundo quanto o terceiro métodos, partem de uma suspensão de *S. cerevisiae* W303-181 conservada em tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,7, contendo 30% (v/v) de glicerol e mantida a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Seguiu-se com ativação celular, pré-inóculo e inóculo (todas as etapas de cultivo em agitador rotativo). Para o primeiro método, obtiveram-se os seguintes resultados: concentração celular do inóculo no tempo escolhido para transferência para reator = 1,9 g/L, células viáveis = 93,0%, crescimento exponencial de 4 a 18 h de cultivo e tempo de preparo de 114 h. Para o segundo obtiveram-se: concentração celular do inóculo no tempo escolhido para transferência para reator = 1,37 g/L, células viáveis = 90,9%, crescimento exponencial de 1 a 10 h de cultivo e tempo de preparo de 48 h. Para o terceiro, obtiveram-se: concentração celular do inóculo no tempo escolhido para transferência para reator = 1,50 g/L, células viáveis = 93,0%, crescimento exponencial de 4 a 10 h de cultivo e tempo de preparo de 64 h. O segundo e terceiro métodos apresentaram perfis de crescimento semelhantes, além de fornecerem massa celular o suficiente para dar continuidade aos processos, portanto, ambos podem ser utilizados para o preparo do inóculo.

2.2. Introdução

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase, G6PDH, (D-glicose-6-fosfato: NADP-oxidorreductase, EC1.1.1.49) é encontrada em células animais e vegetais, além de microrganismos, podendo se destacar a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SILVA *et al.*, 2002). A enzima é a primeira do processo oxidativo da via pentose-fosfato convertendo a glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconolactona, sendo classificada bioquimicamente como uma oxidorreductase. Esta enzima, de grande interesse como reagente analítico, pode ser utilizada para a determinação de teores de glicose (CHATEL *et al.*, 1987) e na determinação de atividade de creatinoquinase (BERGMEYER, 1983) e de hexoquinase (ABRAHAO-NETO *et al.*, 1996). Estudos de aprimoramento e otimização de processos fermentativos para a produção de enzimas (ABRAHAO-NETO *et al.*, 1996; PESSOA-JR *et al.*, 1996; ZIGOVA, 2000; SHENE, *et al.*, 2000; MIGUEL *et al.*, 2003), podem torná-los economicamente viáveis (BUCKLAND, LILLY, 1996). A conservação do microrganismo e o inóculo são fatores que influenciam o processo fermentativo e sua otimização é fundamental para torná-lo viável. O inóculo deve fornecer concentração celular adequada, capaz de garantir, em condições econômicas, a fermentação de um determinado volume de mosto (CARVALHO, SATO, 2001). O meio de cultura empregado é de grande importância e, em se tratando de microrganismos auxotróficos, deve garantir o fornecimento de nutrientes específicos para a propagação do microrganismo. Para que se obtenha um inóculo com capacidade produtiva elevada, deve-se dar condições para que um microrganismo seja propagado, que incluem desde seu armazenamento até a sua proliferação (CARVALHO, SATO, 2001). Tradicionalmente, a técnica mais empregada em laboratórios para a conservação de microrganismos consiste em semeá-lo em meio sólido distribuído em tubos e, periodicamente, transferí-lo para novo meio, evitando seu esgotamento nutricional. Microrganismos podem ser mantidos viáveis por meses quando o meio semeado é armazenado sob refrigeração. Contudo, pode ocorrer contaminação e/ou mutações devido ao número de transferências necessárias (ALTERTHUM, 2001). O processo de congelamento de microrganismos é um método que permite a sua preservação sem que haja modificações genéticas, mutações espontâneas, ou perda de características funcionais (DUMONT *et al.*, 2002). Nesse sentido, SCHU *et al.* (1995) obtiveram evidências, através de avaliação do número de microrganismos, de que o congelamento a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ou

menos provocou velocidade de morte celular mínimas ou zero. Contudo, constatou-se um ligeiro decréscimo da viabilidade celular após um ano de estoque a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Esse trabalho visou a otimização e padronização das condições de preparo do inóculo de *S. cerevisiae* W303-181.

2.3. Materiais e métodos

2.3.1. Materiais

Glicose, adenina, histidina, uracila, triptofano, NADP^+ , PMSF, β -mercaptoetanol e glicose-6-fosfato foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). YNB (*Yeast nitrogen base*) foi obtido da Difco (Detroit, MI, EUA). Os demais reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau analítico. Foram utilizados agitador rotativo (New Brunswick Scientific Co., Madison, NJ, EUA), agitador de tubos vórtice (AP 56, Phenix, Araraquara, SP), centrífuga refrigerada (BR4i, Jouan, St. Herblain, França) e espectrofotômetro (DU 640, Beckman).

2.3.2. Preparo de suspensão de leveduras congelada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

A cepa de *S. cerevisiae* W303-181 era armazenada em meio sólido sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ e um meio de cultivo sintético (glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina, histidina, uracila e triptofano 20 mg/L) foi utilizado em todas as etapas de crescimento celular. Na fase de repique, uma alçada dessa cepa foi transferida para tubos de agar inclinado (contendo aproximadamente 7,0 mL de meio), os quais foram incubados em estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Alíquotas de 5 mL de meio de cultivo líquido foram usadas para fazer a lavagem da superfície de cada um desses tubos. Na fase de pré-inóculo, foram preparados tubos contendo 10 mL dessa nova suspensão, que foram incubados em estufa por 48 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. O inóculo foi preparado em Erlenmeyers de 500 mL contendo 10 mL de pré-inóculo e 90 mL de meio de cultivo que, na seqüência, foram incubados em agitador rotativo a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18h. Após esse período, o inóculo foi centrifugado a 3025xg, 30 min e $6\text{ }^{\circ}\text{C}$, o sobrenadante foi desprezado, o *pellet* recolhido e ressuspendido em solução tampão Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,5. O *pellet* foi novamente ressuspendido em solução tampão Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,5 e, após nova centrifugação a 3025xg, 30 min e $6\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi ressuspendido em solução tampão Tris-HCl 0,1 mol/L, pH 7,5

contendo glicerol (30% (v/v)) como crioprotetor. A suspensão celular obtida fracionada em criotubos, cada um contendo 1 mL e estocados a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.3. Preparo do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* W303-181

Foram estudadas três diferentes condições de preparo do inóculo. O meio de cultivo empregado foi o mesmo para todas as etapas em todos os métodos, a saber: glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina, histidina, uracila e triptofano 20 mg/L, em tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,7.

2.3.3.1. 1ª Condição de preparo do inóculo

A primeira condição de preparo do inóculo, desenvolvido por NEVES (2003), foi usada para comparar com outras duas condições, descritas nos itens 2.3.3.2 e 2.3.3.3. Esse método consiste em etapas, ativação celular, pré-inóculo e inóculo. Na fase de ativação celular, uma alçada da cepa, armazenada sob refrigeração a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, foi transferida para tubos de agar inclinado (contendo aproximadamente 7,0 mL de meio), os quais foram incubados em estufa a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h. Usaram-se 5 mL de meio de cultivo líquido para fazer a lavagem da superfície de cada um desses tubos. Na fase de pré-inóculo, foram preparados tubos contendo 10 mL dessa nova suspensão e incubados em estufa por 48 h a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. O inóculo foi preparado em Erlenmeyers de 500 mL contendo 10 mL de pré-inóculo e 90 mL de meio de cultivo que, na seqüência, foram incubados em agitador rotativo a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h.

2.3.3.2. 2ª Condição de preparo de inóculo

A segunda condição consiste em três etapas, ativação celular, pré-inóculo e inóculo. Na fase de ativação celular, 500 μL de suspensão de leveduras descongelada foi adicionada a 9,5 mL de meio de cultivo em um Erlenmeyer de 50 mL e incubado em agitador rotativo a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 h. O pré-inóculo foi preparado transferindo-se 10 mL da suspensão obtida na etapa de ativação celular para Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL de meio de cultivo e foram incubados em agitador rotativo a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 18 h. O inóculo foi preparado transferindo-se 10 mL da suspensão obtida na etapa de pré-inóculo para Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL de meio de cultivo e incubados em agitador rotativo a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 12 h.

2.3.3.3. 3ª Condição de preparo de inóculo

A terceira condição também consiste em três etapas, ativação celular, pré-inóculo e inóculo. Na fase de ativação celular, 900 µL de suspensão descongelada de leveduras foi adicionada a 9,1 mL de meio de cultivo em um Erlenmeyer de 50 mL e incubado em agitador rotativo a 100 rpm, 30 °C por 24 h. O pré-inóculo foi preparado transferindo-se 10 mL da suspensão obtida na ativação celular para Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL de meio de cultivo e incubados em agitador rotativo a 100 rpm, 30 °C por 24 h. O inóculo foi preparado transferindo-se 10 mL da suspensão obtida na etapa de pré-inóculo para Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL de meio de cultivo e incubados em agitador rotativo a 100 rpm, 30 °C por 16 h.

2.3.4. Métodos analíticos

A concentração celular foi determinada utilizando-se uma curva de calibração que correlaciona absorvância com massa seca. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (DU 640, Beckman) a 600 nm, utilizando-se água destilada como análise em branco. A concentração de glicose foi feita pela detecção de açúcares redutores totais (ART), descrita por SOMOGYI (1952).

2.3.5. Parâmetros de cultivo

A produtividade em células (Pr_x) foi determinada pela razão obtida entre a variação da concentração celular e o tempo de cultivo (equação 2.1). O fator de conversão de substrato em células, definido como $Y_{X/S}$, foi calculado pela razão entre a massa celular obtida e o substrato consumido (equação 2.2). A velocidade específica máxima foi determinada através da equação 2.3. O tempo de geração (t_g) foi determinado pela razão entre o logaritmo neperiano de 2 e a velocidade específica máxima de crescimento celular (equação 2.4). A viabilidade celular foi determinada pela contagem de leveduras, coradas com azul de metileno 0,025%, em câmara de Neubauer.

$$Pr_X = \Delta X / \Delta t \quad (2.1)$$

$$Y_{X/S} = \Delta X / \Delta S \quad (2.2)$$

$$X_f = X_i e^{(\mu_{X_{m\acute{a}x}} \cdot \Delta t)} \quad (2.3)$$

$$t_g = \ln 2 / \mu_{X_{m\acute{a}x}} \quad (2.4)$$

Em que: $\Delta X = (X_f - X_i)$; $\Delta S = (S_i - S_f)$; $\Delta t = (t_f - t_i)$; X_f = concentração celular no tempo definido como final da etapa (g/L), X_i = concentração celular inicial (g/L); S_f = concentração de glicose no tempo definido como final da etapa (g/L); S_i = concentração inicial de glicose (g/L); t_f = tempo definido como final da etapa (h); t_i = tempo de cultivo inicial (h); $\mu_{X_{m\acute{a}x}}$ = velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}) e t_g = tempo de geração (h).

2.4. Resultados e discussão

No desenvolvimento de processos fermentativos para a produção de G6PDH usando *S. cerevisiae* W303-181, um dos fatores que apresentam grande influência no processo é o inóculo. Portanto, características do inóculo como a concentração e viabilidade celular devem ser padronizadas. Ao se buscar a padronização e otimização do preparo do inóculo de *S. cerevisiae* W303-181, estudaram-se três métodos. Buscou-se obter um inóculo com alta viabilidade, superior a 90%, e concentração celular acima de 1,25 g/L.

A primeira condição de preparo do inóculo, desenvolvida por NEVES (2003), foi usada para comparação com as outras duas condições propostas nesse trabalho. As condições estudadas apresentavam três etapas (Tabela 2.1), ativação celular, pré-inóculo e inóculo. O cultivo da etapa de inóculo foi conduzido em agitador rotativo a 100 rpm, 30 °C por 24 h, período no qual foram feitas as amostragens para determinação da concentração e viabilidade celular.

TABELA 2.1 – Tempo de duração das seguintes etapas: ativação celular (Ativ.), pré-inóculo (P-inóc.), inóculo (Inóc.) e tempo total de preparo do inóculo (t_T) na primeira, segunda e terceira condição de preparo do inóculo (1^a C, 2^a C e 3^a C).

Método	Ativ. (h)	P-inóc. (h)	Inóc. (h)	t_T (h)
1 ^a C	48	48	18	114
2 ^a C	18	18	12	48
3 ^a C	24	24	16	64

Foi padronizado que o inóculo seria transferido para o fermentador quando o cultivo estivesse no final da fase de crescimento exponencial. Dessa maneira buscou-se alcançar concentração celular acima de 1,25 g/L e no momento em que o cultivo estivesse saindo da fase de crescimento exponencial. Para a primeira condição, NEVES (2003) obteve uma concentração celular de 1,90 g/L em 18 h de cultivo da etapa de inóculo (Tabela 2.2). Para a segunda e terceira condições, foram obtidas concentrações celulares de 1,30 g/L em 12 h e 1,50 g/L em 16 h de cultivo, respectivamente (Tabela 2.1 e 2.2).

TABELA 2.2 – Parâmetros de cultivo do inóculo de *S. cerevisiae* W303-181.

Parâmetros de cultivo	Condições		
	1 ^a C	2 ^a C	3 ^a C
X_f (g/L)	1,90	1,30	1,50
$\mu_{X_{máx.}}$ (h^{-1})	0,06	0,19	0,22
t_{CE} (h)	4 a 18	1 a 10	4 a 10
t_g (h)	11,55	3,65	3,15
Pr_X (g/Lh)	0,08	0,10	0,09
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,09	0,09	0,09
% Viabilidade (%)	93,00	90,90	93,00

A segunda e terceira condições apresentaram um tempo total de preparo do inóculo, 48 e 64 h, menores que para a primeira, 114 h (Tabela 2.1).

A velocidade específica máxima de crescimento celular aumentou de $0,06 \text{ h}^{-1}$, da primeira condição, para $0,19 \text{ h}^{-1}$ e $0,22 \text{ h}^{-1}$ da segunda e terceira, respectivamente (Tabela 2.2). Os maiores valores de produtividade em células foram encontrados para a segunda e terceira condições (Tabela 2.2). Esse incremento da velocidade específica de crescimento celular, maiores produtividades e redução do tempo total de preparo do inóculo, certamente, resultam das diferenças de cultivo entre a primeira e as demais condições. Para a primeira condição, a etapa de ativação celular foi feita em meio sólido, a etapa seguinte (pré-inóculo) em meio líquido, porém, em estufa e sem agitação. No segundo e terceiro métodos, entretanto, a etapa inicial (ativação celular) e a seguinte (pré-inóculo), foram conduzidas em agitador rotativo, o que propiciou uma melhor condição de transferência de oxigênio, além de ter homogeneizado o meio, garantindo uma melhor distribuição dos nutrientes às células.

O fator de conversão de substrato em células foi idêntico nas três condições, indicando que as leveduras utilizaram as fontes de carbono e nitrogênio para crescimento celular de forma similar. Uma redução dos valores do fator de conversão de substrato em células pode indicar que as fontes de carbono e nitrogênio não estariam sendo utilizadas para crescimento celular, e sim para formação de uma biomolécula, como por exemplo, o etanol, em se tratando de *S. cerevisiae*. Ao final do cultivo da etapa de inóculo, a viabilidade celular para as três condições foram superiores a 90% (Tabela 2.2). As diferentes condições estudadas apresentaram ótima viabilidade celular e pequena variação desta entre eles.

A Figura 2.1. mostra a concentração celular para as diferentes condições de preparo do inóculo, enquanto a Figura 2.2, mostra o tempo de cultivo no qual foi observada a fase exponencial de crescimento na etapa de inóculo. Como pode ser observado na Figura 2.2, para a segunda condição, após uma hora de cultivo verificou-se o início do crescimento exponencial, enquanto que nas demais condições ocorreu uma fase lag inicial e crescimento exponencial na quarta hora.

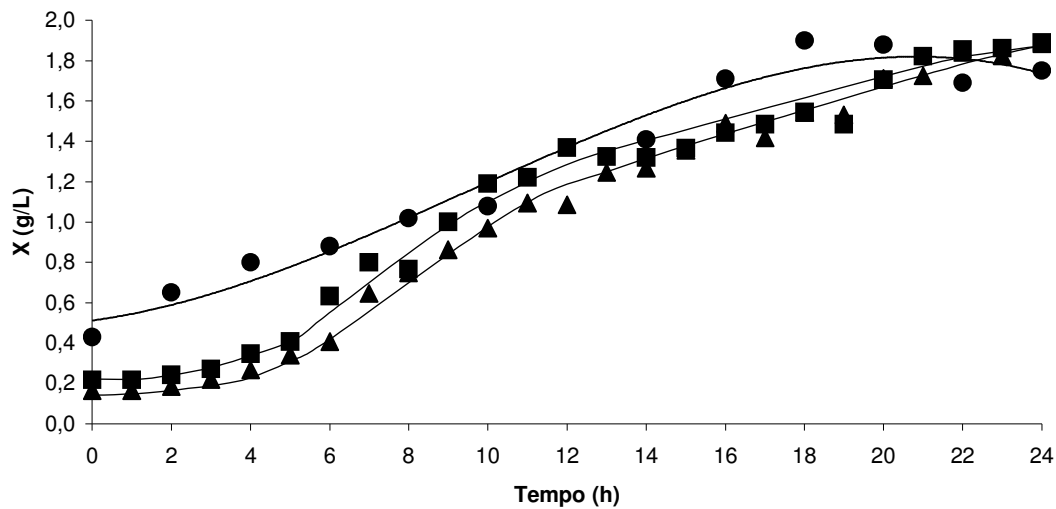


FIGURA 2.1 – Concentração celular (X) em função do tempo de cultivo da etapa de inóculo para a primeira (-●-), segunda (-■-) e terceira (-▲-) condições de preparo do inóculo.

A julgar pela pequena fase lag apresentada (1 h) na etapa de inóculo da segunda condição, a cepa, provavelmente, deveria estar em fase de crescimento exponencial quando foi transferida para a etapa de inóculo, indicando que o tempo mais adequado para a fase de pré-inóculo é de 18 h. Isso permitiu alcançar a maior produtividade em células (0,10 g/Lh), pois foi possível manter o microrganismo em alta velocidade específica de crescimento por mais tempo que os demais métodos (Tabela 2.2).

Diferente da segunda condição, encontrou-se para a terceira condição uma fase lag de aproximadamente 3 h. Provavelmente, essa fase é resultado de uma baixa velocidade de crescimento celular que o microrganismo apresentava no momento da sua transferência da etapa de pré-inóculo para a de inóculo.

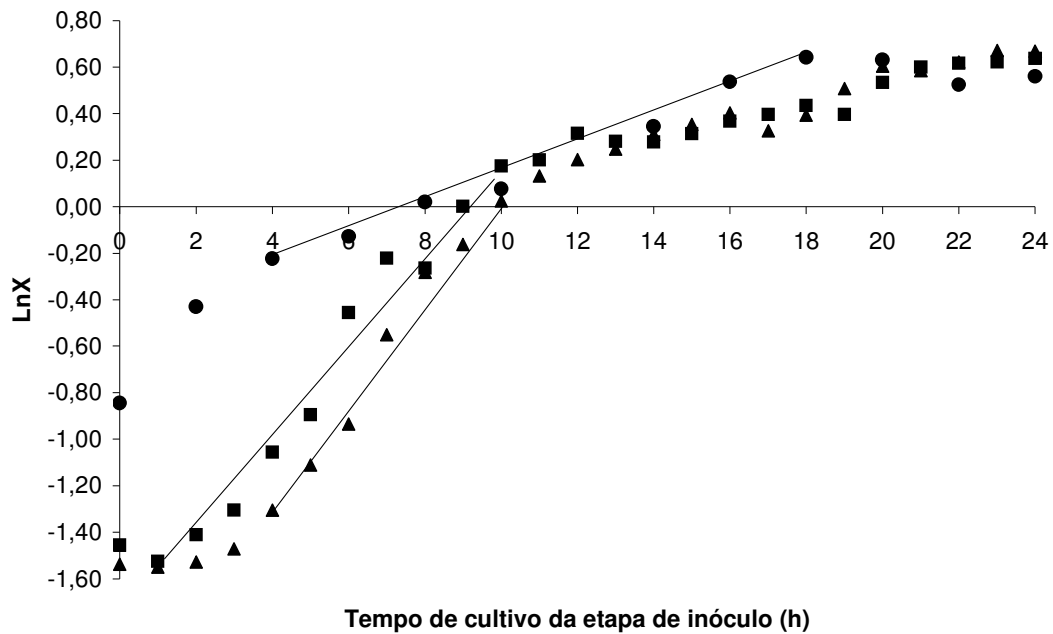


FIGURA 2.2 – Logaritmo neperiano da concentração celular ($\ln X$) em função do tempo de cultivo da etapa de inóculo, onde é verificado o período de fase de crescimento exponencial (–) para a primeira (●) ($R^2 = 0,9909$), segunda (■) ($R^2 = 0,9753$) e terceira (▲) ($R^2 = 0,9830$) condições de preparo do inóculo.

Contudo, a terceira condição apresentou um perfil de crescimento celular muito próximo daquela encontrada para a segunda condição (Figura 2.1). Embora tenha apresentado uma maior fase lag e menor tempo de permanência na fase de crescimento exponencial (Figura 2.2), verificou-se a existência de uma maior velocidade específica de crescimento celular ($0,22 \text{ h}^{-1}$), fator responsável por elevar a concentração celular à desejada em 16 h de cultivo. Esse foi o tempo adotado para o fim do preparo do inóculo na terceira condição, pois o crescimento exponencial havia terminado (Figura 2.2).

2.5. Conclusão

A manutenção da cepa de *S. cerevisiae* W303-181 a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ mostrou-se adequada ao procedimento de preparo do inóculo, pois pode minimizar a possibilidade da ocorrência de contaminação e mutações indesejáveis. O emprego de meio de cultura líquido e agitação, aliado à utilização da cepa armazenada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, propiciaram maiores velocidades específicas de crescimento celular na etapa de inóculo, reduzindo consideravelmente o tempo total de preparo. Esse tempo de preparo reduziu de 114 h (primeira condição) para de 48 h e 64 h para segunda e terceira condições, respectivamente. A segunda e terceira condições apresentarem perfis de crescimento semelhantes, além de fornecerem massa celular o suficiente (acima de 1,25 g/L) para dar continuidade aos processos, portanto, ambas podem ser utilizadas para o preparo do inóculo.

2.6. Agradecimentos

Â. S. M. Miguel agradece o recebimento de auxílio da FAPESP/Brasil, à Prof^a. Carla Columbano Oliveira que conduziu a transformação da levedura *S. cerevisiae* W303-181, ao Msc. Luiz Carlos Martins das Neves pela ajuda nos experiemntos e à FAPESP e ao CNPq/Brasil pelo apoio financeiro.

CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DA CONSTANTE DE TEMPO (K) NA SÍNTESE DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE (G6PDH) POR PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO USANDO *Saccharomyces cerevisiae* RECOMBINANTE

Palavras-chave: glicose-6-fosfato desidrogenase, *Saccharomyces cerevisiae*, processo descontínuo alimentado.

*Artigo publicado no periódico *Biotechnology Progress*, 2003, n.19, p.320-324.

3.1. Resumo

Uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 foi utilizada para produzir glicose-6-fosfato desidrogenase em cultivo aeróbio. Os cultivos em processo descontínuo alimentado foram conduzidos em biorreator de bancada de 5 L. Estudaram-se diferentes vazões de alimentação exponencialmente crescente que variavam em função dos valores (0,2, 0,3, 0,5, 0,7 e 0,8 h⁻¹) do parâmetro *K*. A mais alta produção de G6PDH (1164 U/L) e a maior atividade específica em relação à biomassa (517 U/g) foi obtida na seguinte condição: glicose 5 g/L, YNB 0,74 g/L, micronutrientes (adenina, histidina, uracila e triptofano) 8,0 mg/L, 30 °C, inóculo 1,28 g/L, pH 5,7, agitação 400 rpm, vazão específica de ar 2,2 vvm, e *K* = 0,2 h⁻¹. Em *K* = 0,2 h⁻¹ obteve-se a maior concentração celular (2,17 g/L), produtividade em enzima (149,27 U/h) e rendimento em biomassa (0,18 g/g). O nível de G6PDH (1164 U/L) em *S. cerevisiae* geneticamente modificada foi cerca de 4,1 vezes maior que na cepa comercial.

3.2. Introdução

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (EC.1.1.1.49), a primeira enzima da via das pentoses-fosfato, catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato reduzindo NADP^+ e/ou NAD^+ . Essa via é responsável por fornecer pentoses-fosfato para a síntese de nucleotídeos, bem como NADPH e/ou NADH para biossínteses redutoras e proteção de "stress" oxidativo (COSGROVE *et al.*, 1998; ÖZER *et al.*, 2001; ROWLAND *et al.*, 1994). Esta enzima de grande interesse como reagente analítico é utilizada em vários ensaios quantitativos, entre eles, atividade de creatino-quinase no diagnóstico de doenças da musculatura esquelética cardíaca, concentração de glicose e como marcador para ensaios imunoenzimáticos (LOJUDICE *et al.*, 2001).

A *S. cerevisiae* vem sendo largamente utilizada para a expressão de vários genes para a produção de proteínas. Eucariótico, esta é hospedeiro adequado para a obtenção de altos níveis de proteínas citosólicas solúveis e secretadas. Contudo, a determinação de condições operacionais ótimas para processos fermentativos usando microrganismos recombinantes é muito complexa, isso devido à complexidade adicional no processo de segregação ou da instabilidade estrutural do plasmídeo. A perda do plasmídeo pela célula depende das suas características de construção, condições do meio e velocidade com que o microrganismo se desenvolve (SHENE *et al.*, 2000).

Processos fermentativos em regime descontínuo alimentado, conduzidos em reatores de tanque agitado, são freqüentemente utilizados pela indústria (SCHINELLE *et al.*, 1996; FURLAN *et al.*, 2001). Seu uso é especialmente vantajoso em sistemas como bioprocessos ou processos de polimerização, no quais os produtos desejados podem ser obtidos através de operações eficientes. Nestes processos, diferentes velocidades de reação entre espécies competitivas, fenômenos de inibição, etc., determinam que a adição de reagentes deveria ocorrer de acordo com fatores temporais. Cultivos de microrganismos recombinantes em regime descontínuo alimentado têm chamado a atenção, pois pode ocorrer a separação do estágio de crescimento celular da fase de expressão do gene clonado durante a fermentação (PATKAR *et al.*, 1992). O controle da vazão de alimentação de meio no regime descontínuo alimentado é muito vantajoso, pois a inibição, geralmente causada por altas concentrações de substrato e/ou produto do

metabolismo celular, é consideravelmente reduzida, ou mesmo eliminada (FURLAN *et al.*, 2001; ECHEGARAY *et al.*, 2000).

Durante o crescimento celular, altas concentrações de glicose podem causar na *S. cerevisiae* a interrupção do metabolismo puramente oxidativo, passando para o fermentativo e produzindo etanol. A limitação da oferta da glicose pode manter os valores da sua concentração abaixo do valor máximo da capacidade respiratória de cepas recombinantes, minimizando a produção de etanol (ZIGOVA *et al.*, 1999). Este álcool é indesejável, uma vez que pode inibir o crescimento celular e causar perda da fonte de carbono. Porém, altas concentrações de glicose podem ser evitadas parando, ou reduzindo, a alimentação de glicose (VAN KLEEFF *et al.*, 1998). Na prática, o controle da vazão de alimentação é comumente feito através de cálculos. Vários autores obtiveram um incremento na produtividade por usarem uma vazão exponencial de adição de substrato (VAN KLEEFF *et al.*, 1998; CARVALHO *et al.*, 1990). Uma importante vantagem da operação do regime descontínuo alimentado é que a dependência do crescimento celular, bem como a formação de produtos na composição do meio pode ser facilmente estudada. O crescimento celular e a fase de expressão do gene clonado podem ser desacoplados, possibilitando alcançar maiores produtividades, quando comparada ao cultivo descontínuo simples (PATKAR *et al.*, 1993).

Este trabalho estuda a influência de um parâmetro, a constante de tempo (K), na síntese de glicose-6-fosfato desidrogenase por *S. cerevisiae* W303-181, conduzido em processo descontínuo alimentado e vazão de alimentação exponencialmente crescente. Essa levedura geneticamente modificada carrega um plasmídeo contendo uma seqüência que codifica a G6PDH sob regulação do promotor PGK1.

3.3. Materiais e métodos

3.3.1. Materiais

Dimetilpolisiloxano, uracila, adenina, aminoácidos, NADP (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonila), β -mercaptoetanol, G6P (glicose-6-fosfato) e glicose foram obtidos da Sigma[®] (St. Louis, MO). YNB (Yeast Nitrogen Base) foi obtido da Difco (Detroit, MI). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.3.2. Microrganismo e preparo do inóculo

A *S. cerevisiae* W303-181 foi empregada em todos os cultivos. A cultura estoque era mantida a 4 °C em tubos de agar inclinado. A composição da cultura estoque, das técnicas de engenharia genética e de meio usado para a preparação do inóculo foram descritos por LOJUDICE *et al.* (4). Uma alçada da cultura estoque foi transferida para tubos contendo 10 mL de meio e incubados a 30 °C por 48 h. Os conteúdos desses tubos foram transferidos para Erlenmeyers com 100 mL de meio de cultura e incubados em agitador rotativo (NBS Gyrotory Shaker, New Brunswick Co., Edson, NJ) a 100 rpm, 30 °C por 18 h. Antes de ser estocado a -70 °C, o meio foi centrifugado (3025 g, 30 min, 6 °C), as células recolhidas e ressuspendidas em tampão acetato 0,10 mmol/L, pH 5,7 contendo 30 % (v/v) de glicerol. Para o preparo do pré-inóculo, as células foram descongeladas e incubadas (em Erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL de meio de cultivo) em agitador rotativo a 100 rpm, 30 °C por 24 h. Para o preparo do inóculo, o conteúdo daqueles frascos foi transferido para 16 Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultura (volume total = 1,6 L) e incubados em agitador rotativo a 100 rpm, 30 °C por 15 h.

3.3.4. Processo descontínuo alimentado

O inóculo (volume = 1,6 L) foi vertido em uma dorna de 5 L de um biorreator de bancada (NBSMF 105, New Brunswick Scientific Co.) contendo 0,4 L de meio de cultura (*yeast nitrogen base* (YNB) 5,55 g/L, adenina, uracila, histidina e triptofano a 60 µg/mL) e a concentração celular inicial foi de 1,28 g/L. O tempo total de cultivo foi de 14 h. A formação de espuma foi controlada através da adição de 0,5 mL de dimetilpolisiloxano quando necessário. Foi empregado um $K_L a$ de 40,5 h⁻¹, obtido através de agitação de 400 rpm e vazão específica de ar igual a 2,2 vvm. A vazão de ar foi medida e mantida constante através de um rotâmetro. O pH do meio durante o cultivo aeróbio foi medido por um eletrodo (Ingold, Woburn, MA) e mantido constante (pH 5,7) através da adição automática de solução de NaOH a 0,5 mol/L e de H₂SO₄ a 0,5 mol/L. Antes da adição do inóculo ao biorreator, a agitação, a vazão de ar e a temperatura foram ajustadas. O processo descontínuo alimentado teve início com 2,0 L (V_0) na dorna do biorreator, 1,6 L inóculo e 0,4 L de meio de cultura (fonte de nitrogênio e micronutrientes). Durante o cultivo, alimentou-se a dorna até um volume total de 3,0 L (V_f). O tempo de alimentação (T) foi de 5 h e os valores da constante de tempo K foram: 0,2, 0,3, 0,5, 0,7 e 0,8 h⁻¹. Durante o processo, o reator foi

alimentado a cada 30 min por uma solução de glicose a 15 g/L, cujo volume (V) foi calculado em função do tempo (t), de acordo com a equação 3.1.

$$(V - V_0) = (V_f - V_0) \frac{(e^{Kt} - 1)}{(e^{KT} - 1)} \quad (3.1)$$

3.3.5. Rompimento celular

Uma alíquota de 5 mL de meio fermentado foi centrifugada e o *pellet* ressuspenso em 5 mL da seguinte solução: Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5, MgCl₂ 5 mmol/L, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 0,2 mmol/L, β-mercaptoetanol 10 mmol/L, ácido aminocapróico 2 mmol/L e PMSF 1 mmol/L. Logo após, as células foram rompidas em vórtice (Phoenix AP56, Araraquara, SP), na presença de 7,45 g de pérolas de vidro (0,5 mm de diâmetro), durante 12 min. Os fragmentos celulares e as pérolas de vidro foram removidos por centrifugação (3025 g, por 30 min a 6 °C). O sobrenadante foi usado para medidas de atividade e de concentração de proteínas.

3.3.6. Métodos analíticos

A concentração celular foi determinada de acordo com ECHEGARAY *et al.* (2000); açúcares redutores totais (ART), de acordo com SOMOGYI (1952), a atividade de G6PDH de acordo com BERGMEYER (1983) e concentração de proteínas totais de acordo com LOWRY *et al.* (1951).

3.3.7. Parâmetros de cultivo

Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão de substrato em células ao final da alimentação ($Y_{X/S,fa}$), fator de conversão de substrato em enzimas ($Y_{X/P}$), fator de conversão de substrato em enzimas ao final da alimentação ($Y_{X/P,fa}$), produtividade em enzimas (Pr_{enz}), produtividade em enzimas ao final da alimentação ($Pr_{enz,fa}$), produtividade em células (Pr_X), produtividade em células ao final da alimentação ($Pr_{X,fa}$), foram calculados da seguinte forma:

$$Y_{X/S} = \Delta M_X / \Delta M_S \quad (3.2)$$

$$Y_{X/S,fa} = \Delta M_{X,fa} / \Delta M_{S,fa} \quad (3.3)$$

$$Y_{P/S} = \Delta u / \Delta M_S \quad (3.4)$$

$$Y_{P/S, fa} = \Delta u_{fa} / \Delta M_{S, fa} \quad (3.5)$$

$$Pr_X = \Delta M_X / \Delta t \quad (3.6)$$

$$Pr_{X, fa} = \Delta M_{X, fa} / \Delta t_{fa} \quad (3.7)$$

$$Pr_{enz} = \Delta u / \Delta t \quad (3.8)$$

$$Pr_{enz, fa} = \Delta u_{fa} / \Delta t_{fa} \quad (3.9)$$

Em que: $\Delta M_X = (M_{Xf} - M_{Xi})$, $\Delta M_S = (M_{Si} - M_{Sf})$, $\Delta u = (u_f - u_i)$, $\Delta t = (t_f - t_i)$, $\Delta M_{X,fa} = (M_{X,fa} - M_{Xi})$, $\Delta M_{S,fa} = (M_{Si} - M_{S,fa})$, $\Delta u_{fa} = (u_{fa} - u_i)$, $\Delta t_{fa} = (t_{fa} - t_i)$. M_i = massa celular inicial (g), M_{Xf} = massa celular final(g), $M_{X,fa}$ = massa celular ao final da alimentação (g), M_{Si} = massa de glicose inicial (g), $M_{S,fa}$ = massa de glicose ao final da alimentação (g), M_{Sf} = massa de glicose final (g), t_i = tempo inicial (h), t_f = tempo final (h), t_{fa} = tempo ao final da alimentação (h), u_i = atividade de G6PDH inicial (U), u_{fa} = atividade de G6PDH ao final da alimentação (U) e u_f = atividade de G6PDH final (U). Ainda, M_{max} = maior massa celular obtida durante o cultivo e u_{max} = maior atividade de G6PDH obtida durante o cultivo.

As velocidades específicas de crescimento celular (μ_X) e de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) foram calculadas de acordo com as equações 3.10 e 3.11, respectivamente:

$$\mu_X = \left(\frac{1}{X} \right) \left(\frac{dMX}{dt} \right) \quad (3.10)$$

$$\mu_{G6PDH} = \left(\frac{1}{X} \right) \left(\frac{du}{dt} \right) \quad (3.11)$$

3.4. Resultados e discussão

A levedura utilizada nesse trabalho foi recentemente desenvolvida por modificação genética (LOJUDICE *et al.*, 2001) e a influência da constante de tempo (K) na produção de G6PDH por processo fermentativo descontínuo alimentado foi avaliada. O processo teve duração de 14 h e a alimentação foi feita durante as primeiras 5 h. A cada adição, o volume da solução de glicose (substrato) foi calculado de acordo com a equação 3.1. A Figura 3.1 mostra o volume de solução de glicose adicionado em função do tempo de cultivo para diferentes valores de K . Como pode ser visto, o volume adicionado aumenta com o tempo, para todos os valores de K , a diferença principal consiste no perfil das curvas. No início do processo descontínuo alimentado (0-3 h), o volume da solução de glicose era mais

alta para os menores valores de K , mas após esse período o volume aumentou com o K .

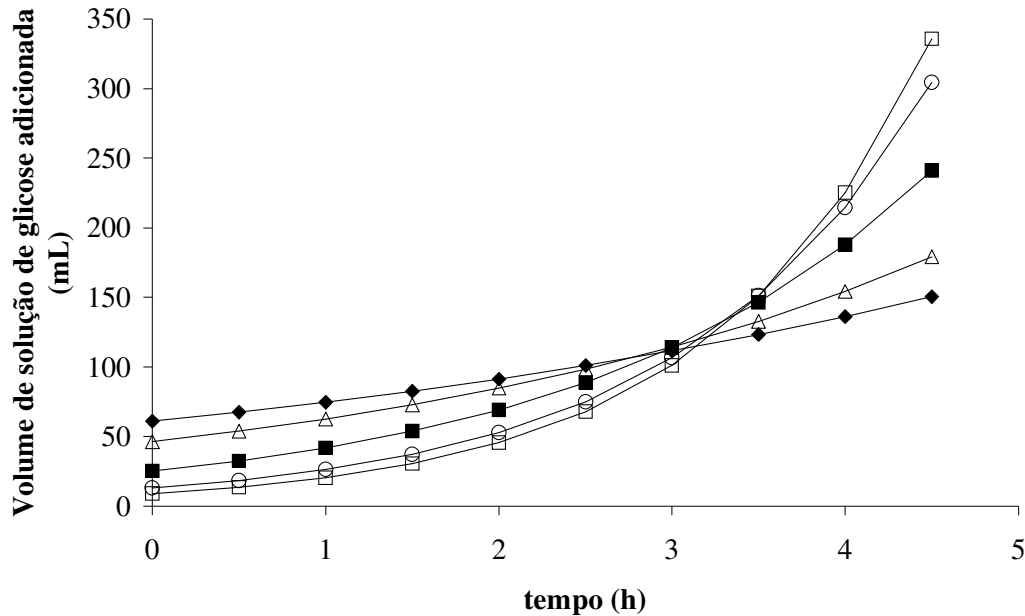


FIGURA 3.1 – Volume de solução de glicose (15 g/L) adicionada à dorna em função do tempo de cultivo para os diferentes valores de K , K (h^{-1}) = 0,2 (-◆-), $K = 0,3$ (-△-), $K = 0,5$ (-■-), $K = 0,7$ (-○-) e $K = 0,8$ (-□-). O volume de glicose adicionada foi calculado pela a equação 3.1.

Duas etapas do processo fermentativo podem ser vistas nas Figuras 3.2, 3.3 e 3.4, durante a alimentação (0-5 h) e após a alimentação (5-14 h). Embora a massa celular (Figura 3.2) aumente durante todo o processo, para todos os valores de K , o maior valor encontrado (2,1 g/L) foi obtido de $K = 0,2 \text{ h}^{-1}$. É interessante observar que embora a solução de glicose tenha sido adicionada durante as primeiras 5 h, a diferença no crescimento celular foi marcadamente notada posteriormente, isto é, após a etapa de alimentação. Este resultado mostrou que a menor variação da concentração de glicose favoreceu o crescimento celular ($\mu_x = 0,16 \text{ h}^{-1}$), provavelmente devido à menor formação de subprodutos ou algum tipo de inibição pelo substrato. O consumo total de glicose (Figura 3.3), verificado após 10 h de cultivo e conseqüentemente o melhor fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S} = 0,18 \text{ g/g}$ e $Y_{X/S,fa} = 0,25 \text{ g/g}$) obtido para $K = 0,2 \text{ h}^{-1}$ pode ser visto, durante cada etapa, na Figura 3.3. Considerando que para sistemas recombinantes, que têm um alto número de cópias do plasmídeo por célula, o crescimento do microrganismo

decrece devido à atividade do plasmídio, os fatores de conversão apresentados são muito bons quando comparados àqueles obtidos por SILVA *et al.* (2002), que produziu G6PDH de *S. cerevisiae* selvagem por processo descontínuo, encontrando valores para $Y_{X/S}$ compreendidos entre 0,14-0,21 g/g. Foi verificado que 14 h não foi tempo suficiente para consumir toda a massa de substrato para os valores de $K = 0,3, 0,5, 0,7$ e $0,8 \text{ h}^{-1}$. O cultivo conduzido em $K = 0,2 \text{ h}^{-1}$ favoreceu a produção de G6PDH (Figura 3.4). De acordo com a Tabela 3.1, o fator de conversão de glicose a G6PDH foi maior ($Y_{P/S} = 108,66 \text{ U/g}$ e $Y_{P/S,fa} = 46,24 \text{ U/g}$) que aqueles obtidos por SILVA *et al.* (2002) (3,6-10,2 U/g). Estes resultados eram esperados, pois a levedura foi geneticamente modificada para aumentar a produção da enzima. Mas, é notável o fato de a maior produção de enzima ser encontrada na etapa seguinte à alimentação. Considerando que os componentes do meio de cultivo evitaram a perda do plasmídio, a maior formação de massa e concentração celular, bem como para velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{X,max}$) favoreceu a produção da enzima ($\mu_{P,max}$).

A Tabela 3.1 resume os principais resultados dos cultivos. Como mencionado, todos os parâmetros relatados para crescimento celular, consumo de glicose e produção de enzima indicam que o $K = 0,2 \text{ h}^{-1}$ forneceu os melhores resultados, tanto durante quanto após o período de alimentação, confirmando que essa condição, implementada pela vazão de alimentação, foi favorável à *S. cerevisiae* geneticamente modificada. Este valor de K influenciou de forma significativa a produção de G6PDH, uma vez que a atividade aqui encontrada (1164 U/L) foi cerca de 4,1 vezes maior que o melhor resultado obtido por SILVA *et al.* (2002) em processo descontínuo usando *S. cerevisiae* selvagem. Além disso, a atividade enzimática específica obtida neste trabalho foi 2870 U/mg e 517 U/g, muito superiores aos encontrados por SILVA *et al.* (2002) (300 U/g e 48,5 U/g). Estes resultados indicam que o consumo da glicose, síntese de G6PDH e crescimento celular são fortemente dependentes do valor de K . Ainda, os cultivos conduzidos com $K = 0,3$ e $0,8 \text{ h}^{-1}$ favoreceram a desnaturação da enzima, pois foi verificada muito pouca atividade enzimática durante esses cultivos. Os melhores parâmetros de cultivo foram observados para $K = 0,2 \text{ h}^{-1}$. Pode-se, então, assumir que sob essa vazão de alimentação manteve-se a concentração ótima de glicose no meio.

TABELA 3.1 – Parâmetros relacionados ao processo descontínuo alimentado conduzido com *Saccharomyces cerevisiae* W303-181.^a

Parâmetros	K (h ⁻¹)				
	0,2	0,3	0,5	0,7	0,8
X _f	2,10	1,60	1,60	1,73	1,76
X _{max}	2,14	1,62	1,60	1,91	1,79
M _{x,max}	6,00	4,56	4,70	4,90	5,04
M _{xf}	6,30	4,67	4,70	5,44	5,20
μ _{x,max}	0,16	0,08	0,17	0,08	0,08
Pr _x	0,25	0,15	0,20	0,14	0,17
Pr _{x, fa}	0,44	0,19	0,35	0,27	0,25
M _{sf}	0,11	1,55	4,56	3,05	3,43
U _f	1085	255	702	321	196
U _{max}	1164	341	817	420	462
u _f	3143	728	2063	908	558
u _{max}	3422	1151	2437	1053	1158
G6PDH/g _{prot}	2870	1140	2570	1010	600
G6PDH/g _{cel}	517	169	439	185	111
μ _{p,max}	59,73	48,77	37,70	36,97	12,86
Pr _{enz}	149	-25,61	44,94	17,72	-25,70
Pr _{enz,fa}	81,94	12,84	18,27	10,89	26,93
Y _{X/S}	0,18	0,11	0,13	0,14	0,14
Y _{X/S,fa}	0,25	0,14	0,13	0,21	0,16
Y _{P/S}	108,66	-18,74	29,43	17,52	-22,46
Y _{P/S,fa}	46,24	9,107	7,02	8,51	17,65

Em que:

X _f	Concentração celular final (g/L)
X _{max}	Concentração celular máxima (g/L)
M _{x,max}	Massa celular máxima (g)
M _{xf}	Massa celular final (g)
μ _{x,max}	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h ⁻¹)
Pr _x	Produtividade em células (g/h)
Pr _{x, fa}	Produtividade em enzima ao final da alimentação (g/h)
M _{sf}	Massa final de glicose (g)
U _f	Atividade de G6PDH final por litro (U/L)
U _{max}	Atividade máxima de G6PDH por litro (U/L)
u _f	Atividade de G6PDH final (U)
u _{max}	Atividade máxima de G6PDH (U)
G6PDH/g _{prot}	Atividade de G6PDH em relação a proteínas (U/g)
G6PDH/g _{cel}	Atividade de G6PDH em relação a células (U/g)
μ _{p,max}	Velocidade específica máxima de produção (U/gh)
Pr _{enz}	Produtividade em enzimas (U/h)
Pr _{enz,fa}	Produtividade em enzimas ao final da alimentação (U/h)
Y _{X/S}	Fator de conversão de substrato em células (g/g)
Y _{X/S,fa}	Fator de conversão de substrato em células ao final da alimentação (g/g)
Y _{P/S}	Fator de conversão de substrato em enzimas (U/g)
Y _{P/S,fa}	Fator de conversão de substrato em enzimas ao final da alimentação (U/g)

^a A adição de substrato (glicose) com vazão exponencialmente crescente em função dos valores da constante de tempo (K) foram calculados de acordo com a equação 3.1. Os demais parâmetros foram calculados usando as equações 3.2 a 3.11.

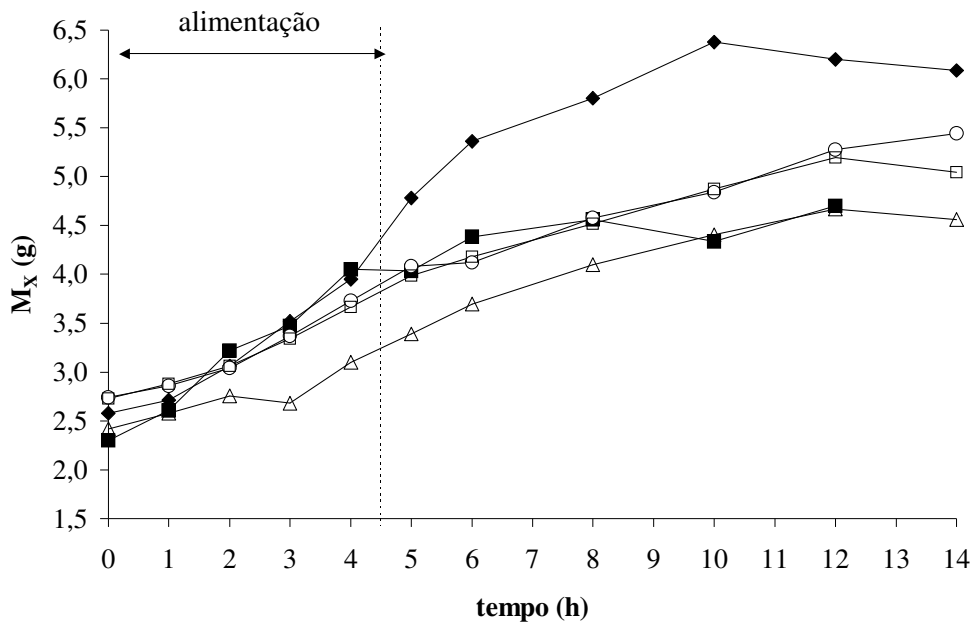


FIGURA 3.2 – Massa celular (M_x) em função do tempo de cultivo para os diferentes valores da constante de tempo K (h^{-1}) = 0,2 (-◆-), $K = 0,3$ (-△-), $K = 0,5$ (-■-), $K = 0,7$ (-○-) e $K = 0,8$ (-□-).

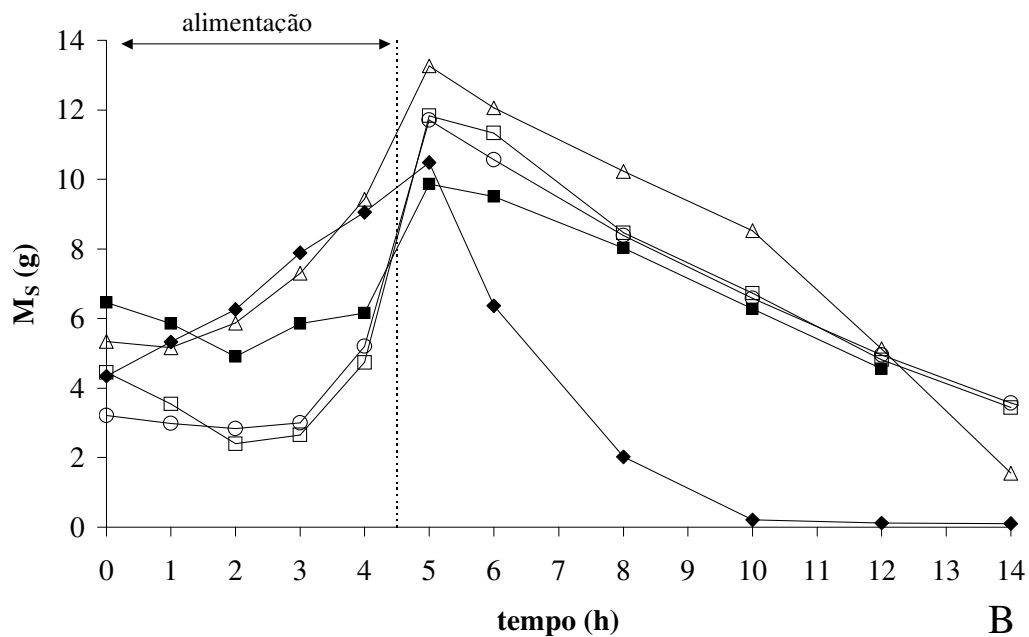


FIGURA 3.3 – Massa de glicose (M_s) em função do tempo de cultivo para os diferentes valores da constante de tempo K (h^{-1}) = 0,2 (-◆-), $K = 0,3$ (-△-), $K = 0,5$ (-■-), $K = 0,7$ (-○-) e $K = 0,8$ (-□-).

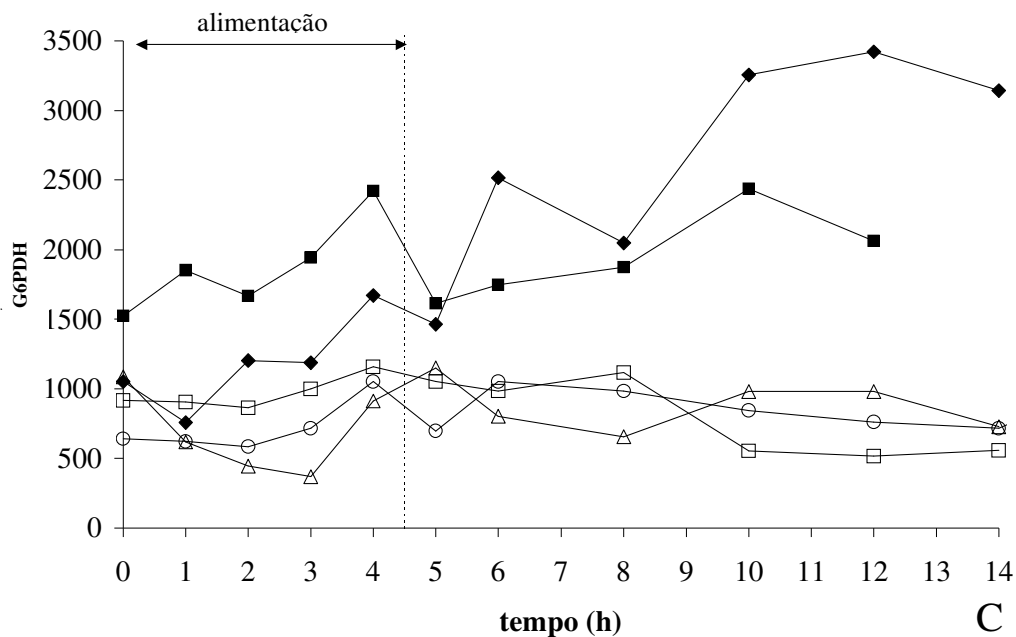


FIGURA 3.4 – Atividade de G6PDH em função do tempo de cultivo para os diferentes valores da constante de tempo K (h^{-1}) = 0,2 (-◆-), $K = 0,3$ (-△-), $K = 0,5$ (-■-), $K = 0,7$ (-○-) e $K = 0,8$ (-□-).

3.5. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que o mais alto nível síntese de G6PDH por *S. cerevisiae* W303-181 ocorreu em $K = 0,2 \text{ h}^{-1}$. A síntese da enzima está relacionada ao crescimento celular e o plasmídeo não é perdido durante o cultivo. Além disso, as condições de cultivo da *S. cerevisiae* geneticamente modificada mostraram uma atividade enzimática de 4,1 vezes maior que para a levedura selvagem, enquanto a atividade específica foi 9,6 (relacionado a proteínas totais) e 10,6 (relacionado à massa celular) vezes maiores. Essa cepa contém um plasmídeo regulado por um forte promotor, demonstrado ser uma fonte em potencial de G6PDH. Os resultados apresentados também sugerem que o custo de produção da G6PDH poderia ser significativamente reduzido pela utilização de cepas contendo níveis maiores de G6PDH que aquelas cepas disponíveis no mercado.

3.6. Agradecimentos

Â. S. M. Miguel agradece o recebimento de auxílio da FAPESP/Brasil. Os autores agradecem a Dante Augusto Morais pela assistência nos experimentos, à Prof^a. Carla Columbano Oliveira que conduziu a transformação da levedura *S. cerevisiae* W303-181 e à FAPESP e ao CNPq/Brasil pelo apoio financeiro.

CAPÍTULO IV

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE MICRONUTRIENTES NO MEIO DE CULTIVO DE *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 PARA A SÍNTESE DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE

Palavras-chave: glicose-6-fosfato desidrogenase, *Saccharomyces cerevisiae*, micronutrientes, metodologia de superfície de resposta.

4.1. Resumo

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) desempenha um importante papel na manutenção dos níveis de NADPH, para biossínteses redutoras, além de pentoses, para síntese de ácidos nucleicos. Esta enzima de grande interesse como reagente analítico é utilizada em vários ensaios quantitativos, entre eles, determinação da concentração de glicose, atividade de creatino-quinase e hexoquinase. A levedura *S. cerevisiae* W303-181 que carrega um plasmídeo contendo uma seqüência que codifica a G6PDH sob regulação do promotor PGK1 foi usada para a síntese de G6PDH. A síntese de produtos de genes clonados é influenciada por fatores genéticos e ambientais, incluindo a estabilidade e o número de cópias do plasmídeo, força do promotor, velocidade de crescimento e composição do meio de cultivo. O objetivo desse trabalho foi avaliar as concentrações ótimas dos micronutrientes (adenina, histidina, triptofano e uracila) no meio de cultivo para a síntese da enzima. Os micronutrientes foram empregados em diferentes concentrações (0, 20, 40, 60 e 80 mg/L). As fontes de carbono e nitrogênio (glicose a 20 g/L e YNB a 7,4 g/L) foram fixadas. Os cultivos foram conduzidos em agitador rotativo a 100 rpm, 30 °C por 18 h. A metodologia de superfície de resposta foi usada para a análise dos resultados. As análises estatísticas mostraram que a concentração de micronutrientes apresenta grande influência na formação de biomassa e na síntese da enzima. Empregando 68 mg/L adenina, 47 mg/L uracila, 80 mg/L triptofano e 66 mg/L histidina no meio de cultivo, aumentou-se 3,2 vezes a atividade específica de G6PDH por quando comparada com o teste no qual as concentrações desses micronutrientes era 20 mg/L.

4.2. Introdução

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (EC.1.1.1.49), a primeira enzima da via das pentoses-fosfato, catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato reduzindo NADP^+ e/ou NAD^+ . Essa via é responsável por fornecer pentoses-fosfato para a síntese de nucleotídeos, bem como NADPH e/ou NADH para biossínteses redutoras e proteção de *stress* oxidativo (COSGROVE *et al.*, 1998; ÖZER *et al.*, 2001; ROWLAND *et al.*, 1994). Esta enzima de grande interesse como reagente analítico é utilizada em vários ensaios quantitativos, entre eles, atividade de creatino-quinase no diagnóstico de doenças da musculatura esquelética cardíaca (BERGMEYER, 1983), determinação da concentração de glicose (CHATEL *et al.*, 1996, MORI *et al.*, 1999), frutose, manose e ATP (BOROSS *et al.*, 1987). Tem aplicação na composição de biossensores para a detecção de fosfatos (PARELLADA *et al.*, 1998) e de glicose-6-fosfato sérica (BASSI *et al.*, 1999), e, ainda, pode ser usado como marcador para reações de hibridização de ácidos nucléicos (BALAGUER, *et al.*, 1989). A G6PDH é encontrada em células animais e vegetais, além de microrganismos, dentre os quais destaca-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SILVA *et al.*, 2002).

Há uma perspectiva real de redução de custos no processo de produção de enzimas em função do desenvolvimento de cepas superprodutoras obtidas por manipulação genética (LOJUDICE *et al.*, 2001).

A síntese de produtos de gene clonado é influenciada por fatores genéticos e ambientais, incluindo estabilidade e número de cópias do plasmídio, força do promotor, velocidade específica de crescimento celular e composição do meio de cultivo (CHIRUVOLU *et al.*, 1996). A determinação de condições operacionais ótimas para processos fermentativos com microrganismos recombinantes é muito difícil, isso devido à complexidade adicional no processo de segregação ou da instabilidade estrutural do plasmídio. A perda do plasmídio pela célula depende das suas características de construção, condições do meio e velocidade com que o microrganismo se desenvolve (SHENE *et al.*, 2000).

Muitas células recombinantes necessitam de um meio de cultivo especial para que seja evitada a perda do plasmídio. Todavia, a composição desse meio tem um papel importante no desenvolvimento de processos fermentativos (CHIRUVOLU *et al.*, 1996). O enriquecimento do meio de cultivo permite alcançar altos rendimentos em biomassa e decréscimo da proteólise do produto, o que levaria a um substancial

aumento da produtividade de proteínas recombinantes secretadas (DHURJATI, COPELLA, 1989; GABRIELSEN, *et al.*, 1990). Nesse sentido, WANG, Da SILVA, (1993) verificaram um aumento na síntese e secreção de invertase, via meio enriquecido, em uma cepa de *S. cerevisiae* recombinante. Isso, talvez, seja devido ao suprimento adequado de energia e de precursores para o crescimento celular e síntese protéica (CHOI *et al.*, 1996). CHEN *et al.* (1993), ao estudarem a produção de elafin em *S. cerevisiae* recombinante, verificaram que a suplementação do YNB com casaminoácido permitiu alcançar os maiores rendimentos em biomassa, porém, não era garantida a obtenção de altos rendimentos da biomolécula secretada. Esse incremento do rendimento celular poderia ser interessante quando se trabalha com produtos intracelulares.

A levedura *S. cerevisiae* W303-181, recentemente modificada por LOJUDICE *et al.* (2001), carrega um plasmídeo contendo uma seqüência que codifica a G6PDH sob regulação do promotor PGK1 e em marcador de Leu2. Essa cepa é auxotrófica para alguns micronutrientes (adenina, histidina, triptofano e uracila) e, portanto, estes devem estar presentes no meio de cultivo.

A Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) consiste em um sistema de modelagem empírico para avaliar a relação entre um grupo de variáveis que podem ser controladas experimentalmente e observar suas respostas (RODRIGUES *et al.*, 2003). Dessa forma, a MSR é largamente utilizada para otimizar diferentes processos biotecnológicos (BOCCHINI *et al.*, 2002). A MSR foi empregada com sucesso para a otimização da produção de bacteriocina (LI *et al.*, 2002), para a obtenção de xilanase (BOCCHINI *et al.*, 2002) e para a produção de xilitol (RODRIGUES *et al.*, 1998; RODRIGUES *et al.*, 2003).

Com o objetivo de melhorar a produção da G6PDH, foi proposto esse estudo de determinação da concentração ótima de micronutrientes (adenina, histidina, triptofano e uracila) no meio de cultivo. Avaliou-se a influência da concentração desses micronutrientes, em cultivos de *S. cerevisiae* W303-181, no crescimento celular e produção de G6PDH e, usando a MSR, foi determinada a concentração ótima de micronutrientes para a obtenção da maior atividade enzimática de G6PDH em relação ao teor de proteínas totais.

4.3. Materiais e métodos

4.3.1. Materiais

A glicose, adenina, histidina, uracila, triptofano, NADP⁺, PMSF, β -mercaptoetanol, glicose-6-fosfato foram obtidos da Sigma[®] (St. Louis, MO, EUA). O YNB (*Yeast nitrogen base*) foi obtido da Difco[®] (Detroit, MI, EUA). Os demais reagentes utilizados nesse trabalho foram de grau analítico. Foram utilizados dois agitadores rotativos (1^o: *Controlled Environment Incubator Shaker*, New Brunswick Scientific Co., Madison, NJ, EUA; 2^o: TE-420, Tecnal, Piracicaba, SP), agitador de tubos vórtice (Phenix AP 56, Phenix, Araraquara, SP), centrífuga refrigerada (BR4i, Jouan, St. Herblain, França) e espectrofotômetro (DU 640, Beckman, Fullerton, CA, EUA).

4.3.2. Microrganismo e preparo do inóculo

A levedura *S. cerevisiae* W303-181 foi empregada nos cultivos e carrega um plasmídeo contendo uma seqüência que codifica a G6PDH sob regulação do promotor PGK1. A cultura estoque foi mantida a -70 °C em solução tampão acetato (0,1 mol/L, pH 5,7) contendo glicerol (30% v/v) como crioprotetor. O meio de cultivo utilizado para o crescimento do inóculo era preparado com meio tamponado (tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,7) e era composto por glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina, histidina, uracila e triptofano 20 mg/L. O inóculo foi obtido após ativação celular e cultivo do pré-inóculo. Na fase de ativação celular, 900 μ L de suspensão descongelada de leveduras foi adicionada a 9,1 mL de meio de cultivo em um Erlenmeyer de 50 mL e incubado em agitador rotativo (New Brunswick Scientific Co.) a 100 rpm, 30 °C por 24 h. O pré-inóculo foi preparado após transferência de 10 mL da suspensão obtida na etapa de ativação celular para Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL de meio de cultivo e incubação em agitador rotativo (New Brunswick Scientific Co.) a 100 rpm, 30 °C por 24 h. O inóculo foi preparado transferindo-se 10 mL da suspensão obtida na etapa de pré-inóculo para Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL de meio de cultivo e incubados em agitador rotativo (New Brunswick Scientific Co.) a 100 rpm, 30 °C por 16 h. Após esse período, a suspensão de leveduras foi centrifugada a 3025 g, a 6 °C por 30 min, o sobrenadante foi

descartado e a massa celular foi utilizada para inocular os Erlenmeyers contendo diferentes concentrações de micronutrientes.

4.3.3. Cultivos em agitador rotativo

Os cultivos foram conduzidos em Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL de meio de cultivo e concentração celular inicial de 1,12 g/L. O cultivo foi realizado em agitador rotativo (TE-420, Tecnal) a 100 rpm, 30°C por 18 h. O meio de cultivo era tamponado (tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,7) e composto por glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L e diferentes concentrações dos micronutrientes adenina, histidina, triptofano e uracila (0, 20, 40, 60 e 80 mg/L), conforme planejamento experimental adotado (item 4.3.4.)

4.3.4. Planejamento experimental e análise estatística

Foi usado a matriz de planejamento fatorial fracionário 2^{4-1} (BOX *et al.*, 1978) para avaliar a influência da concentração de micronutrientes (variáveis independentes) nas variáveis dependentes (Tabela 4.1 – cultivos 1 a 8). Nessa Tabela 4.1 podem-se observar os valores codificados (X_1 , X_2 , X_3 e X_4) das variáveis independentes que correspondem à concentração de adenina, triptofano, histidina e uracila no meio de cultivo, respectivamente. Na intenção de ampliar a faixa de valores codificados para as variáveis independentes estudadas, o planejamento experimental foi complementado com os níveis -2 e $+2$ para cada uma das variáveis, fixando as demais nos valores do ponto central (Tabela 4.1 – cultivos 9 a 16). Com o intuito de verificar qualquer efeito de limitação da atividade específica de G6PDH por parte dos micronutrientes, foi realizado um cultivo no qual as variáveis independentes assumissem o valor máximo ($+2$) (Tabela 4.1 – cultivo 17). Os cultivos 18 a 22 são repetições do ponto central (valores centrais para as variáveis independentes) que foram utilizados para determinar a variância experimental. Esses cultivos foram usados, ainda, para a análise de regressão multivariável (RANGEL-YAGUI *et al.*, 2004).

Considerando o estudo da atividade específica de G6PDH, em relação ao teor de proteínas totais, a equação 4.1 foi escolhida para a otimização:

$$\text{G6PDH/g}_{\text{prot}} = a + \sum_i b_i x_i + \sum_i c_i x_i^2 + \sum_{i \neq j} d_{ij} x_i x_j \quad (4.1)$$

Foi proposto que, para estimar a resposta da variável escolhida (atividade específica de G6PDH em relação ao teor de proteínas totais), como consequência da variação dos valores codificados X_1 , X_2 , X_3 e X_4 . Nesta equação, “i” representa a variável independente, “ij” representa suas interações, “a” é o intercepto, “ b_i ” são os coeficientes lineares, “ c_i ” os coeficientes quadráticos e “ d_{ij} ” são as interações entre os coeficientes. Para os valores das variáveis independentes, o nível de significância de $p < 0,15$ foi considerado para os coeficientes linear (b_i) e quadrático (c_i) (ECHEGARAY *et al.*, 2000), não sendo consideradas as interações, pois, devido ao número de condições experimentais estudadas não era possível testar todas simultaneamente. Entretanto, a análise de variância das regressões foi feita considerando aceitável um erro menor ou igual a 5% ($p < 0,05$). A equação obtida nessa regressão foi usada para calcular os níveis otimizados das variáveis independentes que maximizam $G6PDH/g_{prot}$ (atividade específica de G6PDH). Os cultivos de confirmação dos níveis das variáveis independentes otimizados foram realizados (Tabela 4.1 – cultivos 23 a 31).

4.3.5. Rompimento celular

Uma alíquota de 5 mL de meio fermentado foi centrifugada e o *pellet* ressuspenso em 5 mL da seguinte solução: Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5, $MgCl_2$ 5 mmol/L, EDTA 0,2 mmol/L, β -mercaptoetanol 10 mmol/L e ácido aminocaprílico 2 mmol/L. Logo após, as células foram rompidas em vórtice, na presença de 7,45 g de pérolas de vidro (0,5 mm de diâmetro), durante 24 min. Os tubos foram mantidos resfriados através de banho de gelo e alternava-se, a cada 30 s, a operação de agitação em vórtice e resfriamento em banho de gelo. Os fragmentos celulares e as pérolas de vidro foram removidos por centrifugação (3025 g, por 30 min. a 6 °C). O sobrenadante foi usado para medidas de atividade enzimática e de teor de proteínas totais.

4.3.6. Métodos analíticos e parâmetros de cultivo

A concentração celular foi determinada utilizando-se de uma curva de calibração que correlaciona absorvância com a massa seca. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (DU 640, Beckman) a 600 nm, utilizando-se água destilada como análise no branco. A concentração de glicose foi feita pela detecção de açúcares redutores totais (ART), descrita por SOMOGYI (1952). A atividade

enzimática de G6PDH foi feita de acordo com BERGMEYER *et al.* (1983). O teor de proteínas totais foi feito de acordo com LOWRY *et al.* (1951).

4.3.7. Parâmetros de cultivo

O parâmetro $G6PDH_{prod}$ (enzima produzida) (U/L) foi determinado pela variação da atividade enzimática de G6PDH inicial e final, de acordo com a equação 4.2. A atividade específica por proteína ($G6PDH/g_{prot}$) (U/g) foi determinada dividindo-se a atividade de G6PDH pela concentração protéica, de acordo com a equação 4.3. As velocidades específicas de crescimento celular e de produção de G6PDH foram calculadas de acordo com as equações 4.4 e 4.5, respectivamente.

$$G6PDH_{prod} = U_i - U_f \quad (4.2)$$

$$G6PDH_{espec} = U_t / Prot \quad (4.3)$$

$$\mu_X = \left(\frac{1}{X} \right) \left(\frac{dX}{dt} \right) \quad (4.4)$$

$$\mu_{G6PDH} = \left(\frac{1}{X} \right) \left(\frac{dU}{dt} \right) \quad (4.5)$$

Em que: $\Delta X = (X_f - X_i)$, $\Delta U = (U_f - U_i)$ e $\Delta t = (t_f - t_i)$. X_i é a concentração celular inicial (g/L), X_f é a concentração celular final (g/L), t_i é o tempo inicial (h), t_f é o tempo final (h), U_i é a atividade de G6PDH no início do cultivo (U/L), U_f é a atividade de G6PDH no final do cultivo (U/L), U_t é a atividade de G6PDH no momento de coleta da amostra (U/L) e $Prot$ é a concentração de proteínas no momento de coleta da amostra (g/L).

4.4. Resultados e discussão

Lojudice *et al.* (2001) desenvolveram uma cepa de levedura geneticamente modificada, a *S. cerevisiae* W303-181, que expressa em grandes quantidades a enzima G6PDH. O meio de cultivo empregado por esses autores era composto por glicose 20 g/L, YNB (*Yeast Nitrogen Base*) 7,4 g/L e 20 mg/L de micronutrientes (adenina, histidina, triptofano e uracila). Nesse trabalho, procurou-se melhorar a produção da G6PDH através da suplementação do meio de cultivo com micronutrientes. A fonte de nitrogênio empregada (YNB) apresenta em sua

composição 1,5 mg/g de histidina, 3,0 mg/g de triptofano e não contém adenina e uracila. Foram realizados cultivos em agitador rotativo com a levedura *S. cerevisiae* W303-181, o número de cultivos foi determinado por uma matriz fatorial 2^{4-1} , cujos valores codificados variavam entre -1 e +1, que foi complementada com valores codificados de -2 e +2 (Tabela 4.1).

Cada cultivo resultou de uma combinação entre os níveis codificados e os micronutrientes utilizados. Os cultivos tiveram início com 1,12 g/L de concentração celular e, como se pode verificar na Tabela 4.1 que, após 18 h, as concentrações celulares aumentaram. Contudo, o fator limitante para esse aumento foi a combinação entre os diferentes níveis codificados e micronutrientes utilizados.

No cultivo 9 (sem suplementação de adenina) e 15 (sem suplementação de uracila), foi observada pouca formação de biomassa, 1,27 e 1,45 g/L, respectivamente. No cultivo 1, condição na qual cada um dos micronutrientes foi suplementado com 20 mg/L, foi observada uma baixa formação de biomassa (1,70 g/L) comparada aos cultivos 18 a 22, do ponto central (suplementado com 40 mg/L para cada micronutriente) (3,58 g/L de concentração celular média). Verificou-se que nos cultivos 1, 9 e 15, nos quais houve menor formação de biomassa (1,70, 1,27 e 1,45 g/L, respectivamente), após 18 h de cultivo, ainda havia glicose residual (5,74, 8,98 e 6,16 g/L, respectivamente), enquanto que para os demais cultivos a concentração residual de glicose foi desprezível (abaixo de 0,08 g/L). Portanto, a suplementação com adenina e uracila mostrou-se essencial pra a formação de biomassa. Isso pode ser confirmado através dos cultivos 9 e 15 (nos quais não houve suplementação com adenina e uracila, respectivamente) que apresentaram os menores valores de crescimento celular e não consumiram totalmente a glicose. Os cultivos 1 e 7, ambos suplementados com 20 mg/L de adenina e uracila, apresentaram concentrações celulares muito diferentes, 1,70 g/L e 3,20 g/L, o que poderia sugerir que não existiria influência da adenina e uracila no crescimento celular. Contudo, trata-se de um organismo auxotrófico para os quatro micronutrientes estudados, portanto, devem existir diferentes interações entre eles que levem à diferentes respostas em relação à formação de biomassa. Dessa forma, mesmo suplementado com 20 mg/L de adenina e uracila, a elevada concentração celular apresentada pelo cultivo 7 é resultado, provavelmente, de uma interação dessa concentração de adenina e uracila com a maiores concentrações de histidina e de triptofano (60 mg/L).

TABELA 4.1 - Planejamento experimental, experimentos de confirmação e resultados dos cultivos conduzidos com *S. cerevisiae* W303-181 para a produção de glicose-6-fosfato desidrogenase.

Experimento	Adenina (mg/L)	X ₁	Triptofano (mg/L)	X ₂	Histidina (mg/L)	X ₃	Uracila (mg/L)	X ₄	X _f (g/L)	S _f (g/L)	Prot (g/L)	G6PDH _{prod} (U/g)	G6PDH/g _{prot} (U/L)
1	20	-1	20	-1	20	-1	20	-1	1.70	5.74	0,45	166	2489
2	60	+1	20	-1	20	-1	60	+1	3.52	0.05	0,63	2178	2581
3	20	-1	60	+1	20	-1	60	+1	2.89	0.05	0,69	2344	5037
4	60	+1	60	+1	20	-1	20	-1	3.55	0.05	0,61	1577	4839
5	20	-1	20	-1	60	+1	60	+1	2.93	0.05	0,67	975	4216
6	60	+1	20	-1	60	+1	20	-1	3.64	0.05	0,62	2841	2941
7	20	-1	60	+1	60	+1	20	-1	3.20	0.05	0,74	3069	6188
8	60	+1	60	+1	60	+1	60	+1	3.63	0.05	0,63	2924	5493
9	0	-2	40	0	40	0	40	0	1.27	8.98	0,53	809	6222
10	80	+2	40	0	40	0	40	0	3.73	0.05	0,67	2758	3404
11	40	0	0	-2	40	0	40	0	2.96	0.05	0,64	2592	5603
12	40	0	80	+2	40	0	40	0	3.48	0.06	0,50	1784	5606
13	40	0	40	0	0	-2	40	0	2.54	0.08	0,52	311	5558
14	40	0	40	0	80	+2	40	0	3.52	0.05	0,61	2717	2513
15	40	0	40	0	40	0	0	-2	1.45	6.16	0,42	-601	6086
16	40	0	40	0	40	0	80	+2	3.55	0.05	0,56	1348	938
17	80	+2	80	+2	80	+2	80	+2	3.67	0.07	0,65	3007	4185
18	40	0	40	0	40	0	40	0	3.47	0.05	0,64	3090	6158
19	40	0	40	0	40	0	40	0	3.59	0.04	0,67	1016	6384
20	40	0	40	0	40	0	40	0	3.54	0.05	0,60	3215	6284
21	40	0	40	0	40	0	40	0	3.62	0.05	0,65	2717	6187
22	40	0	40	0	40	0	40	0	3.66	0.07	0,62	3277	6573
23	68	+1,4	80	+2	66	+1,3	47	+0,36	3,39	0,06	0,47	3007	7713
24	68	+1,4	80	+2	66	+1,3	47	+0,36	3,48	0,06	0,45	3005	8052
25	68	+1,4	80	+2	66	+1,3	47	+0,36	3,40	0,06	0,48	3229	8015
26	68	+1,4	120	+4	66	+1,3	47	+0,36	3,54	0,06	0,49	2825	7026
27	68	+1,4	120	+4	66	+1,3	47	+0,36	3,56	0,05	0,48	2941	7414
28	68	+1,4	120	+4	66	+1,3	47	+0,36	3,47	0,07	0,47	3159	8035
29	68	+1,4	140	+5	66	+1,3	47	+0,36	3,49	0,06	0,53	3532	7830
30	68	+1,4	140	+5	66	+1,3	47	+0,36	3,76	0,06	0,53	2877	6594
31	68	+1,4	140	+5	66	+1,3	47	+0,36	3,56	0,07	0,50	3509	8254

Em que: X₁, X₂, X₃ e X₄ representam os valores codificados da concentração de adenina, triptofano, histidina e uracila respectivamente, além da concentração celular final (X_f), concentração final de glicose (S_f), concentração de proteínas (Prot), atividade de G6PDH produzida (G6PDH_{prod}) e atividade específica de G6PDH (G6PDH/g_{prot}).

A influência do triptofano e histidina podem ser observadas mais facilmente nos cultivos 11 (sem suplementação com triptofano) e 13 (sem suplementação com histidina) que apresentaram, após 18 h, concentrações celulares de 2,96 e 2,54 g/L, respectivamente, valores esses que são menores que os do ponto central (3,58 g/L de concentração celular média). A diferença entre os cultivos 11, 13 e os do ponto central (18 a 22) é somente na concentração de triptofano para o 11 e histidina para o 13. Assim, uma vez que esses cultivos apresentem 40 mg/L de adenina e uracila, o triptofano e histidina que constituem do YNB supriu, em parte, a carência da levedura por esses nutrientes. Ainda, a maior concentração celular (3,67 g/L) ocorreu no cultivo 17, condição em que todos os micronutrientes foram suplementados a 80 mg/L (nível +2), confirmando que o aumento da concentração dos quatro micronutrientes no meio de cultivo é possível aumentar a formação de biomassa.

Com relação à influência dos micronutrientes na produção de G6PDH, no cultivo 1 foi verificada uma produção de G6PDH (166 U/L), quando comparado com o ponto central (cultivos 18 a 22) (média de 2663 U/L). Analisando-se os cultivos 9 (sem suplementação com adenina) e 15 (sem suplementação de uracila), observou-se que para o primeiro ocorreu uma pequena produção de enzima (809 U/L) quando comparado com o ponto central, para o segundo, ocorreu desnaturação da enzima, uma vez que foi encontrado um valor negativo para a produção de enzimas (-600 U/L), indicando que no início do cultivo a atividade enzimática era maior que a apresentada após 18 h. Portanto, esses cultivos (9 e 15) mostraram que a adenina e uracila são essenciais para a célula no processo de síntese da enzima. O cultivo 13 (sem suplementação de histidina) mostrou uma produção de G6PDH (311 U/L) menor que para o ponto central (2663 U/L), portanto, é evidente a importância da suplementação de histidina no meio de cultivo. A princípio, a suplementação de histidina não demonstrou importância para a produção da G6PDH, pois se pode observar nos cultivos 11 (sem suplementação de triptofano) e 12 (suplementação com 80 mg/L) produção de enzima de 2592 e 1783 U/L, respectivamente. O triptofano presente na composição do YNB possivelmente supriu, em parte, a carência da levedura por essa molécula. O cultivo 17, no qual cada um dos micronutrientes foi suplementado a 80 mg/L, apresentou produção de G6PDH (3007 U/L) maior do que a produção enzimática média (2663 U/L) do ponto central,

confirmando que com o aumento da concentração dos quatro micronutrientes seria possível aumentar a produção enzimática.

A enzima G6PDH é de interesse comercial, pois é utilizada em diversos setores como análises clínicas como reagente analítico (BOROSS *et al.*, 1987; BERGMEYER *et al.*, 1983, CHATEL *et al.*, 1996). A G6PDH é uma proteína intracelular, portanto, é necessário um processo de rompimento para extraí-la, obtendo-se um homogeneizado celular repleto de impurezas como proteínas contaminantes. O processo de recuperação dessa enzima teria início com esse homogeneizado. Os processos de recuperação de bioprodutos têm por objetivo recuperar e purificar um produto biotecnológico através de operações unitárias que sucedem o cultivo microbiano (KILIKIAN, PESSOA-JR, 2001). O grau de pureza do bioproduto depende da sua aplicação final (KILIKIAN, PESSOA-JR, 2001), há casos em que a recuperação, concentração e purificação necessitam de várias etapas, as quais podem ser limitadas por aspectos econômicos (SCOPES, 1994). Portanto, a relação entre proteína alvo (G6PDH) e proteínas contaminantes é importante para os processos de recuperação de bioprodutos. Dessa forma, o aumento da atividade específica de G6PDH poderá implicar em maiores rendimentos. Para tanto, usou-se a metodologia de superfície de resposta para tratar os dados de atividade específica dos cultivos, gerando a seguinte equação 6.

$$G6PDH/g_{prot} = 5914 + 722 X_1 + 330 X_2 + 792 X_3 + 525 X_4 - 252 X_1^2 - 303 X_3^2 - 737 X_4^2$$

(4.6)

Para a resposta $G6PDH/g_{prot}$, verificou-se que todas as variáveis independentes (X_1 , X_2 , X_3 e X_4) interferem de forma significativa sobre ela. $G6PDH/g_{prot}$ é função quadrática das variáveis X_1 , X_3 e X_4 , os coeficientes dessas variáveis ao quadrado são negativos, indicando que ocorre um aumento de $G6PDH/g_{prot}$ à medida que se eleva o valor de cada variável até um determinado ponto, a partir do qual $G6PDH/g_{prot}$ começa a diminuir a cada incremento das variáveis independentes estudadas. Esse comportamento pode ser observado através das curvas de nível da resposta $G6PDH/g_{prot}$ em função de X_1 e X_4 (Figura 4.1) e de X_3 (Figura 4.2). As Figuras 4.1 e 4.2 foram construídas a partir da equação 4.6. A Figura 4.1 mostra curvas de nível na qual pode ser observada a influência da concentração de adenina (X_1) e de uracila (X_4) na atividade específica ($G6PDH/g_{prot}$).

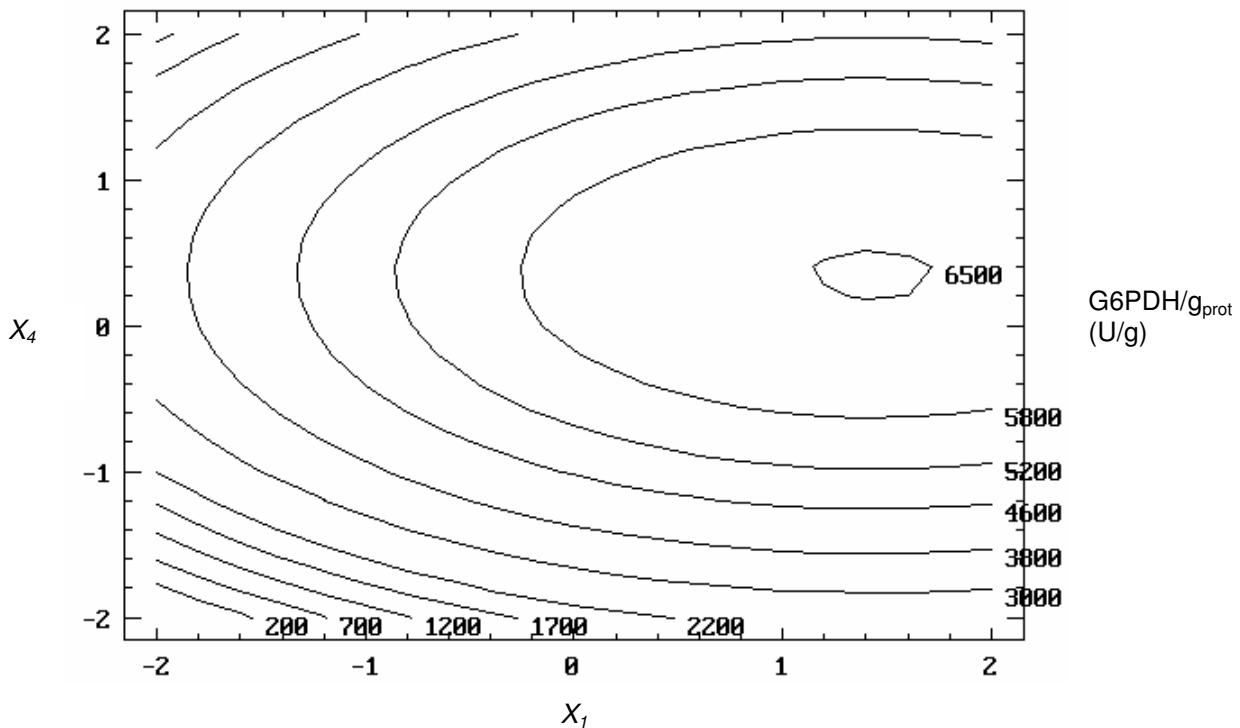


FIGURA 4.1. Curva de nível da atividade específica de G6PDH ($G6PDH/g_{prot}$) em função dos valores codificados de concentração de adenina (X_1) e uracila (X_4).

Pode ser vista na figura 4.1, uma região que apresenta o máximo valor alcançado pela atividade específica. O maior valor de $G6PDH/g_{prot}$ ocorreu quando os níveis de X_1 e de X_4 foram 1,4 e 0,36, o que corresponde a 68 e 47 mg/L, respectivamente. A figura 4.2 também mostra curvas de nível na qual pode ser observada a influência da concentração de triptofano (X_2) e de histidina (X_3) na atividade específica ($G6PDH/g_{prot}$). Como $G6PDH/g_{prot}$ é função quadrática de X_3 , foi possível determinar o valor dessa variável no qual é máximo o valor de $G6PDH/g_{prot}$, este foi de 1,3, que corresponde a 66 mg/L. A variável X_2 , cujo coeficiente é positivo, apresenta uma interferência linear na resposta $G6PDH/g_{prot}$, portanto, aumenta a cada incremento dessa variável. Em função desses resultados, novos cultivos (23 a 31) foram propostos. Estes ensaios foram conduzidos com níveis já determinados para adenina, histidina e uracila e níveis maiores de triptofano (+2, +4 e +5).

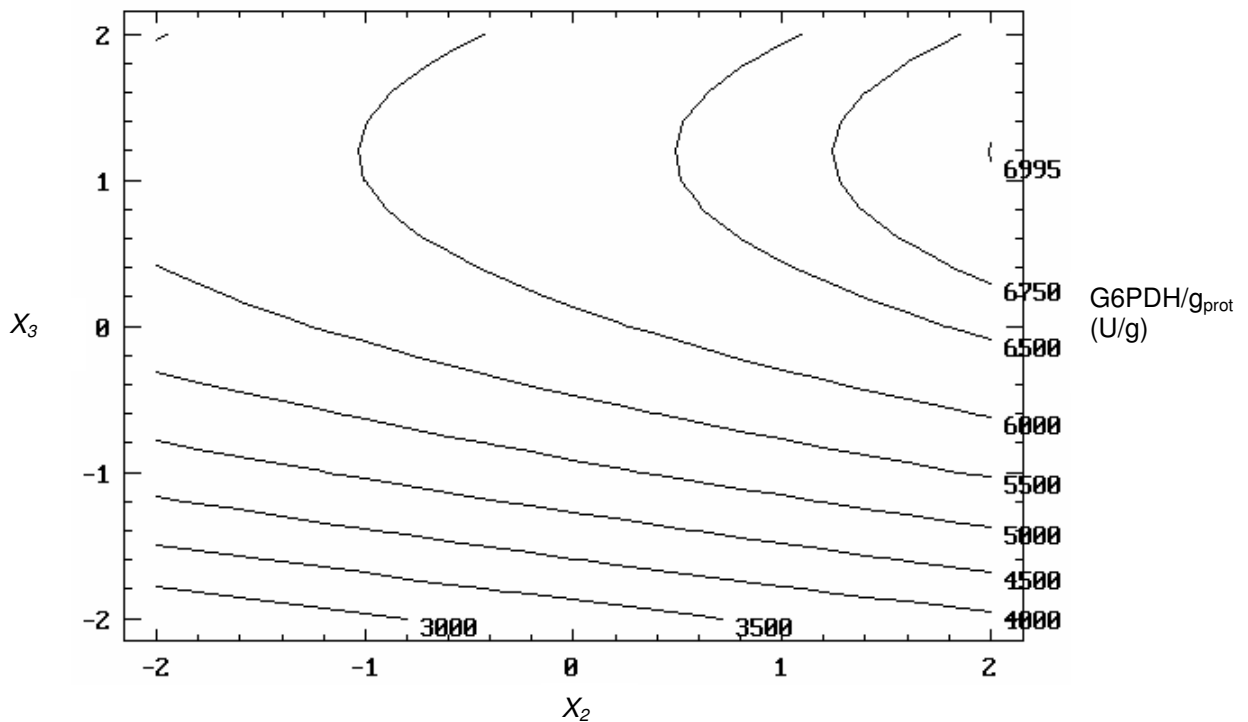


FIGURA 4.2. Curva de nível da atividade específica de G6PDH ($G6PDH/g_{prot}$) em função dos valores codificados de concentração de triptofano (X_2) e histidina (X_3).

Ao se aplicar análise de variância aos valores de atividade e aos de atividade específica referentes aos cultivos 23 a 31 (Tabela 4.1), pode-se concluir que o aumento do nível do triptofano a valores maiores que 80 mg/L não leva a melhores resultados da atividade específica de G6PDH ($p = 0,64$). Desse modo, fica assegurado a concentração de 80 mg/L (nível +2) como a ótima para a produção da enzima. Sendo assim, ao se utilizar os valores otimizados para as variáveis independentes, a equação 4.6 prevê uma atividade específica de G6PDH de 7702 U/g, contudo foi encontrado 7927 U/g (média dos cultivos 23 a 25). Esse resultado mostra que o modelo se adequou aos resultados experimentais, pois nenhuma diferença significativa entre o valor previsto e o experimental foi observada.

A *S. cerevisiae* W303-181 foi cultivada em agitador rotativo por 18 h usando o meio de cultivo otimizado (glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina 68 mg/L, histidina 66 mg/L, uracila 47 mg/L e triptofano 80 mg/L). Após a inoculação de 500 mL desse meio, foram preparados 5 Erlenmeyers contendo 100 mL dessa suspensão de

leveduras e incubados em agitador rotativo (TE-420, Tecnal) a 100 rpm, 30 °C por 18 h. A cada 2 horas era feita amostragem em um dos Erlenmeyers, alternadamente, de modo a não promover alteração superior 10% do seu volume de meio.

A Figura 4.3 mostra o perfil das curvas de concentração celular (X), concentração de substrato (S) e atividade enzimática (G6PDH) em função do tempo de cultivo. Essa figura mostra que a produção da enzima, bem como o crescimento celular, ocorreram enquanto havia glicose no meio e, quando este se encontrava exaurido, tanto o crescimento celular quanto a produção da enzima cessaram.

O cultivo teve início com uma concentração celular de 1,00 g/L e atividade de G6PDH de 1544 U/L. Após 12 h de cultivo, a concentração celular e atividade de G6PDH atingiram 3,21 g/L e 4939 U/L, respectivamente. Analisando o perfil da velocidade de crescimento celular e de produção de G6PDH, na Figura 4.4, verificou-se que elas atingiram seus maiores valores ($0,178 \text{ h}^{-1}$, 425 U/Lh) em 2,5 h de cultivo e, após 12 h, assume valores desprezíveis.

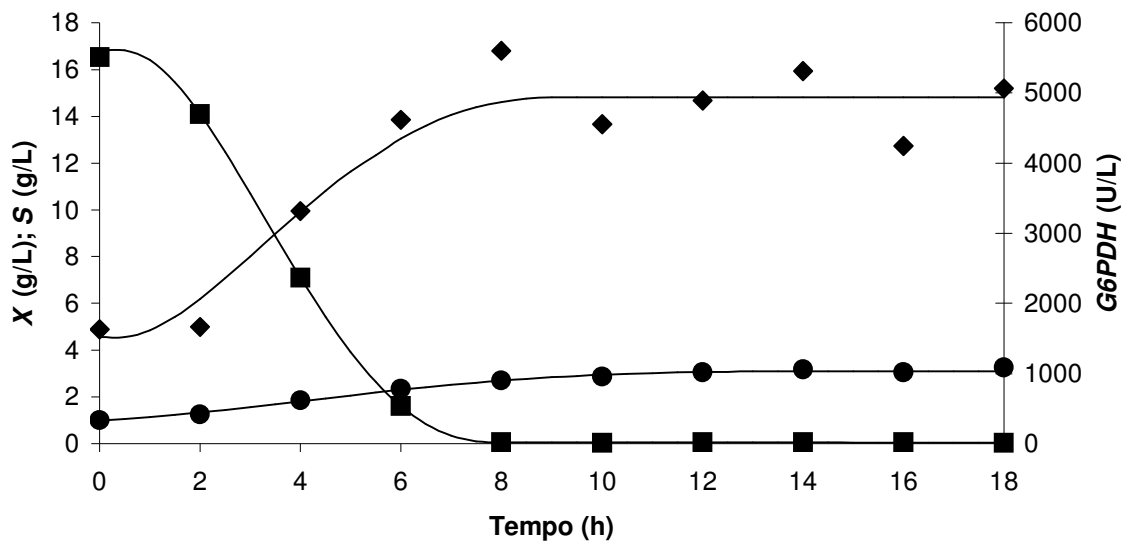


FIGURA 4.3. Concentração celular (X) (-●-), concentração de glicose (S) (-■-) e atividade de G6PDH por litro de meio cultivado (G6PDH) (-◆-) em função do tempo. Cultivo conduzido em agitador rotativo com a *S.cerevisiae* W303-181 para a produção de G6PDH usando um meio de cultivo otimizado, composto por glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina 68 mg/L, histidina 66 mg/L, uracila 47 mg/L e triptofano 80 mg/L.

A redução do crescimento é resultado do consumo total da glicose, que ocorreu em 8 h de cultivo. Por esse mesmo motivo, a produção de enzima ocorreu

até 8 h, momento no qual a velocidade específica de crescimento estava diminuindo (Figura 4.4). A Figura 4.4 mostra as curvas de velocidade específica de crescimento celular e de produção de G6PDH, na qual foi verificada que a produção de G6PDH está associada ao crescimento celular, pois, ambas as curvas apresentam o mesmo perfil (HISS, 2001). SILVA *et al.* (2002) também verificaram que a *S. cerevisiae* de fermento prensado, cultivada em regime descontínuo para a produção de G6PDH, apresentou produção associada ao crescimento.

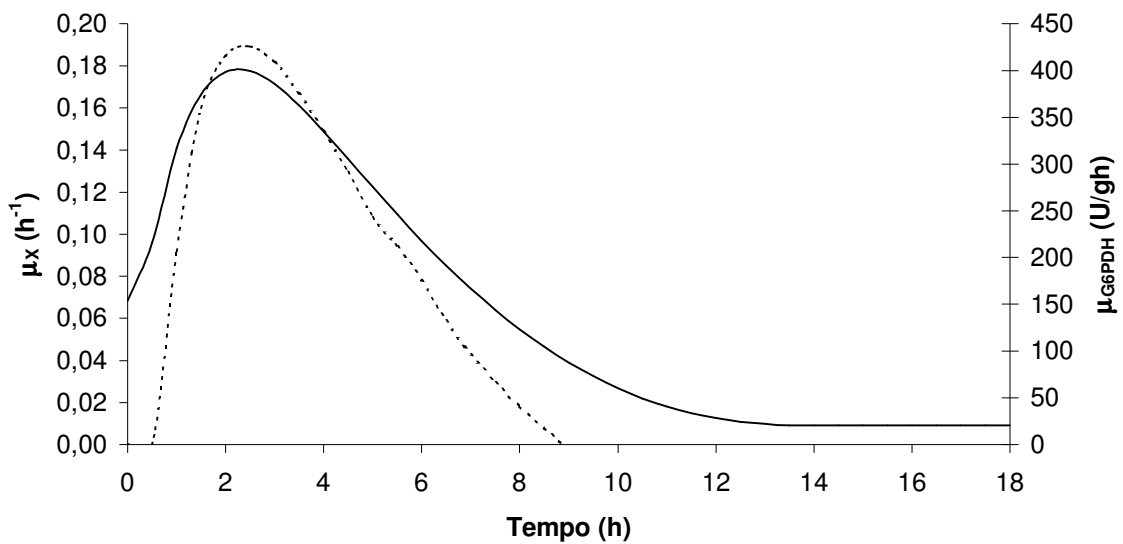


FIGURA 4.4. Velocidade específica de crescimento celular (μ_x) (—) e velocidade específica de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) (--) em função do tempo. Cultivo conduzido em agitador rotativo com a *S. cerevisiae* W303-181 para a produção de G6PDH usando um meio de cultivo otimizado, composto por glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina 68 mg/L, histidina 66 mg/L, uracila 47 mg/L e triptofano 80 mg/L.

4.5. Conclusão

Pode-se concluir que a concentração de micronutrientes apresenta grande influência na formação de biomassa e na síntese da enzima. Ao se empregar o meio de cultivo cujas concentrações dos micronutrientes tenham sido otimizadas (adenina a 68 mg/L, uracila a 47 mg/L, triptofano a 80 mg/L e histidina a 66 mg/L), G6PDH/g_{prot} atingiu um valor médio de 7927 U/g (cultivos 23 a 25), 3,2 vezes maior que o encontrado para o cultivo 1 (2484 U/L) o meio apresentava 20 mg/L de

micronutrientes. Através do cultivo as *S. cerevisiae* W303-181 em meio de cultivo otimizado, usando agitador rotativo, verificou-se a reprodutibilidade dos resultados encontrados no planejamento experimental, uma vez que a atividade específica de G6PDH e de concentração celular (8343 U/g e 3,21 g) foram muito próximas aos valores encontrados para o meio otimizado do planejamento experimental, cultivos 23 a 25 (7927 U/g e 3,42 g). Ainda, verificou-se que a produção da enzima está associada ao crescimento celular.

4.6. Agradecimentos

Ângelo Samir Melim Miguel e agradece à FAPESP/Brasil, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro, à Prof^a Dr^a Eliane Dalva Godoy Danesi e ao Prof. João Carlos Monteiro de Carvalho pelo auxílio nos experimentos e à Prof^a. Dr^a. Carla Columbano Oliveira que conduziu a transformação da levedura *S. cerevisiae* W303-181.

CAPÍTULO V

INFLUÊNCIA DA VAZÃO DE ALIMENTAÇÃO EXPONENCIALMENTE CRESCENTE E DECRESCENTE NA SÍNTESE DA ENZIMA GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 CULTIVADA EM PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO

Palavras-chave: glicose-6-fosfato desidrogenase, *Saccharomyces cerevisiae*, processo descontínuo alimentado.

5.1. Resumo

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (EC.1.1.1.49) é a primeira enzima da via das pentoses-fosfato, catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato e reduz o NADP⁺ e/ou NAD⁺. Esta enzima, de grande interesse como reagente analítico, é utilizada em vários ensaios quantitativos, entre eles, concentração de glicose e atividade de creatino-quinase. Foi usada uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 para a produção de glicose-6-fosfato desidrogenase em cultivos conduzidos em regime descontínuo alimentado. Esses cultivos foram realizados em fermentador de 3 L nas seguintes condições: 0,266 L de meio de cultura (14,0 g/L de *yeast nitrogen base*; 511,28 µg/mL de adenina; 353,38 µg/mL de uracila; 496,24 µg/mL de histidina e 601,50 µg/mL de triptofano); concentração celular inicial variou de aproximadamente 1,0 g/L e tempo total de cultivo de 14 h. Estudaram-se diferentes vazões de alimentação de nutrientes com perfil exponencialmente crescente e decrescente. A maior produtividade de G6PDH foi de 149,27 U/L.h e ocorreu no cultivo em regime descontínuo alimentado com vazão de alimentação exponencialmente crescente e constante de tempo (K) 0,2 h⁻¹. Concluiu-se que quanto maior o volume de solução de glicose adicionada à dorna nas primeiras horas de processo, menores os níveis de produção de G6PDH. O valor de K e a composição do meio de cultivo determinam o comportamento de diversos parâmetros de cultivo, como velocidades específicas máximas de crescimento celular e produção de G6PDH, produção em células e em enzimas, além de produtividades e fatores de conversão do processo.

5.2. Introdução

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (EC.1.1.1.49) é a primeira enzima da via das pentoses-fosfato e catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfogliconato reduzindo NADP^+ e/ou NAD^+ . Essa via é responsável por fornecer pentoses-fosfato para a síntese de nucleotídeos, bem como NADPH e/ou NADH para biossínteses redutoras e proteção de *stress* oxidativo (COSGROVE *et al.*, 1998; ÖZER *et al.*, 2001; ROWLAND *et al.*, 1994). Esta enzima, de grande interesse como reagente analítico, pode ser utilizada para a determinação de teores de glicose, frutose, manose e ATP (BOROSS *et al.*, 1987) e na determinação de atividade de creatino-quinase (BERGMEYER, 1983). A G6PDH é encontrada em células animais e vegetais, além de microrganismos, destacando-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SILVA *et al.*, 2002).

A *S. cerevisiae* é atrativa para expressão de proteínas heterólogas, pois além de ser reconhecida como um microrganismo seguro, são capazes de promover modificações pós-traducionais em proteínas, como a glicosilação e/ou outras modificações necessárias para a ótima atividade biológica e estabilidade protéica (Da SILVA *et al.*, 1991; ZIGOVA, 2000).

A síntese de produtos de gene clonado é influenciada por fatores genéticos e ambientais, incluindo estabilidade do plasmídeo e número de cópias, força do promotor, velocidade específica de crescimento celular e composição do meio de cultivo (CHIRUVOLU *et al.*, 1996). A determinação de condições operacionais ótimas para processos fermentativos usando microrganismos recombinantes é muito difícil, isso devido à complexidade adicional no processo de segregação ou da instabilidade estrutural do plasmídeo. A perda do plasmídeo pela célula depende das suas características de construção, condições do meio e velocidade com que o microrganismo se desenvolve (SHENE *et al.*, 2000).

Processos fermentativos em regime descontínuo alimentado, conduzidos em reatores de tanque agitado, são freqüentemente utilizados pela indústria (SCHINELLE *et al.*, 1996; FURLAN *et al.*, 2001). Esse processo tem sido empregado para a produção de vários bioprodutos, incluindo metabólitos primários e secundários, proteínas e outros biopolímeros (LEE *et al.*, 1999). Durante o cultivo em regime descontínuo alimentado, um ou mais nutrientes podem ser adicionados ao fermentador, enquanto as células e produto permanecem aí até o final do cultivo.

Mais eficiente que o processo descontínuo, o processo descontínuo alimentado é vantajoso quando a mudança da concentração de nutrientes afeta a produtividade e o rendimento do produto desejado (YAMANE, T; SHIMIZU, S., 1984). O excesso ou carência de nutrientes podem comprometer tanto o crescimento celular quanto a obtenção do produto desejado, assim, o desenvolvimento de uma estratégia adequada de alimentação é crítica nos processos descontínuo alimentados. Dentre as estratégias de controle, as vazões exponenciais de alimentação pré-determinadas constituem um método simples, porém, eficiente, que permite o crescimento do microrganismo com velocidade específica de crescimento constante (LEE *et al.*, 1999). Alguns autores obtiveram um incremento na produtividade por usarem uma vazão exponencialmente crescente de adição de substrato (MIGUEL *et al.*, 2003; KOTIK *et al.*, 2004), enquanto CARVALHO *et al.* (1990) encontraram maior produtividade de etanol em regime descontínuo alimentado com vazão de alimentação exponencialmente decrescente. Ainda, CARVALHO *et al.* (2000) verificaram, através da metodologia de superfície de resposta, as melhores condições para a produção simultânea de invertase e etanol.

Esse trabalho estuda a influência das vazões de alimentação exponencialmente crescente e decrescente na síntese de glicose-6-fosfato desidrogenase de *S. cerevisiae* W303-181. Essa levedura, desenvolvida por LOJUDICE *et al.* (2001), carrega um plasmídio contendo uma seqüência que codifica a G6PDH sob regulação do promotor PGK1.

5.3. Materiais e Métodos

5.3.1. Materiais

Dimetilpolisiloxano, uracila, adenina, histidina, triptofano, NADP, β -mercaptoetanol e G6P foram obtidos da Sigma[®] (St. Louis, MO, EUA), a glicose da MERCK (Darmstadt, Alemanha) e o YNB da Difco[®] (Detroit, MI, EUA). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. Foi utilizado fermentador de bancada de 3 L (Bioflo 110, New Brunswick Scientific Co., Madison, NJ, EUA), agitador rotativo NBS Gyrotory Shaker, New Brunswick Co., Medson, NJ, EUA), agitador de tubos vórtice (Q-220A, Quimis, Diadema, SP), centrífuga refrigerada (BR4i, Jouan, St. Herblain, França) e espectrofotômetro (DU 640, Beckman, Fullerton, CA, EUA).

5.3.2. Microrganismo e preparo do inóculo

A levedura *S. cerevisiae* W303-181 foi empregada nos cultivos e carrega um plasmídeo contendo uma seqüência que codifica a G6PDH sob regulação do promotor PGK1. A cultura estoque foi mantida a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ em solução tampão acetato (0,1 mol/L, pH 5,7) contendo glicerol (30% v/v) como crioprotetor. O meio de cultivo utilizado para o crescimento do inóculo era preparado com meio tamponado (tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,7) e era composto por glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina, histidina, uracila e triptofano 20 mg/L. O inóculo foi obtido após ativação celular e cultivo do pré-inóculo. Na fase de ativação celular, 900 μl de suspensão descongelada de leveduras foi adicionada a 9,1 mL de meio de cultivo em um Erlenmeyer de 50 mL e incubado em agitador rotativo a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. O pré-inóculo foi preparado após transferência de 10 mL da suspensão obtida na etapa de ativação celular para Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL de meio de cultivo e incubação em agitador rotativo a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. O inóculo foi preparado transferindo-se 10 mL da suspensão obtida na etapa de pré-inóculo para Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL de meio de cultivo e incubados em agitador rotativo a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 h.

5.3.3. Processo descontínuo alimentado

O inóculo (volume = 1,067 L) foi vertido em uma dorna de 3 L de um fermentador de bancada (Bioflo 110, New Brunswick Scientific Co.) contendo 0,266 L de meio de cultura (*yeast nitrogen base* (YNB) 14,0 g/L, 511,28 $\mu\text{g/mL}$ de adenina, 353,38 $\mu\text{g/mL}$ de uracila, 496,24 $\mu\text{g/mL}$ de histidina e 601,50 $\mu\text{g/mL}$ de triptofano) e a concentração celular inicial variou de 0,78 a 1,02 g/L. O tempo total de cultivo foi de 14 h. A formação de espuma foi controlada através da adição de 0,5 mL de dimetilpolisiloxano quando necessário. A agitação e vazão específica de ar foram 200 rpm e 2,0 vvm, respectivamente, e o $k_{\text{L}}a$ de 42 h^{-1} . A vazão de ar foi medida e controlada, através de um rotâmetro, de forma a manter fixo o $k_{\text{L}}a$ durante o enchimento da dorna. O pH do meio durante o cultivo aeróbio foi medido por um eletrodo (Ingold, Woburn, MA, EUA) e mantido constante (pH 5,7) através da adição automática de solução de NaOH a 0,5 mol/L e de H_2SO_4 a 0,5 mol/L. Antes da adição do inóculo ao fermentador, a agitação, vazão de ar e temperatura ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$) foram ajustadas. O processo descontínuo alimentado teve início com 1,333 L (V_0),

inóculo e meio de cultura (fonte de nitrogênio e micronutrientes), alimentado até a um volume total de 2,0 L (V_f), o tempo de alimentação (T) foi de 5 h e para a constante de tempo K , os seguintes valores: 0,2, 0,5 e 0,8 h⁻¹. Durante o processo, o reator foi alimentado a cada 30 min por uma solução de glicose a 10 g/L, cujo volume (V) foi calculado em função do tempo (t) de acordo com a equação 5.1, para o processo conduzido com vazão de alimentação exponencialmente crescente, e equação 5.2, para o processo conduzido com vazão de alimentação exponencialmente decrescente.

$$(V - V_0) = (V_f - V_0) \frac{(e^{Kt} - 1)}{(e^{KT} - 1)} \quad (5.1)$$

$$(V - V_0) = (V_f - V_0) \frac{(e^{-Kt} - 1)}{(e^{-KT} - 1)} \quad (5.2)$$

5.3.4. Rompimento celular

Uma alíquota de 5 mL de meio fermentado foi centrifugada e o *pellet* ressuspenso em 5 mL da seguinte solução: Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5, MgCl₂ 5 mmol/L, EDTA 0,2 mmol/L, β-mercaptoetanol 10 mmol/L e ácido aminocaprílico 2 mmol/L. Logo após, as células foram rompidas em vórtice, na presença de 7,45 g de pérolas de vidro (0,5 mm de diâmetro), durante 24 min. Os tubos foram mantidos resfriados através de banho de gelo e alternava-se, a cada 30 s, a operação de agitação em vórtice e resfriamento em banho de gelo. Os fragmentos celulares e as pérolas de vidro foram removidos por centrifugação (3025 g, por 30 min. a 6 °C). O sobrenadante foi usado para medidas de atividade enzimática e de teor de proteínas totais.

5.3.5. Métodos analíticos

A concentração celular foi determinada utilizando-se de uma curva de calibração que correlaciona absorvância com massa seca. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (DU 640, Beckman) a 600 nm, utilizando-se água destilada como análise em branco. A concentração de glicose foi feita pela detecção de açúcares redutores totais (ART), descrita por SOMOGYI (1952). A atividade de G6PDH foi feita de acordo com BERGMEYER *et al.* (1983) e o teor de proteínas totais de acordo com LOWRY *et al.* (1951).

5.3.6. Parâmetros de cultivo

Fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), fator de conversão de substrato em enzima ($Y_{P/S}$), produtividade em enzimas (Pr_{enz}), produtividade em células (Pr_X), células produzidas (X_{prod}), enzima produzida ($G6PDH_{prod}$), velocidades específicas máximas de crescimento celular ($\mu_{X,max}$) e de produção de G6PDH ($\mu_{G6PDH,max}$) foram calculados da seguinte forma:

$$Y_{X/S} = \Delta M_X / \Delta M_S \quad (5.3)$$

$$Y_{P/S} = \Delta U / \Delta M_S \quad (5.4)$$

$$Pr_{enz} = \Delta U / \Delta t \quad (5.5)$$

$$Pr_X = \Delta X / \Delta t \quad (5.6)$$

$$X_{prod} = \Delta X \quad (5.7)$$

$$G6PDH_{prod} = \Delta U \quad (5.8)$$

$$\mu_X = \left(\frac{1}{M_X} \right) \left(\frac{dM_X}{dt} \right) \quad (5.9)$$

$$\mu_{G6PDH} = \left(\frac{1}{M_X} \right) \left(\frac{dU}{dt} \right) \quad (5.10)$$

Em que: $\Delta M_X = (M_{Xf} - M_{Xi})$, $\Delta M_S = (M_{Si} - M_{Sf})$, $\Delta U = (u_f - u_i)$, $\Delta t = (t_f - t_i)$, $\Delta X = (X_f - X_i)$, $\Delta U = (U_f - U_i)$. M_{Xi} = massa celular inicial (g), M_{Xf} = massa celular final (g), M_{Si} = massa de glicose inicial (g), M_{Sf} = massa de glicose final (g), t_i = tempo inicial (h), t_f = tempo final (h), u_i = atividade de G6PDH inicial (U), u_f = atividade de G6PDH final (U), X_i = concentração celular inicial (g/L), X_f = concentração celular final (g/L), U_i = atividade de G6PDH inicial por litro de meio cultivado (U/L), U_f = atividade de G6PDH final por litro de meio cultivado (U/L).

5.4. Resultados e discussão

A levedura *S. cerevisiae* W303-181, desenvolvida por LOJUDICE *et al.* (2001) através de modificação genética, foi utilizada nesse trabalho. Por se tratar de uma nova levedura que é fonte potencial para a produção de G6PDH, as condições de cultivo que levem a maior expressão da enzima devem ser pesquisadas. Foi avaliada, nesse trabalho, a influência da constante de tempo (K) na produção de G6PDH por processo fermentativo descontínuo alimentado conduzido com vazão de alimentação exponencialmente crescente e decrescente. O processo teve duração

de 14 h, a alimentação foi feita na forma de pulsos, a cada 30 min, durante as primeiras 5 h. A cada adição, o volume da solução de glicose (substrato) foi calculado de acordo com as equações 5.1 e 5.2, para a vazão de alimentação exponencialmente crescente e decrescente, respectivamente. A Figura 5.1 mostra o volume de solução de glicose adicionada à dorna em função do tempo de cultivo para diferentes valores de K , nas vazões de alimentação exponencialmente crescente e decrescente. Pode ser observado, para a vazão exponencialmente crescente, um aumento do volume adicionado durante todo o tempo e, para as vazões exponencialmente decrescentes, o volume decrescia no decorrer do tempo de alimentação. Diferentes perfis de curvas podem ser observados para as vazões exponencialmente decrescentes, no início (0 a 1 h), o volume da solução de glicose adicionada era mais alta para os maiores valores de K , após esse período o volume passou a decrescer com o aumento do K .

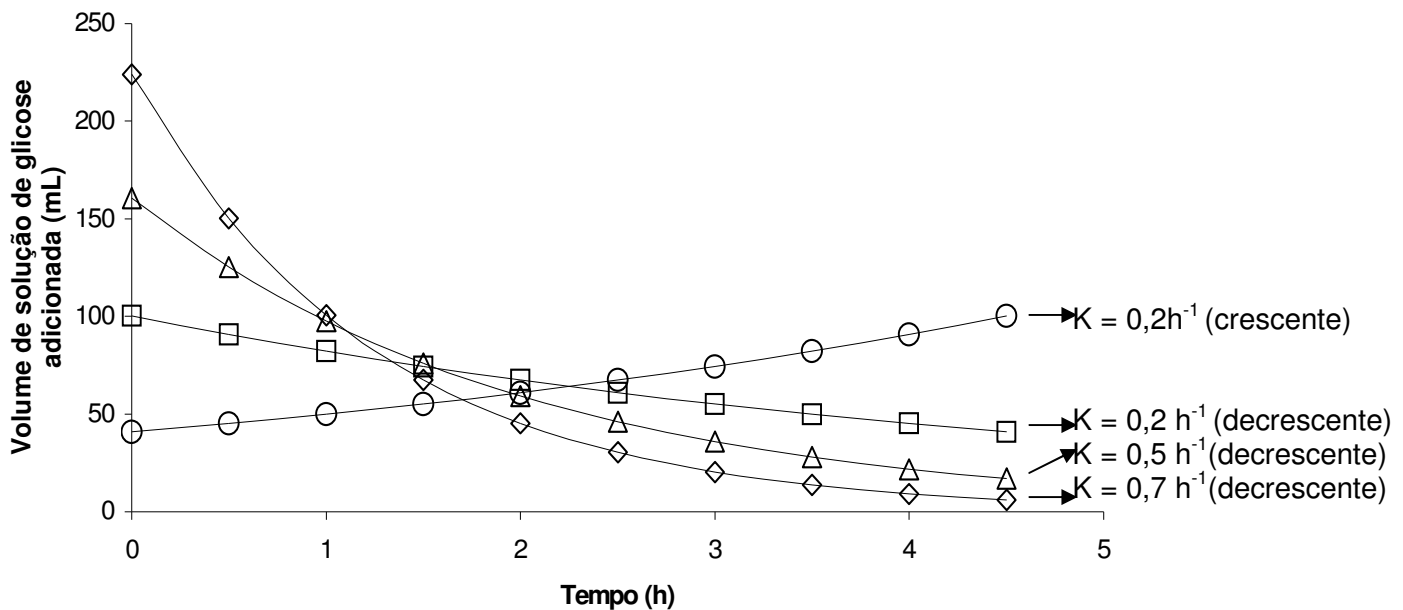


FIGURA 5.1. Volume de solução de glicose (10 g/L) adicionada à dorna em função do tempo de cultivo para os diferentes valores de K , na vazão de alimentação exponencialmente crescente, $K \text{ (h}^{-1}\text{)} = 0,2$ (-O-), e na vazão de alimentação exponencialmente decrescente, $K \text{ (h}^{-1}\text{)} = 0,2$ (-□-), $K = 0,5$ (-△-) e $K = 0,8$ (-◇-). O cultivo em regime descontínuo alimentado foi conduzido com *S. cerevisiae* W303-181 e a de adição de glicose (substrato) foi calculada de acordo com a equação 1

para a vazão de alimentação exponencialmente crescente e equação 2 para a vazão de alimentação exponencialmente decrescente.

Foi observado que, para todas as vazões estabelecidas pelo valor de K , a concentração celular decresce nas primeiras horas de cultivo, isso ocorre devido à diluição da massa celular na dorna durante a alimentação (Figura 5.2). Após a alimentação, a concentração celular aumentou até o final em todos os cultivos, cujos valores finais foram próximos, variando de 2,22 a 2,45 g/L (Tabela 5.1).

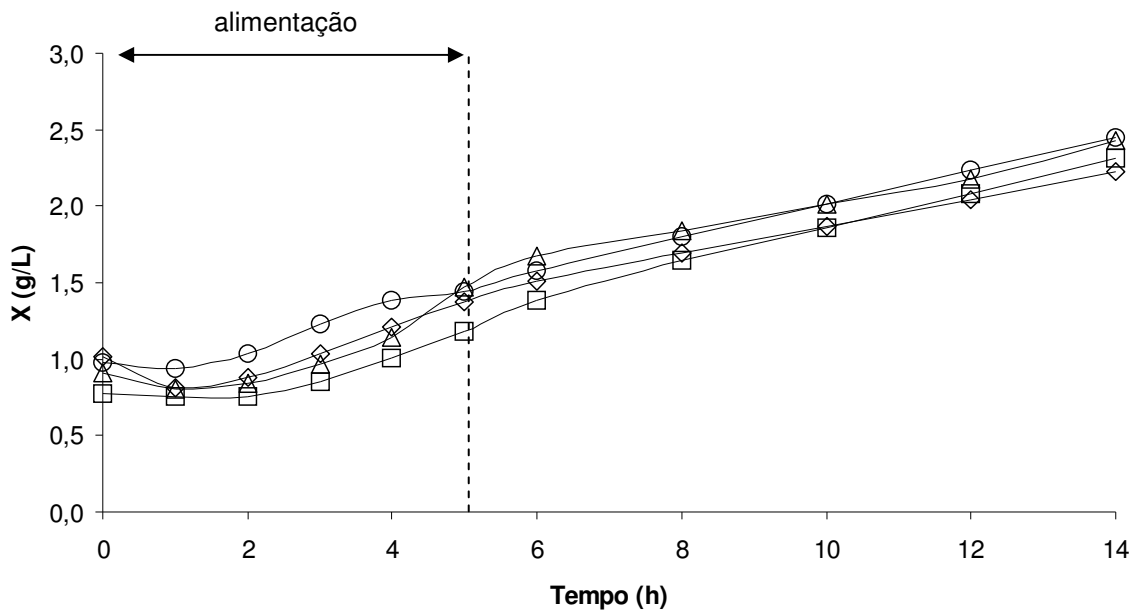


FIGURA 5.2. Concentração celular (X) em função do tempo de cultivo para os diferentes valores de K , na vazão de alimentação exponencialmente crescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-O-), e na vazão de alimentação exponencialmente decrescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-□-), $K = 0,5$ (-△-) e $K = 0,8$ (-◇-).

Embora a glicose tenha sido exaurida, em todos os cultivos, em aproximadamente 6 h de processo (Figura 5.3), a levedura continua crescendo até 14 h, característica de crescimento diáuxico. Após o fim da glicose, a levedura usou alguma outra substância como fonte de carbono. SILVA *et al.* (2002), ao estudar a produção de G6PDH de *S. cerevisiae* de fermento prensado em cultivo aeróbio e regime descontínuo, verificaram que a levedura continuava crescendo após o consumo total da glicose. Segundo esses autores, o etanol produzido durante o processo, enquanto ainda havia glicose na dorna, seria usado como substrato. A *S. cerevisiae* é considerada uma levedura *Crabtree* positiva, portanto, capaz de

produzir etanol mesmo sob condições ótimas de aeração (ROSE, HARRISON, 1989; RHEM, REED, 1993) além de poder utilizá-lo como fonte de carbono (WALKER, 1998).

TABELA 5.1. Parâmetros relacionados ao processo descontínuo alimentado, nas vazões de alimentação exponencialmente crescente e decrescente, conduzidos com *Saccharomyces cerevisiae* W303-181.

Parâmetros	$K (h^{-1})$				
	Crescente		Decrescente		
	0,2a *	0,2b **	0,2	0,5	0,8
X_i	1,28	0,94	0,78	0,91	1,02
X_f	2,10	2,45	2,31	2,43	2,22
X_{prod}	0,82	1,51	1,53	1,50	1,20
$\mu_{x,max}$	0,16	0,247	0,211	0,199	0,193
Pr_x	0,058	0,105	0,110	0,109	0,086
U_i/L	527	774	710	1075	951
U_f/L	1085	1621	1267	1475	1081
$G6PDH_{prod}$	558	847	557	400	130
$\mu_{p,max}$	59,73	119	125	88	73
Pr_{enz}	53	61	40	29	9
$G6PDH/g_{prot}$	2870	3040	2530	2810	1880
$G6PDH/g_{cel}$	517	661	564	675	448
$Y_{X/S}$	0,18	0,17	0,11	0,15	0,18
$Y_{P/S}$	108,66	114	84	77	68

Onde:

X_i	Concentração celular inicial (g/L)
X_f	Concentração celular final (g/L)
X_{prod}	Células produzidas (g/L)
$\mu_{x,max}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})
Pr_x	Produtividade em células (g/h)
U_i	Atividade de G6PDH inicial por litro (U/L)
U_f	Atividade de G6PDH final por litro (U/L)
$G6PDH_{prod}$	Enzima produzida (U/L)
$\mu_{p,max}$	Velocidade específica máxima de produção (U/gh)
Pr_{enz}	Produtividade em enzimas (U/Lh)
$G6PDH/g_{prot}$	Atividade de G6PDH em relação a proteínas (U/g)
$G6PDH/g_{cel}$	Atividade de G6PDH em relação a células (U/g)
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em células (g/g)
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em enzimas (U/g)

*0,2a: refere-se aos resultados de um cultivo em regime descontínuo alimentado conduzido com vazão de alimentação exponencialmente crescente (Capítulo III).

**0,2b: refere-se aos resultados do cultivo em regime descontínuo alimentado conduzido com vazão de alimentação exponencialmente crescente utilizando um meio de cultivo com concentrações de micronutrientes otimizadas, de acordo com o Capítulo IV.

Todos os cultivos realizados apresentaram valores de concentração celular final e velocidade específica máxima de crescimento celular similares (Tabela 5.1).

A maior produtividade em células foi encontrado para o cultivo conduzido com alimentação exponencialmente crescente $K = 0,2b \text{ h}^{-1}$ (0,105 g/h). Nos cultivos conduzidos com alimentação exponencialmente decrescente a produtividade em células decaiu com o aumento do valor de K (0,110, 0,109 e 0,086 g/h para $K = 0,2, 0,5$ e $0,8 \text{ h}^{-1}$).

Em todos os cultivos, a glicose foi quase totalmente consumida em 6h de processo, tempo de cultivo no qual os valores de sua concentração eram desprezíveis (Figura 5.3). Curiosamente, embora a produtividade em células tenha variado de forma inversamente proporcional com o valor de K nos cultivos conduzidos com alimentação exponencialmente decrescente, o fator de conversão de substrato em células aumentou com o valor de K (0,112, 0,150 e 0,175 g/g para $K = 0,2, 0,5$ e $0,8 \text{ h}^{-1}$). Provavelmente, o aumento do valor de K imponha uma condição onde a fonte de carbono seja cada vez menos usada para a síntese da enzima e sim para crescimento e manutenção celular. Isso pode ser confirmado através da análise do fator de conversão de substrato em enzima, este decresceu com o aumento do K para esses cultivos (84, 77 e 68 U/g para $K = 0,2b, 0,5$ e $0,8 \text{ h}^{-1}$). Contudo, o cultivo com vazão exponencialmente crescente proporcionou o maior fator de conversão de substrato em produto (114 U/g).

A Figura 5.4 mostra os perfis das curvas de atividade de G6PDH por litro de meio cultivado. Observa-se que, para todos os cultivos, a atividade decresceu nas primeiras horas de cultivo devido à sua diluição na dorna durante a alimentação, tal como ocorreu para a concentração celular (Figura 5.2). Foi verificado, após a alimentação, que a atividade de G6PDH aumentou até o final dos cultivos.

O cultivo com $K=0,2b \text{ h}^{-1}$ e vazão de alimentação exponencialmente crescente apresentou a maior teor de enzima produzida e maior produtividade em enzimas (847 U/L e 61 U/Lh). Naqueles cultivos conduzidos com vazão de alimentação exponencialmente decrescente, tanto o teor de enzima produzida (557, 400 e 130 U/L) quanto à produtividade em enzimas (40, 29 e 9 U/Lh) decresceram com o aumento do valor de K ($K = 0,2 b, 0,5$ e $0,8 \text{ h}^{-1}$).

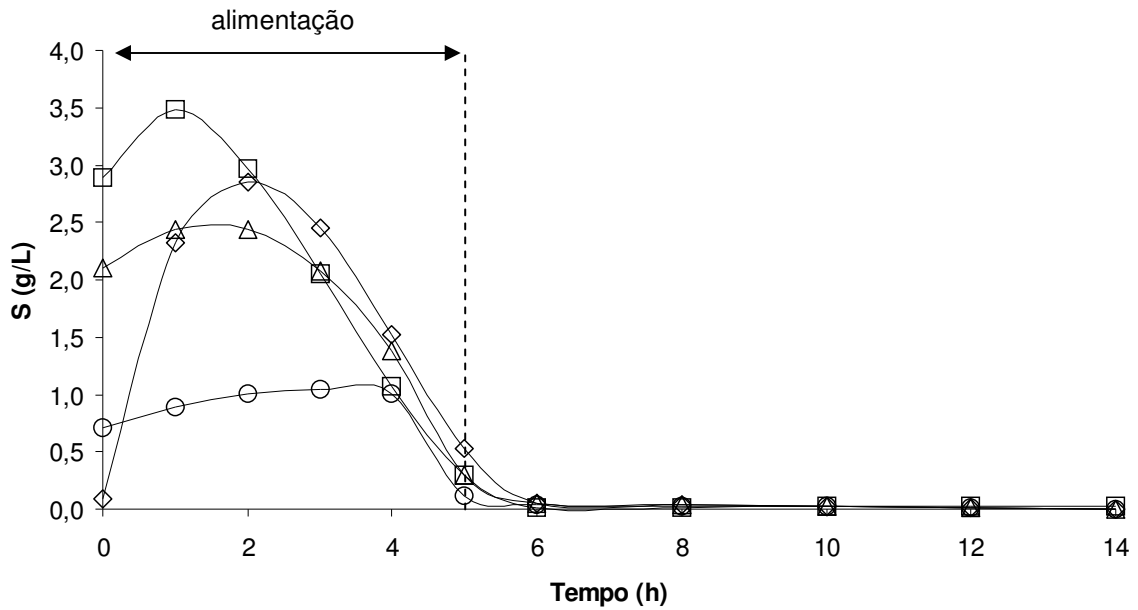


FIGURA 5.3. Concentração de glicose (S) em função do tempo de cultivo para os diferentes valores de K , na vazão de alimentação exponencialmente crescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-O-), e na vazão de alimentação exponencialmente decrescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-□-), $K = 0,5$ (-△-) e $K = 0,8$ (-◇-).

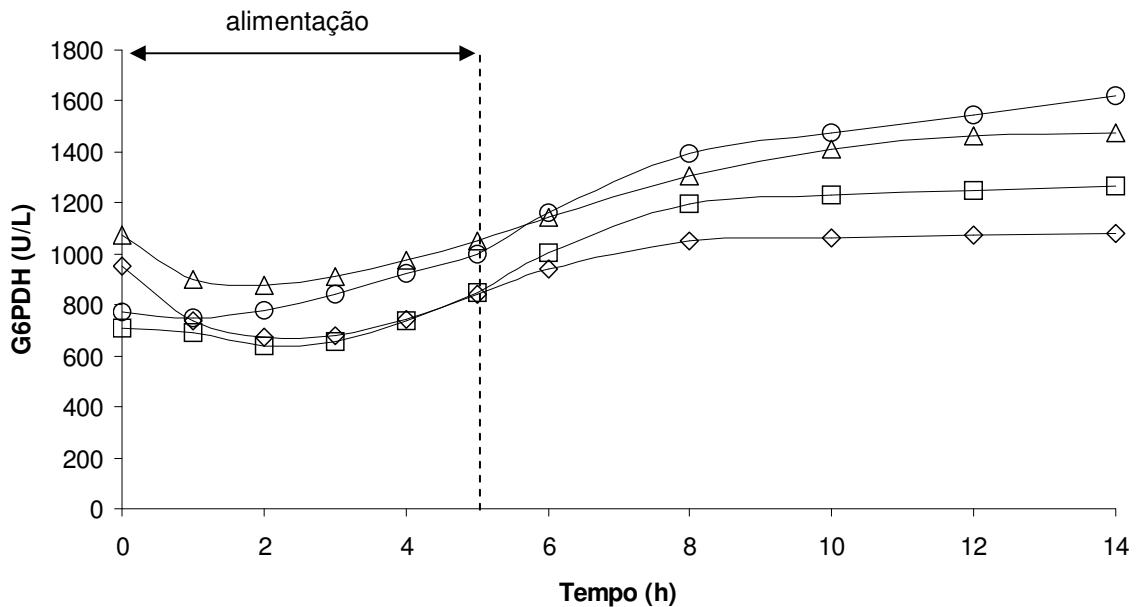


FIGURA 5.4. Atividade de G6PDH por litro de meio cultivado (G6PDH) em função do tempo de cultivo para os diferentes valores de K , na vazão de alimentação exponencialmente crescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-O-), e na vazão de alimentação exponencialmente decrescente, K (h^{-1}) = 0,2 (-□-), $K = 0,5$ (-△-) e $K = 0,8$ (-◇-).

A Figura 5.5 mostra as curvas de velocidade específica de crescimento celular e de produção de G6PDH, na qual foi verificada que a produção de G6PDH está associada ao crescimento celular. SILVA *et al.* (2002) também verificaram que a *S. cerevisiae* de fermento prensado, cultivada em regime descontínuo para a produção de G6PDH, apresentou produção associada ao crescimento.

A Tabela 5.1 mostra os resultados de dois cultivos distintos em regime descontínuo alimentado exponencialmente crescente com $K = 0,2h^{-1}$. Os parâmetros correspondentes ao $K = 0,2a h^{-1}$ referem-se ao trabalho apresentado no Capítulo III desta tese, no qual foi verificado que o $K = 0,2 h^{-1}$ foi o melhor para a produção da enzima G6PDH, quando comparado a outros valores de K ($K = 0,3, 0,5, 0,7$ e $0,8 h^{-1}$) para a vazão de alimentação exponencialmente crescente. No trabalho apresentado no Capítulo III, empregou-se um meio de cultivo composto por glicose 5 g/L, YNB 0,74 g/L e micronutrientes 8 $\mu\text{g/mL}$ (adenina, histidina, uracila e triptofano). Os parâmetros $K = 0,2b h^{-1}$ referem-se ao processo conduzido com um meio de cultivo cuja diferença está na concentração de adenina, uracila, histidina e triptofano (68, 47, 66 e 80 $\mu\text{g/mL}$). Para esse último cultivo, como pode ser visto na tabela 5.1, encontrou-se maiores valores para diversos parâmetros. A velocidade específica de crescimento celular aumentou 54% e a atividade final de G6PDH em 49%.

O aumento da concentração dos micronutrientes favoreceu a síntese da enzima G6PDH. Foi verificado, também, decréscimo do valor do fator de conversão de substrato em células do cultivo com vazão exponencial. De acordo com CHIRUVOLU *et al.* (1996), a composição do meio de cultivo tem um papel importante no desenvolvimento de processos fermentativos. O enriquecimento do meio de cultivo permite alcançar altos rendimentos em biomassa e em proteínas recombinantes (WANG, Da SILVA, 1993). Isso, talvez, seja devido ao suprimento adequado de energia e precursores para o crescimento celular e síntese protéica (CHOI *et al.*, 1996).

Quando comparado com os cultivos conduzidos com vazão de alimentação exponencialmente crescente e decrescente, apresentados nesse trabalho, o cultivo conduzido com vazão exponencialmente crescente $K = 0,2b h^{-1}$ foi o mais adequado à produção de G6PDH, pois apresentou maior velocidade específica máxima de produção de G6PDH, maior produção e produtividade em enzimas, entre outros parâmetros (Tabela 5.1).

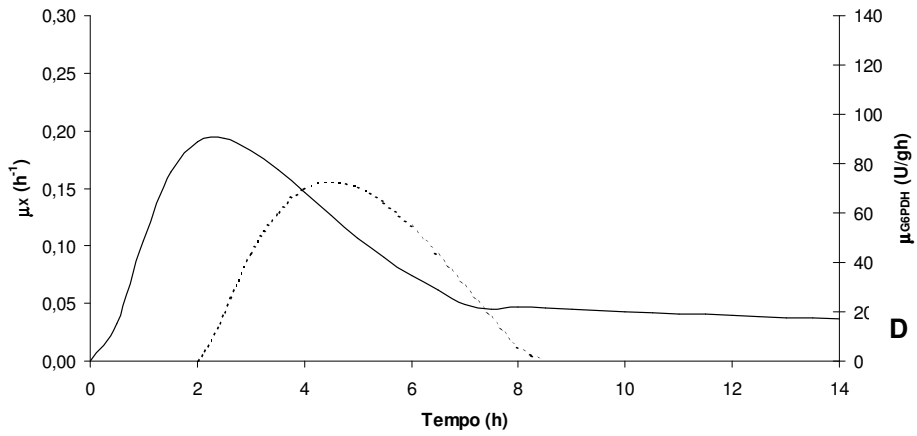
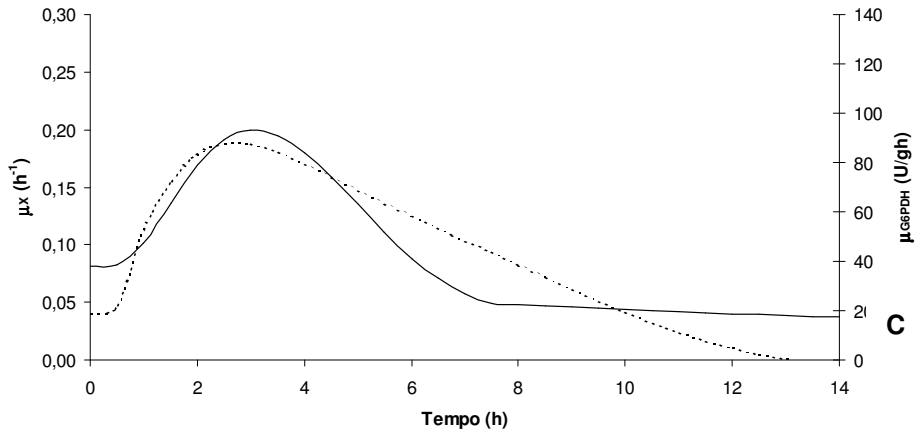
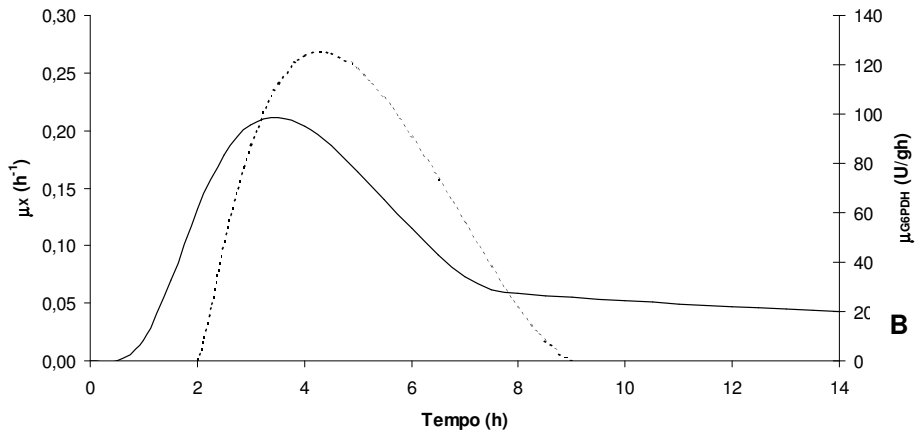
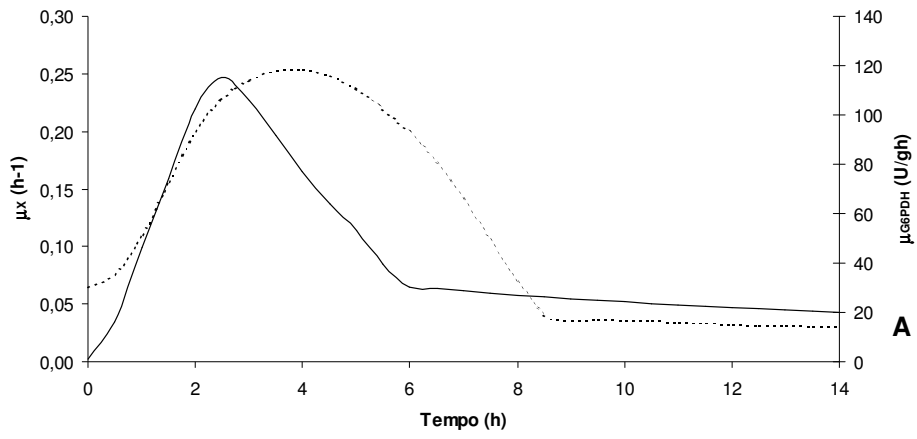


FIGURA 5.5. Velocidade específica de crescimento celular (-) e velocidade específica de produção de G6PDH (--) em função do tempo de cultivo de *S. cerevisiae* W303-181 em regime descontínuo alimentado nas vazões de alimentação. A: vazão exponencialmente crescente $K = 0,2 \text{ h}^{-1}$; B: vazão de alimentação exponencialmente decrescente, $K = 0,2 \text{ h}^{-1}$; C: vazão de alimentação exponencialmente decrescente, $K = 0,5 \text{ h}^{-1}$ e D: vazão de alimentação exponencialmente decrescente, $K = 0,8 \text{ h}^{-1}$.

5.5. Conclusão

A produção de G6PDH de *S. cerevisiae* W303-181 em regime descontínuo alimentado, conduzido com vazões de alimentação exponencialmente crescente e decrescente, foi avaliada. Essas vazões apresentam diferentes perfis e foram determinadas pelo valor da constante de tempo K .

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que os maiores níveis de produção de G6PDH ocorreram no cultivo em regime descontínuo alimentado com vazão de alimentação exponencialmente crescente e $K = 0,2 \text{ h}^{-1}$, conduzido com meio de cultivo com concentrações otimizadas de micronutrientes (adenina $67 \mu\text{g/mL}$, uracila $47 \mu\text{g/mL}$, histidina $66 \mu\text{g/mL}$ e triptofano $80 \mu\text{g/mL}$). Também, é possível observar que quanto maior o volume de solução de glicose adicionada à dorna nas primeiras horas de processo, menores os níveis de produção de G6PDH. O valor de K nesses cultivos determina o comportamento de diversos parâmetros de cultivo, como velocidades específicas máximas produção de G6PDH e enzima produzida, além de produtividades e fatores de conversão. Verificou-se, também, que a produção da enzima está associada ao crescimento celular.

5.6. Agradecimentos

Ângelo Samir Melim Miguel agradece à FAPESP/Brasil, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro, ao Dr. Dante Augusto Moraes peça assistência nos experimentos e à Prof^a. Dr^a. Carla Columbano Oliveira que conduziu a transformação da levedura *S. cerevisiae* W303-181.

CAPÍTULO VI

INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO INICIAL DE GLICOSE E DO TEMPO DE ALIMENTAÇÃO NA PRODUÇÃO DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE DE *Saccharomyces cerevisiae* RECOMBINANTE CULTIVADA POR PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO

Palavras-chave: glicose-6-fosfato desidrogenase, *Saccharomyces cerevisiae*, processo descontínuo alimentado.

6.1. Resumo

Uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 foi utilizada para produzir glicose-6-fosfato desidrogenase, em cultivo aeróbio, por processo descontínuo alimentado conduzido em fermentador de bancada de 3 L. Estudou-se a influência da concentração inicial de glicose e o tempo de alimentação do biorreator. Foram feitos 5 cultivos (C1, C2, C3, C4 e C5), os cultivos C1 e C2 foram alimentados com uma solução de glicose a 80 g/L desde o início do cultivo por 5 e 11 h, respectivamente. Os cultivos C3 e C4 tiveram início com uma fase descontínua com concentração inicial de glicose de 10 g/L e alimentação com solução de glicose a 50 g/L por 3 e 5 h, respectivamente. O cultivo C5 teve início com uma fase descontínua com concentração inicial de glicose de 5 g/L e alimentação com uma solução de glicose a 65 g/L por 5 h. As produções em células e em enzimas alcançadas pelos cultivos C1, C4 e C5 apresentaram valores muito próximos (3,13 g/L e 3249 U/L, 4,10 g/L e 3773 U/L e 3,16 g/L e 3599 U/L, respectivamente), portanto, pode-se concluir que a concentração inicial de glicose não influenciou a formação de biomassa ou a produção de enzima. Contudo, determina as máximas velocidades específicas de crescimento celular e de produção de G6PDH, com as maiores velocidades correspondendo às menores concentrações iniciais. Nos cultivos alimentados desde o início do processo, o aumento do tempo de alimentação de 3 para 5 h favoreceu a formação de biomassa sem prejudicar a produção de G6PDH.

6.2. Introdução

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é freqüentemente usada como microrganismo hospedeiro para expressão de proteínas heterólogas, pois além de ser reconhecida como um microrganismo seguro, é capaz de promover modificações pós-traducionais em proteínas, como a glicosilação e/ou outras modificações necessárias para a ótima atividade biológica e estabilidade protéica (ZIGOVA, 2000). A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (EC.1.1.1.49) é a primeira enzima da via das pentoses, catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfoglucono- δ -lactona reduzindo NADP⁺ e/ou NAD⁺. É responsável por fornecer pentoses para a síntese de nucleotídeos, bem como NADPH e/ou NADH para biossínteses redutoras e proteção de *stress* oxidativo (COSGROVE *et al.*, 1998). Esta enzima, de grande interesse como reagente analítico, pode ser utilizada para a determinação de teores de glicose (CHATEL *et al.*, 1987) e na determinação de atividade de creatino-quinase (BERGMEYER, 1983).

A síntese de produtos de gene clonado é influenciada por fatores genéticos e ambientais, incluindo estabilidade do plasmídeo e número de cópias, força do promotor, velocidade específica de crescimento celular e composição do meio de cultivo (CHIRUVOLU *et al.*, 1996). A determinação de condições operacionais ótimas para processos fermentativos usando microrganismos recombinantes é muito difícil, isso devido à complexidade adicional no processo de segregação ou da instabilidade estrutural do plasmídeo (SHENE *et al.*, 2000).

Processos fermentativos em regime descontínuo alimentado têm sido empregados para a produção de vários bioprodutos, como xilitol (BAE *et al.*, 2004), β -galactosidases (CORTÉS *et al.*, 2005) e enteroquinase (KIM *et al.*, 2005). Mais eficiente que o processo descontínuo, o processo descontínuo alimentado é vantajoso quando a mudança da concentração de nutrientes afeta a produtividade e o rendimento do produto desejado (YAMANE, SHIMIZU, 1984). O excesso ou carência de nutrientes podem comprometer tanto o crescimento celular quanto a obtenção do produto desejado, assim, o desenvolvimento de uma estratégia adequada de alimentação é crítica nesse tipo de processo (LEE *et al.*, 1999).

Neste trabalho, estudou-se a influência da concentração inicial de glicose e o tempo de alimentação na produção de G6PDH de *S. cerevisiae* W303-181, através de cultivos em regime descontínuo alimentado com vazão de alimentação

exponencialmente crescente. Essa levedura, desenvolvida por LOJUDICE *et al.* (2001), carrega um plasmídio contendo uma seqüência que codifica a G6PDH sob regulação do promotor PGK1.

6.3. Materiais e métodos

6.3.1. Materiais

Dimetilpolisiloxano, uracila, adenina, histidina, triptofano, NADP, β -mercaptoetanol e glicose-6-fosfato foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA), a glicose da MERCK (Darmstadt, Alemanha) e o YNB da Difco (Detroit, MI, EUA). Os demais reagentes foram de grau analítico. Fermentador de bancada de 3 L (Bioflo 110) e agitador rotativo (NBS Gyrotory Shaker) foram obtidos da New Brunswick Scientific Co. (Madison, NJ, EUA). Agitador de tubos vórtice (Q-220A, Quimis, Diadema, SP), centrífuga refrigerada (BR4i, Jouan, St. Herblain, França) e espectrofotômetro (DU 640, Beckman, Fullerton, CA, EUA).

6.3.2. Microrganismo e preparo do inóculo

A levedura *S. cerevisiae* W303-181, usada nesse trabalho, carrega um plasmídio contendo uma seqüência que codifica a G6PDH sob regulação do promotor PGK1. A cultura estoque de *S. cerevisiae* W303-181 foi mantida a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ em solução tampão acetato (0,1 mol/L, pH 5,7) contendo glicerol (30% v/v). O meio de cultivo utilizado para o crescimento do inóculo foi preparado em tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,7 e composto por glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina, histidina, uracila e triptofano 20 mg/L. O inóculo foi obtido após ativação celular e cultivo do pré-inóculo. Na fase de ativação celular, 900 μL de suspensão descongelada de leveduras foram adicionadas em 9,1 mL de meio de cultivo em um Erlenmeyer de 50 mL, o qual foi incubado em agitador rotativo a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. O pré-inóculo foi preparado após transferência de 10 mL da suspensão obtida na etapa de ativação celular para Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL de meio de cultivo e incubação em agitador rotativo a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. O inóculo foi preparado transferindo-se 10 mL da suspensão obtida na etapa de pré-inóculo para Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL de meio de cultivo e incubados em agitador rotativo a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 h.

6.3.4. Processo descontínuo alimentado

O inóculo (volume = 1,0 L) foi vertido em uma dorna de 3 L do biorreator de bancada contendo 0,5 L de meio de cultura (*yeast nitrogen base* (YNB) 29,6 g/L, 272 µg/mL de adenina, 188 µg/mL de uracila, 264 µg/mL de histidina e 320 µg/mL de triptofano) e a concentração celular inicial variou de 0,86 a 1,15 g/L. O tempo total de cultivo foi de 24 h. A formação de espuma foi controlada através da adição de 0,5 mL de dimetilpolisiloxano, quando necessário. A agitação e vazão específica de ar foram 200 rpm e 2,0 vvm, respectivamente, e o k_La de 42 h⁻¹. A vazão de ar foi medida e controlada, através de um rotâmetro, de forma a manter fixo o k_La durante o enchimento da dorna. O pH do meio durante o cultivo aeróbio foi medido por um eletrodo (Ingold, Woburn, MA, EUA) e mantido constante (pH 5,7) através da adição automática de soluções de NaOH a 0,5 mol/L e de H₂SO₄ a 0,5 mol/L e a temperatura, mantida a 30 °C. O processo teve início com 1,500 L (V_0), inóculo e meio de cultura (fonte de nitrogênio e micronutrientes), alimentado até a um volume total de 2,0 L (V_f), o tempo de alimentação (T) variou e a constante de tempo (K) 0,2h⁻¹. Durante o processo, o reator foi alimentado a cada 30 min por uma solução de glicose, cujo volume (V) foi calculado em função do tempo (t) de acordo com a equação 6.1.

Foram realizados cinco cultivos, nomeados C1, C2, C3, C4 e C5. Para o cultivo C1 e C2, que continham apenas glicose residual do inóculo, foi iniciada a alimentação de 500 mL de solução de glicose a 80 g/L durante as primeiras 5 e 11 h de cultivo, respectivamente. Os cultivos C3 e C4 tiveram início com uma fase descontínua, nas quais a concentração inicial de glicose era 10 g/L. Após exaurida a glicose, alimentou-se o reator com 500 mL de solução de glicose a 50 g/L por 3 e 5 h, respectivamente. O cultivo C5 teve início com uma fase descontínua, na qual a concentração inicial de glicose era 5 g/L e, exaurida essa glicose inicial, a alimentação do reator foi feita com 500 mL de solução de glicose a 65 g/L durante 5 h. Os ensaios foram feitos de modo a se empregar a mesma massa de glicose em todos eles.

$$(V - V_0) = (V_f - V_0) \frac{(e^{Kt} - 1)}{(e^{KT} - 1)} \quad (6.1)$$

6.3.5. Rompimento celular

Cinco mililitros de meio fermentado foram centrifugados (3025 g, por 30 min. a 6 °C) e o *pellet* ressuspendido em 5 mL da seguinte solução: Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5, MgCl₂ 5 mmol/L, EDTA 0,2 mmol/L, β-mercaptoetanol 10 mmol/L e ácido aminocapróico 2 mmol/L. Logo após, as células foram rompidas em vórtice, na presença de 7,45 g de pérolas de vidro (0,5 mm de diâmetro), durante 24 min. Os tubos foram mantidos resfriados através de banho de gelo. Os fragmentos celulares e as pérolas de vidro foram removidos por centrifugação (3025 g, por 30 min. a 6 °C) e o sobrenadante usado para medidas de atividade enzimática e de teor de proteínas.

6.3.6. Métodos analíticos

A concentração celular foi determinada utilizando-se de uma curva de calibração que correlaciona absorvância com massa seca. As absorvâncias foram medidas a 600 nm e utilizou-se água destilada como análise em branco. A concentração de glicose foi feita pela detecção de açúcares redutores totais, descrita por Somogyi (1952). A atividade de G6PDH foi feita de acordo com Bergmeyer *et al.* (1983) e o teor de proteínas totais de acordo com Lowry *et al.* (1951).

6.3.7. Parâmetros de cultivo

Produção em células (X_{prod}), fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), produtividade em células (Pr_X), produção em enzimas ($G6PDH_{prod}$), fator de conversão de substrato em enzima ($Y_{P/S}$), produtividade em enzimas (Pr_{enz}), atividade específica de G6PDG em relação a proteínas ($G6PDG/g_{prot}$), velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_X) e de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) foram calculados da seguinte forma:

$$X_{prod} = \Delta X \quad (6.2)$$

$$Y_{X/S} = \Delta M_X / \Delta M_S \quad (6.3)$$

$$Pr_X = \Delta X / \Delta t \quad (6.4)$$

$$G6PDH_{prod} = \Delta U_{max} \quad (6.5)$$

$$Y_{P/S} = \Delta u / \Delta M_S \quad (6.6)$$

$$Pr_{enz} = \Delta U_{max} / \Delta t \quad (6.7)$$

$$G6PDH / g_{prot} = u_{max} / M_X \quad (6.8)$$

$$\mu_X = \left(\frac{1}{M_X} \right) \left(\frac{dM_X}{dt} \right) \quad (6.9)$$

$$\mu_{G6PDH} = \left(\frac{1}{M_X} \right) \left(\frac{du}{dt} \right) \quad (6.10)$$

Em que: $\Delta M_X = (M_{Xf} - M_{Xi})$, $\Delta M_S = (M_{Si} - M_{Sf})$, $\Delta u = (u_f - u_i)$, $\Delta U_{max} = (U_{max} - u_i)$, $\Delta t = (t_f - t_i)$, $\Delta X = (X_f - X_i)$, $\Delta U_{max} = (U_{max} - U_i)$. M_{Xi} = massa celular inicial (g), M_{Xf} = massa celular final (g), M_{Si} = massa de glicose inicial (g), M_{Sf} = massa de glicose final (g), t_i = tempo inicial (h), t_f = tempo final (h), u_i = atividade de G6PDH inicial (U), u_f = atividade de G6PDH final (U), u_{max} = atividade de G6PDH (U) quando G6PDH por litro de meio é máxima, X_i = concentração celular inicial (g/L), X_f = concentração celular final (g/L), U_i = atividade de G6PDH inicial por litro de meio cultivado (U/L), U_f = atividade de G6PDH final por litro de meio cultivado (U/L) e U_{max} = atividade de G6PDH máxima por litro de meio cultivado.

6.4. Resultados e discussão

Foi avaliada, nesse trabalho, a influência da concentração inicial de glicose e do tempo de alimentação na produção de G6PDH por processo fermentativo descontínuo alimentado conduzido com vazão de alimentação exponencialmente crescente.

Em um trabalho anterior (Capítulo III), obtivemos bons resultados com a vazão de alimentação exponencialmente crescente, estabelecida pela constante de tempo $K = 0,2 \text{ h}^{-1}$ e tempo de alimentação de 5 h para a produção de G6PDH de *S. cerevisiae* W303-181. Dando continuidade aos estudos de produção de G6PDH por processo descontínuo alimentado, estudamos, nesse trabalho, diferentes estratégias

de processo para tentar aumentar produção da enzima. Essas estratégias compreenderam em variar o tempo de alimentação do biorreator, a concentração inicial de glicose e a concentração da solução de glicose adicionada.

Foram feitos dois cultivos nos quais a alimentação do reator era feita desde o início do processo. Essa alimentação foi feita com 500 mL de um solução de glicose a 80 g/L por 5 e 11 h, para os cultivos C1 e C2, respectivamente (Figura 6.1).

A Figura 6.2A, referente ao cultivo C1, mostra que a alimentação, feita durante as 5 primeiras horas de cultivo, levou a um acúmulo gradual de glicose no biorreator. A glicose atingiu a sua maior concentração (4,83 g/L) em aproximadamente 5 h e, durante as 3 primeiras horas de alimentação, as velocidades específicas de crescimento e de produção aumentam rapidamente e atingem seus valores mais altos ($0,222 \text{ h}^{-1}$ e 162 U/gh, respectivamente) (Figura 6.2B) (Tabela 6.1). O consumo total da glicose se dá em aproximadamente 12 h, momento no qual as velocidades de crescimento e de produção de enzima assumem valores desprezíveis. Mesmo sem glicose no meio, foi verificado pequeno crescimento celular que alcançou 4,28 g/L ao final do cultivo, enquanto a atividade de G6PDH, que atingiu seu valor máximo (4139 U/L) em 13 h de cultivo. A máxima produção em células e em G6PDH para esse cultivo foram 3,13 g/L e 3249 U/L, respectivamente.

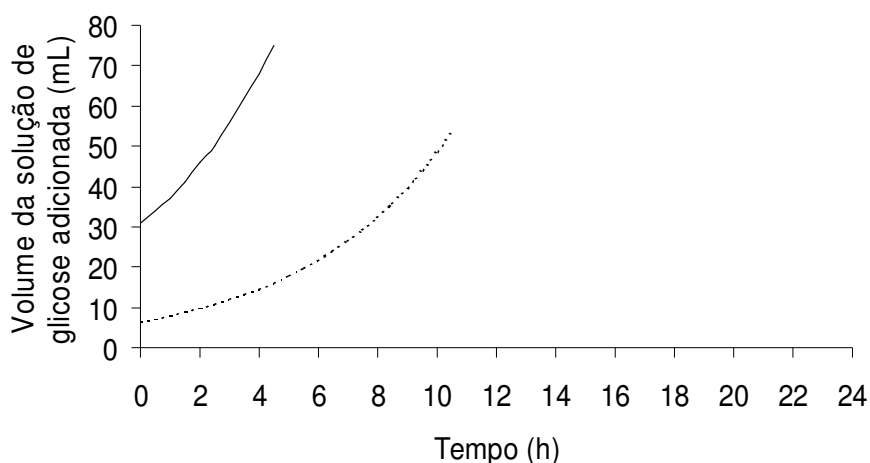
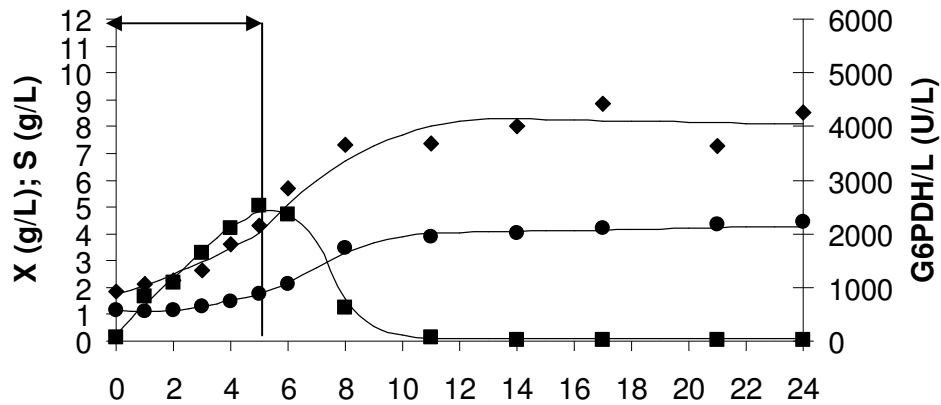


FIGURA 6.1 - Volume da solução de glicose a 80 g/L adicionada em função do tempo para os cultivos C1 e C2, alimentados durante 5 h (—) e 11 h (---), respectivamente.

A



B

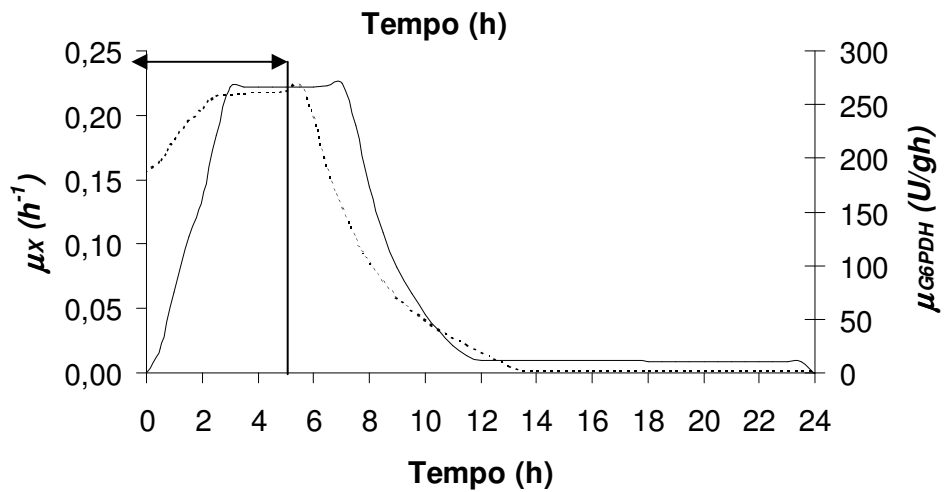


FIGURA 6.2 - Período de alimentação (\leftrightarrow), concentração celular (X) (-●-), concentração de glicose (S) (-■-), atividade de G6PDH (-◆-), velocidade específica de crescimento celular (μ_x) (-) e de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) (- -) em função do tempo para os cultivos em regime descontínuo alimentado. 6.2A e 6.2B: referente ao cultivo C1 (alimentação nas primeiras 5 h com glicose 80 g/L).

TABELA 6.1 – Parâmetros de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 em biorreator descontínuo alimentado para a produção de glicose-6-fosfato desidrogenase, sob diferentes concentrações iniciais de glicose e diferentes tempos de alimentação.

Parâmetros de cultivo	Cultivos em regime descontínuo alimentado nas diferentes concentrações iniciais de glicose (S_i) e diferentes tempos de alimentação (T)				
	S_i = sem adição		S_i = 10 g/L		S_i = 5 g/L
	C1 (T=5 h)	C2 (T=11 h)	C2 (T=3 h)	C4 (T=5 h)	C5 (T=5 h)
X_i (g/L)	1,15	0,89	0,86	1,00	1,07
X_{max} (g/L)	4,28	5,59	4,36	5,10	4,23
X_f (g/L)	1,28	5,59	4,36	5,10	4,23
X_{prod} (g/L)	3,13	4,54	3,50	4,10	3,16
$\mu_{x,max}$ (h^{-1})	0,222	0,171	0,145	0,138	0,167
Pr_x (g/Lh)	0,130	0,196	0,146	0,171	0,132
U_i (U/L)	890	587	408	718	920
U_{max} (U/L)	4139	3528	4387	4489	4519
U_f (U/L)	4044	3406	2994	2831	4402
$G6PDH_{prod}$ (U/L)	3249	2941	3979	3773	3599
$\mu_{p,max}$ (U/gh)	263	195	166	127	190
Pr_{enz} (U/Lh)	250	210	221	210	257
$G6PDH/g_{prot}$ (U/g)	8231	6856	8407	7981	8427
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,17	0,19	0,19	0,19	0,16
$Y_{P/S}$ (U/g)	182	154	188	172	185

Onde:

X_i	Concentração celular inicial (g/L)
X_{max}	Concentração celular máxima (g/L)
X_f	Concentração celular final (g/L)
X_{prod}	Células produzidas (g/L)
$\mu_{x,max}$	Velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})
Pr_x	Produtividade em células (g/Lh)
U_i	Atividade de G6PDH inicial por litro (U/L)
U_{max}	Atividade máxima de G6PDH por litro (U/L)
U_f/L	Atividade de G6PDH final por litro (U/L)
$G6PDH_{prod}$	Enzima produzida (U/L)
$\mu_{p,max}$	Velocidade específica máxima de produção (U/gh)
Pr_{enz}	Produtividade em enzimas (U/Lh)
$G6PDH/g_{prot}$	Atividade de G6PDH em relação a proteínas (U/g)
$Y_{X/S}$	Fator de conversão de substrato em células (g/g)
$Y_{P/S}$	Fator de conversão de substrato em enzimas (U/g)
S_i	Concentração inicial de glicose (g/L)
T.....	Tempo de alimentação (h)

Nesses cultivos, a vazão de alimentação foi calculada pela equação 6.1 e, como pode ser observado na Figura 6.1, quanto maior o tempo de alimentação, menor é a vazão. Dessa forma, ao se empregar o tempo de alimentação de 11 h, conseguiu-se manter os níveis de glicose próximos de zero durante quase todo o cultivo. Observou-se que a manutenção de baixas concentrações de glicose (<1,5 g/L) favoreceu o crescimento celular, pois a produção em células aumentou de 3,13 g/L no cultivo C1 para 4,54 g/L no cultivo C2. Ao analisar os fatores de conversão de substrato em células e produtividade em células nota-se que eles corroboram com essa idéia, pois ele aumenta de 0,17 g/g e 0,130 g/Lh do cultivo C1 para 0,191 g/g e 0,196 g/Lh do cultivo C2 (Tabela 6.1). Embora o cultivo C2 tenha apresentado maior produção em células, mostra uma velocidade específica de crescimento ($0,171 \text{ h}^{-1}$) menor que para o cultivo C1 ($0,222 \text{ h}^{-1}$) (Tabela 6.1). O maior valor de produção em células em C2 pode ser explicado através da análise do tempo de manutenção da máxima velocidade específica de crescimento, pois esse tempo aumentou com o aumento do tempo de alimentação (Figuras 6.2B e 6.3B).

Pouca ou nenhuma influência foi observada na produção de G6PDH. O cultivo C2 apresentou produção em enzimas (2941 U/L) similar à verificada para o cultivo C1 (3249 U/L) (Tabela 6.1). Da mesma forma, a produtividade em enzimas de C2 (250 U/Lh) foi, também, similar para C1 (210 U/Lh) (Tabela 6.1).

Os cultivos C3 e C4 tiveram início com uma fase descontínua e com glicose a 10 g/L. Após exaurida a glicose na fase descontínua, teve início a alimentação do biorreator. O volume de solução de glicose adicionada, calculado pela equação 6.1, é mostrado na figura 6.4. Essa alimentação foi feita com 500 mL de uma solução de glicose a 50 g/L por 3 e 5 h, para os cultivos C3 e C4, respectivamente (Figura 6.5 e 6.6).

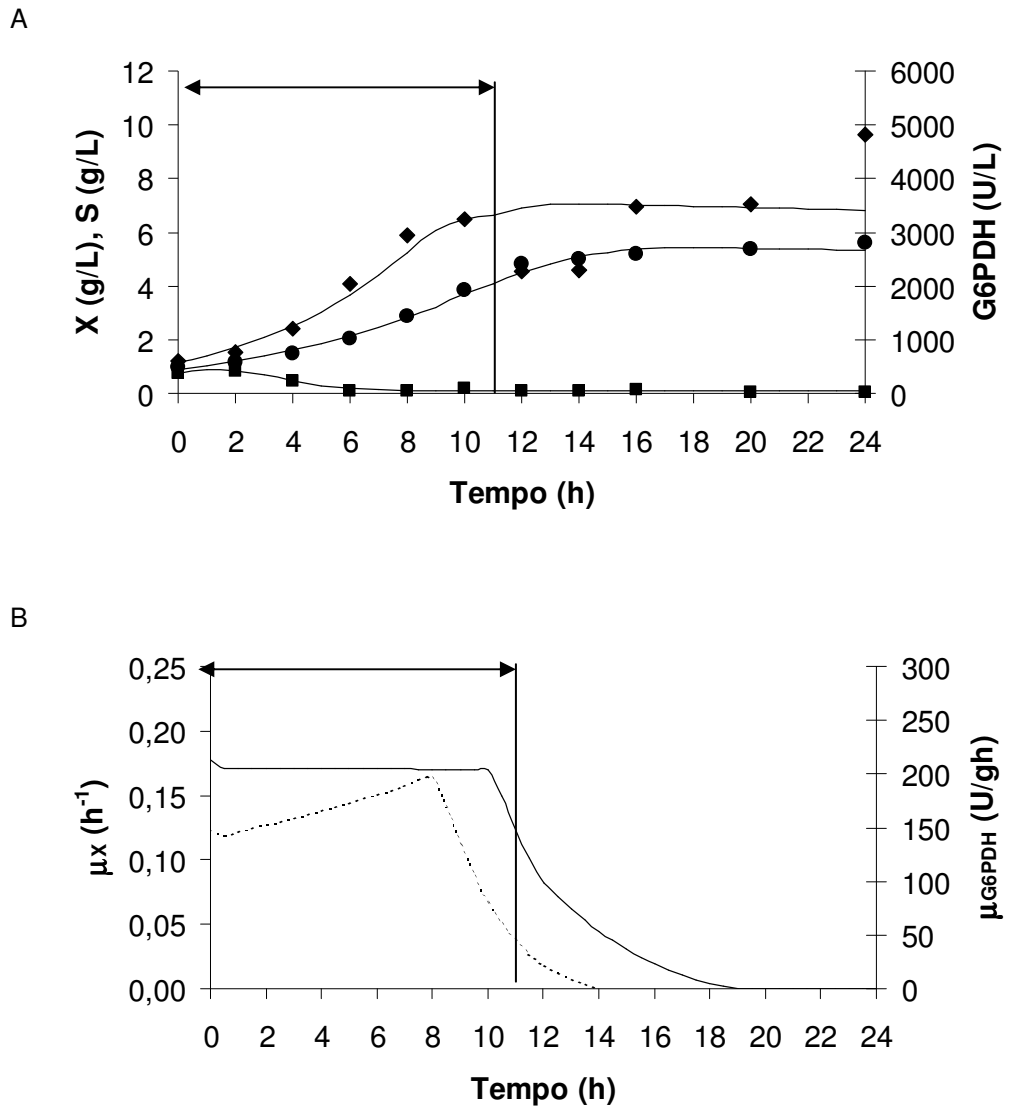


FIGURA 6.3 - Período de alimentação (\leftrightarrow), concentração celular (X) (-●-), concentração de glicose (S) (-■-), atividade de G6PDH (-◆-), velocidade específica de crescimento celular (μ_x) (-) e de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) (- -) em função do tempo para os cultivos em regime descontínuo alimentado. 6.3A e 6.3B: referente ao cultivo C2 (alimentação nas primeiras 11 h com glicose 80 g/L).

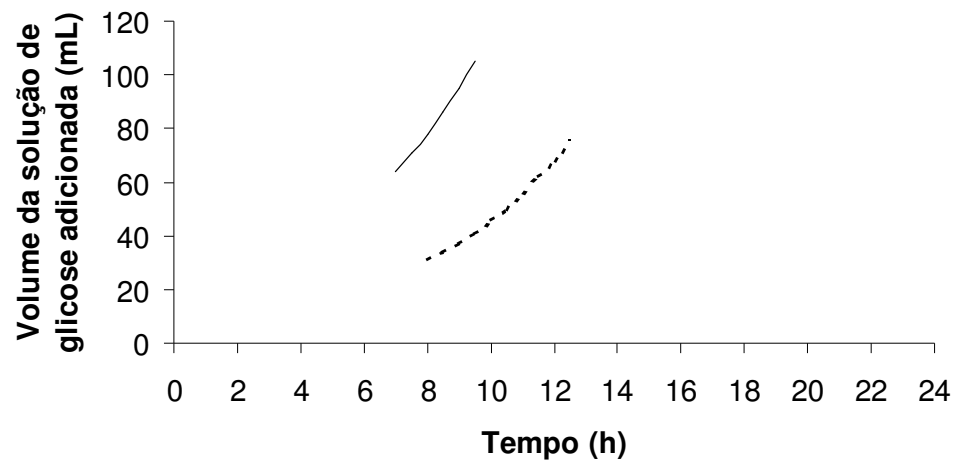


FIGURA 6.4 - Volume da solução de glicose a 80 g/L adicionada em função do tempo para os cultivos C3 e C4, alimentados durante 3 h (—) e 5 h (---), respectivamente.

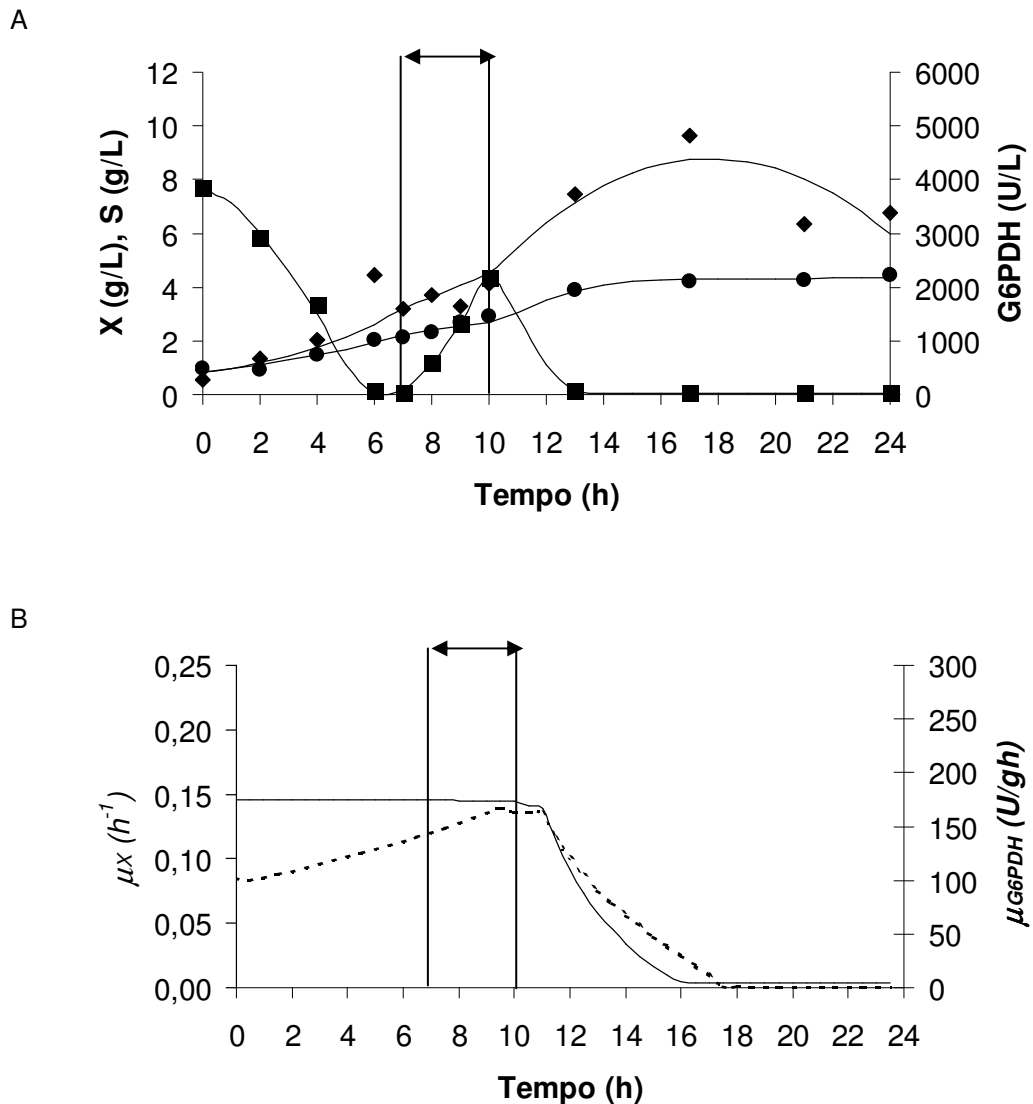


FIGURA 6.5 - Período de alimentação (\leftrightarrow), concentração celular (X) (-●-), concentração de glicose (S) (-■-), atividade de G6PDH (-◆-), velocidade específica de crescimento celular (μ_X) (-) e de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) (- -) em função do tempo para os cultivos em regime descontínuo alimentado. 6.5A e 6.5B: referente ao cultivo C3 (início com 10 g/L de glicose e alimentação com glicose a 50 g/L durante 3 h).

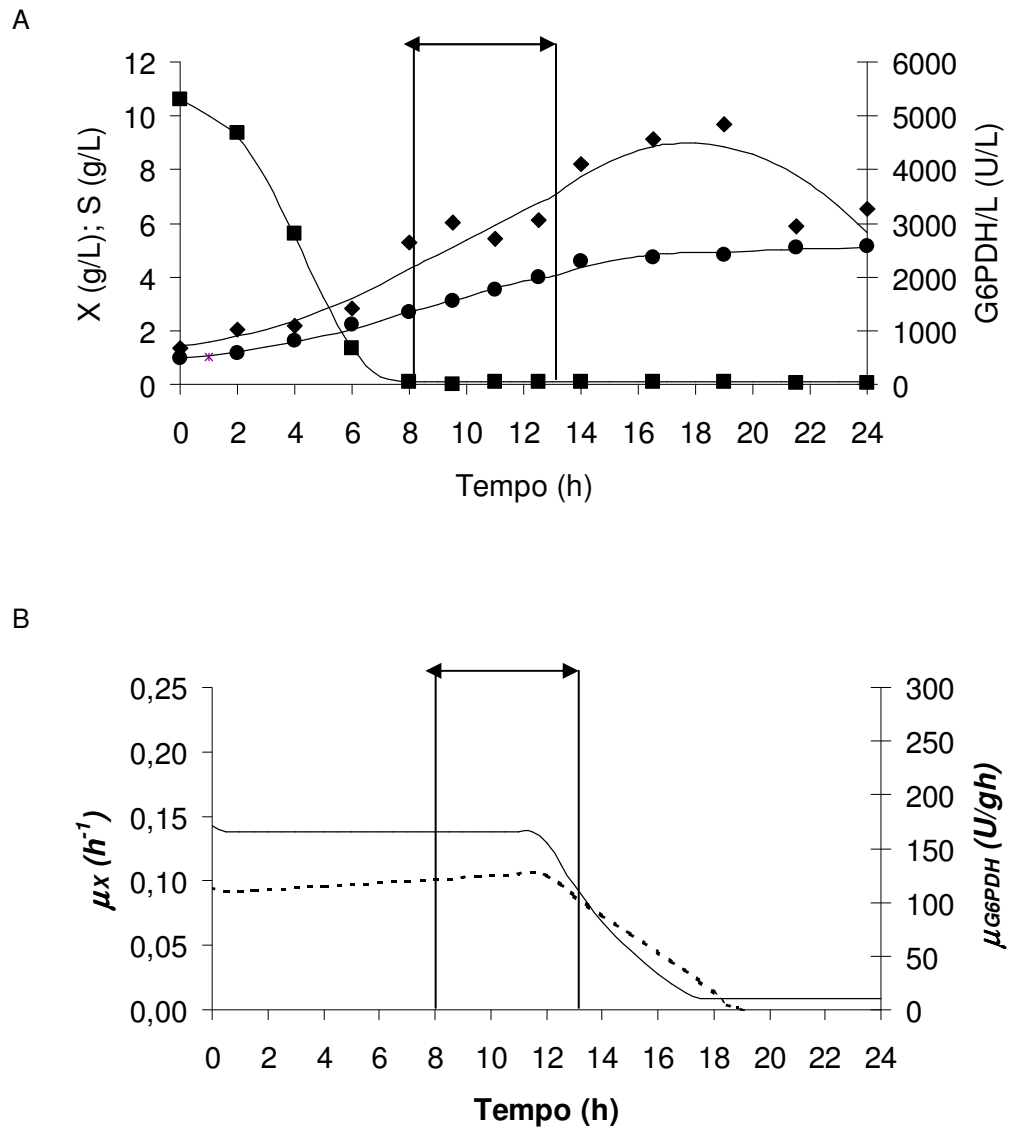


FIGURA 6.6 - Período de alimentação (\leftrightarrow), concentração celular (X) (-●-), concentração de glicose (S) (-■-), atividade de G6PDH (-◆-), velocidade específica de crescimento celular (μ_x) (-) e de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) (- -) em função do tempo para os cultivos em regime descontínuo alimentado. 6.6A e 6.6B: referente ao cultivo C4 (início com 10 g/L de glicose e alimentação com glicose a 50 g/L durante 5 h).

A figura 6.5A, referente ao cultivo C3, mostra que a glicose inicial foi totalmente consumida em 5 h de cultivo e, logo após esse período, teve início a alimentação. Houve um acúmulo gradual de glicose no biorreator que chegou a 4,34 g/L em 10 h de cultivo, contudo essa glicose foi totalmente consumida em 13 h de cultivo. Os valores máximos das velocidades específicas de crescimento e de produção ($\mu_x = 0,145 \text{ h}^{-1}$ e $\mu_{G6PDH} = 166 \text{ U/gh}$) foram mantidos durante a alimentação.

O consumo total da glicose se deu em aproximadamente 13 h, momento no qual as velocidades de crescimento e de produção de enzima assumem valores desprezíveis. Mesmo sem glicose no meio, foi verificado pequeno crescimento celular que alcançou 4,36 g/L ao final do cultivo, enquanto a atividade de G6PDH, que atingiu seu valor máximo (4387 U/L) em 18 h de cultivo, decaiu para 2994 U/L. A máxima produção em células e em G6PDH para esse cultivo foram 3,50 g/L e 3979 U/L, respectivamente (tabela 6.1).

A figura 6.6A, referente ao cultivo C4, mostra que a glicose inicial foi totalmente consumida em 8 h de cultivo e, em seguida, teve início a alimentação. Toda a glicose adicionada no período da alimentação foi consumida e não houve o seu acúmulo no biorreator. Os valores das velocidades de crescimento e de produção ($0,138 \text{ h}^{-1}$ e 127 U/gh , respectivamente) foram mantidos por praticamente todo o período em que havia glicose no biorreator. Somente após o consumo total da glicose é que essas velocidades reduziram drasticamente.

Foi verificado, também, um pequeno crescimento celular na ausência de glicose no meio, que alcançou 5,10 g/L ao final do cultivo. A atividade de G6PDH, que atingiu seu valor máximo (4489 U/L) em 19 h, decaiu para 2831 U/L no final do cultivo. A máxima produção em células e em G6PDH para esse cultivo foram 4,10 g/L e 3773 U/L, respectivamente (Tabela 6.1).

Ao analisar os dados desses cultivos que iniciaram com fase descontínua com glicose a 10 g/L, fica evidente que, nesse caso, o aumento do tempo de alimentação não favoreceu a formação de biomassa ou a produção de enzimas. Seus valores de produção em células (3,50 e 4,10 g/L para C3 e C4, respectivamente), produção em enzimas (3979 e 3773 U/L para C3 e C4, respectivamente) e fatores de conversão de substrato em produto (188 e 172 U/g para C3 e C4, respectivamente) e de substrato em células (0,185 e 0,189 g/g para C3 e C4, respectivamente) (Tabela 6.1) foram similares. Ainda, embora toda a

glicose adicionada no cultivo C4 foi imediatamente consumida, os resultados mostram que não houve limitação do crescimento celular e produção de enzimas pela fonte de carbono.

O cultivo C5 teve início com uma fase descontínua de 5 g/L de glicose e, logo após o seu consumo total, procedeu-se a alimentação, com 500 mL de um solução de glicose a 65 g/L por 5 h (Figura 6.7). O volume de solução de glicose adicionada, calculada pela equação 6.

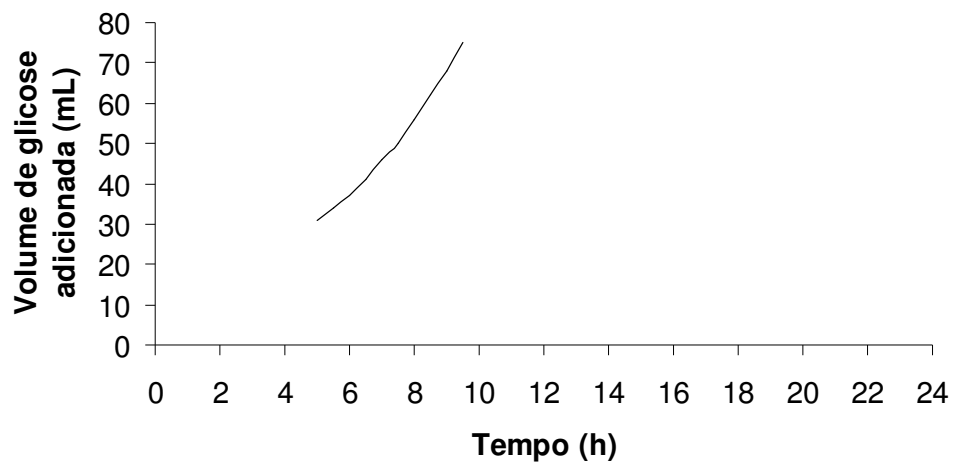


FIGURA 6.7 - Volume da solução de glicose a 80 g/L adicionada em função do tempo para o cultivo alimentado C5, durante 5 h.

Durante a alimentação, houve um pequeno acúmulo de glicose no biorreator, não superando 0,40 g/L, e essa glicose foi totalmente consumida em 12 h de cultivo, como pode ser visto na figura 6.8A. Ocorreu crescimento celular após o esgotamento da glicose do meio, que alcançou 4,23 g/L ao final do cultivo, enquanto a concentração de G6PDH, que havia alcançado 4519 U/L, decaiu para 4002 U/L. A máximas produções em células e em G6PDH para esse cultivo foram 3,16 g/L e 3599 U/L (Tabela 6.1).

Ao se comparar os resultados daqueles cultivos que tiveram início com diferentes concentrações iniciais de glicose (C1, C4 e C5), porém, com mesmo tempo de alimentação (5 h), pode-se concluir que a concentração inicial de glicose não favoreceu a formação de biomassa ou a produção de enzima. A produção em células e em enzimas obtidas nos cultivos C1, C4 e C5 apresentou valores similares (3,13 g/L e 3249 U/L, 4,10 g/L e 3773 U/L e 3,16 g/L e 3599 U/L para C1, C4 e C5, respectivamente) (Tabela 6.1). Contudo, verificou-se que a concentração inicial de glicose e a concentração da glicose alimentada são fatores capazes de impor e controlar uma determinada velocidade específica de crescimento e de produção. As velocidades específicas máximas de crescimento celular ($0,222$, $0,167$ e $0,138$ h⁻¹) e de produção de G6PDH (268, 195 e 127 U/gh) decresceram com o aumento da concentração inicial de glicose (0, 5 e 10 g/L) (Tabela 6.1). Níveis aproximados de produção em células e em G6PDH foram observados para os diferentes cultivos que com diferentes valores de velocidades de crescimento e de produção. Contudo, esses níveis aproximados podem ser explicados através da análise do tempo de manutenção das máximas velocidades de crescimento e produção de G6PDH, pois esse tempo aumentou com a diminuição dos valores de concentração inicial de glicose (Figuras 6.2B, 6.6D e 6.8B).

Os cultivos, de um modo geral, apresentaram pequeno crescimento celular após o esgotamento da glicose, característica de crescimento diáuxico. SILVA *et al.* (2002) observaram o mesmo fenômeno ao estudar a produção de G6PDH de *S. cerevisiae* de fermento prensado, segundo esses autores, provavelmente o etanol produzido durante o cultivo estaria sendo utilizado para crescimento.

As Figuras 6.2B, 6.3B, 6.5B, 6.6B e 6.8B mostram, também, que a produção da enzima é associada ao crescimento celular, pois, ambas as curvas, em todos os cultivos, apresentam o mesmo perfil (HISS, 2001).

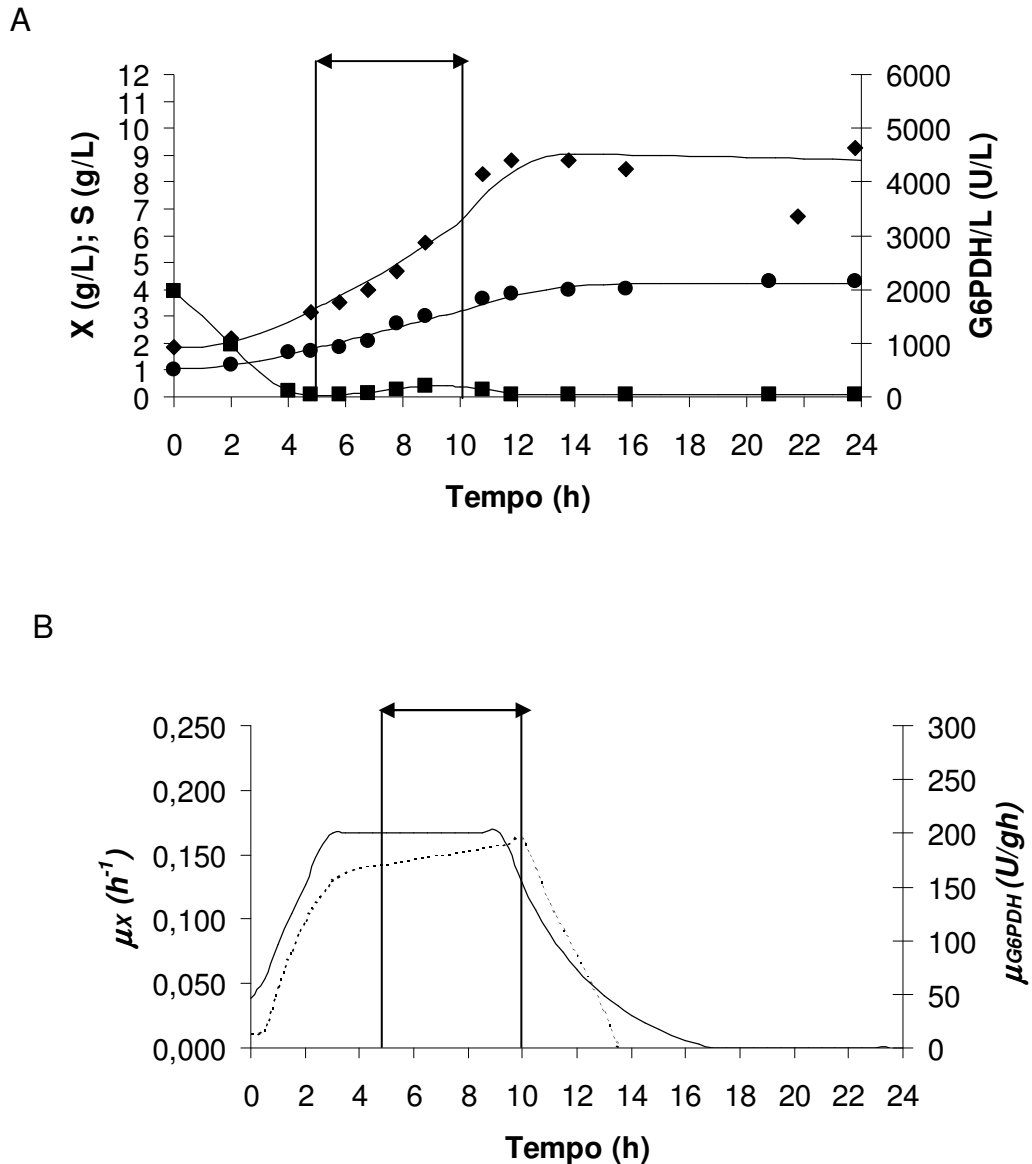


FIGURA 6.8 - Período de alimentação (\leftrightarrow), concentração celular (X) ($-●-$), concentração de glicose (S) ($-■-$), atividade de G6PDH ($-◆-$), velocidade específica de crescimento celular (μ_x) ($-$) e de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) ($- -$) em função do tempo para os cultivos em regime descontínuo alimentado. 6.8A e 6.8B: referente ao cultivo C5 (início com 5 g/L de glicose e alimentação com glicose a 65 g/L durante 5 h).

6.5. Conclusão

Concluiu-se que a concentração inicial de glicose não influenciou a formação de biomassa ou a produção de enzimas. Contudo, determina e as máximas velocidades específicas de crescimento celular e de produção de G6PDH, com as maiores velocidades correspondendo às menores concentrações iniciais. Nos cultivos alimentados desde o início do processo, o aumento do tempo de alimentação de 3 para 5 h favoreceu a formação de biomassa sem prejudicar a produção de G6PDH.

6.6. Agradecimentos

Ângelo Samir Melim Miguel agradece à FAPESP/Brasil, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro, ao Dr. Dante Augusto Moraes peça assistência nos experimentos e à Prof^a. Dr^a. Carla Columbano Oliveira que conduziu a transformação da levedura *S. cerevisiae* W303-181.

CAPÍTULO VII

INFLUÊNCIA DO AMINOÁCIDO LEUCINA NA PRODUÇÃO DE GLICOSE-6-FOSFATO DESIDROGENASE POR *Saccharomyces cerevisiae* W303-181

Palavras-chave: glicose-6-fosfato desidrogenase, *Saccharomyces cerevisiae*, leucina.

7.1. Resumo

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) apresenta grande interesse como reagente analítico e é utilizada em vários ensaios quantitativos, entre eles, determinação da concentração de glicose, atividade de creatino-quinase e hexoquinase. A levedura *S. cerevisiae* W303-181 carrega um plasmídio contendo uma seqüência que codifica a G6PDH sob regulação do promotor PGK1 e um marcador Leu2. Essa cepa deve crescer em meio isento de leucina para evitar a perda do plasmídio. Portanto, objetivo desse trabalho foi avaliar a influência da leucina na produção de G6PDH em cultivos *S. cerevisiae* W303-181. Foram feitos 4 cultivos empregando um meio de cultivo sintético composto por glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina 68 mg/L, uracila 47 mg/L, triptofano 80 mg/L e histidina 66 mg/L e empregando-se diferentes concentrações de leucina (0, 80, 160 e 240 mg/L). Estudou-se, ainda, um outro meio de cultivo composto por 20 g/L de ART (açúcares redutores totais) de melaço de cana-de-açúcar e extrato de levedura obedecendo a relação C:N (carbono:nitrogênio) igual a 10. As produções em células e em enzimas, para o meio sintético com diferentes teores de leucina, apresentaram uma pequena variação, 2,49-2,94 g/L e 1991-2447 U/L, respectivamente. Os perfis das velocidades específicas de crescimento celular e de produção de G6PDH foram idênticos e seus valores máximos variaram pouco, 146-163 h⁻¹ e 124 e 162 U/gh, respectivamente. Concluiu-se que teores de leucina entre 0-240 mg/L não influenciaram o crescimento celular ou produção de enzima nos cultivos estudados, indicando que a cepa empregada apresenta um plasmídio estável no tocante à sua manutenção na célula.

7.2. Introdução

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) (EC.1.1.1.49), a primeira enzima da via das pentoses-fosfato, catalisa a oxidação da glicose-6-fosfato a 6-fosfoglucono- δ -lactona, reduzindo NADP⁺ e/ou NAD⁺. Essa via é responsável por fornecer pentoses-fosfato para a síntese de nucleotídeos, bem como NADPH e/ou NADH para biossínteses redutoras e proteção de *stress* oxidativo (COSGROVE *et al.*, 1998; ÖZER *et al.*, 2001; ROWLAND *et al.*, 1994). Esta enzima de grande interesse como reagente analítico é utilizada em vários ensaios quantitativos, entre eles, atividade de creatino-quinase no diagnóstico de doenças da musculatura esquelética cardíaca (BERGMEYER, 1983), determinação da concentração de glicose (CHATEL *et al.*, 1996, MORI *et al.*, 1999). Tem aplicação na composição de biossensores para a detecção de fosfatos (PARELLADA *et al.*, 1998) e de glicose-6-fosfato sérica (BASSI *et al.*, 1999) e, ainda, pode ser usado como marcador para reações de hibridização de ácidos nucleicos (BALAGUER *et al.* 1989). A G6PDH é encontrada em células animais e vegetais, além de microrganismos, dentre os quais destaca-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (SILVA *et al.*, 2002).

SILVA (2000) estudou a produção de G6PDH de *S. cerevisiae* de fermento prensado. Contudo, segundo LOJUDICE *et al.*, (2001), há uma perspectiva real de redução de custos no processo de produção de enzimas em função do desenvolvimento de cepas superprodutoras obtidas por manipulação genética. Portanto, esses autores desenvolveram a *S.cerevisiae* W 303-181, superprodutora de G6PDH.

A síntese de produtos de gene clonado é influenciada por fatores genéticos e ambientais, incluindo estabilidade e número de cópias do plasmídeo, força do promotor, velocidade específica de crescimento celular e composição do meio de cultivo (CHIRUVOLU *et al.*, 1996). A determinação de condições operacionais ótimas para processos fermentativos com microrganismos recombinantes é muito difícil, isso devido à complexidade adicional no processo de segregação ou da instabilidade estrutural do plasmídeo. A perda do plasmídeo pela célula depende das suas características de construção, condições do meio e velocidade com que o microrganismo se desenvolve (SHENE *et al.*, 2000).

Muitas células recombinantes necessitam de um meio de cultivo especial para que se evite a perda do plasmídeo. Todavia, a composição desse meio tem um papel

importante no desenvolvimento de processos fermentativos (CHIRUVOLU *et al.*, 1996). O enriquecimento do meio de cultivo permite alcançar altos rendimentos em biomassa e decréscimo da proteólise do produto, o que levaria a um substancial aumento da produtividade de proteínas recombinantes secretadas (DHURJATI, COPELLA, 1989; GABRIELSEN, *et al.*, 1990). Nesse sentido, WANG e Da SILVA (1993) verificaram um aumento na síntese e secreção de invertase, via meio enriquecido, em uma cepa de *S. cerevisiae* recombinante. Isso, talvez, seja devido ao suprimento adequado de energia e de precursores para o crescimento celular e síntese protéica (CHOI *et al.*, 1996). CHEN *et al.* (1993), ao estudarem a produção de elafin em *S. cerevisiae* recombinante, verificaram que a suplementação do YNB com casaminoácido permitiu alcançar os maiores rendimentos em biomassa, porém, não era garantida a obtenção de altos rendimentos da biomolécula secretada. Esse incremento do rendimento celular pode ser interessante quando se trabalha com produtos intracelulares.

A levedura *S. cerevisiae* W303-181, modificada por LOJUDICE *et al.* (2001), carrega um plasmídeo contendo uma seqüência que codifica a G6PDH sob regulação do promotor PGK1 e em marcador de Leu2. Essa cepa é auxotrófica para alguns micronutrientes (adenina, histidina, triptofano e uracila) que, portanto, devem estar presentes no meio de cultivo. Além disso, essa cepa deve crescer em meio de cultivo ausente de leucina para que não ocorra a perda do plasmídeo.

DANESI *et al.* (2004) estudaram a produção de G6PDH empregando um meio de cultivo composto por melaço de cana-de-açúcar e extrato de leveduras e encontraram atividade enzimática 3,7 vezes maior que quando a cepa era cultivada em meio sintético ausente de leucina. Contudo, aparentemente, os teores de leucina não chegaram a comprometer a produção da enzima durante o período de cultivo estudado.

Portanto, esse trabalho tem como objetivo avaliar a influência da leucina na produção de G6PDH em cultivos *S. cerevisiae* W303-181.

7.3. Materiais e métodos

7.3.1. Materiais

Dimetilpolisiloxano, uracila, adenina, histidina, triptofano, leucina, NADP, β -mercaptoetanol e G6P foram obtidos da Sigma[®] (St. Louis, MO, EUA), a glicose da

MERCK (Darmstadt, Alemanha), o YNB (*Yeast Nitrogen Base*) e extrato de levedura da Difco[®] (Detroit, MI, EUA). O melaço de cana-de-açúcar foi obtido da Usina Açucareira Ester (Cosmópolis, SP). Todos os demais reagentes utilizados foram de grau analítico. Foi utilizado um agitador rotativo NBS Gyrotory Shaker, New Brunswick Co., Medson, NJ, EUA), agitador de tubos vórtice (Q-220A, Quimis, Diadema, SP), centrífuga refrigerada (BR4i, Jouan, St. Herblain, França) e espectrofotômetro (DU 640, Beckman, Fullerton, CA, EUA).

7.3.2. Microrganismo e preparo do inóculo

A levedura *S. cerevisiae* W303-181 foi empregada nos cultivos e carrega um plasmídeo contendo uma seqüência que codifica a G6PDH sob regulação do promotor PGK1. A cultura estoque é mantida a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ em solução tampão acetato (0,1 mol/L, pH 5,7) contendo glicerol (30% v/v) como crioprotetor. O meio de cultivo utilizado para o crescimento do inóculo foi preparado em tampão acetato 0,1 mol/L, pH 5,7, composto por glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina, histidina, uracila e triptofano 20 mg/L. O inóculo foi obtido após ativação celular e cultivo do pré-inóculo. Na fase de ativação celular, 900 μL de suspensão descongelada de leveduras foi adicionada a 9,1 mL de meio de cultivo em um Erlenmeyer de 50 mL e incubado em agitador rotativo (New Brunswick Scientific Co.) a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. O pré-inóculo foi preparado após transferência de 10 mL da suspensão obtida na etapa de ativação celular para Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL de meio de cultivo e incubação em agitador rotativo (New Brunswick Scientific Co.) a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. O inóculo foi preparado transferindo-se 10 mL da suspensão obtida na etapa de pré-inóculo para Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL de meio de cultivo e incubados em agitador rotativo (New Brunswick Scientific Co.) a 100 rpm, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 16 h. Após esse período, a suspensão de leveduras foi centrifugada a 3025xg, a $6\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min, o sobrenadante foi descartado e a massa celular foi utilizada para inocular os Erlenmeyers contendo diferentes concentrações de micronutrientes.

7.3.3. Cultivos em agitador rotativo

Os cultivos foram conduzidos em Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio de cultivo e concentração celular inicial de 0,89-1,14 g/L. Foram realizados cultivos em 5 diferentes condições, de acordo com a Tabela 1.

TABELA 7.1 – Tipo de meio e teor de leucina para cada cultivo.

Cultivos	Tipo de meio	Teor de leucina (mg/L)
C1	G+YNB	0
C2	G+YNB	80
C3	G+YNB	160
C4	G+YNB	240
C5	M+EL	168-227*

Em que :

G+YNB: meio de cultivo tamponado (tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,7) e composto por glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina a 68 mg/L, uracila a 47 mg/L, triptofano a 80 mg/L e histidina a 66 mg/L.

M+EL: 20 g/L de ART (açúcares redutores totais) de melaço de cana-de-açúcar clarificado e extrato de levedura obedecendo a relação C:N (carbono:nitrogênio) igual a 10. O meio de cultivo teve seu pH ajustado para 5,7 através da adição de NaOH 3 mol/L e/ou H₂SO₄ 3 mol/L, quando necessário.

* estimou-se uma faixa para a variação do teor de leucina do meio de cultivo baseado em dados apresentados por REGULY (1998) e SANTUCCI *et al.* (2003).

O melaço de cana-de-açúcar empregado foi previamente clarificado. A clarificação consistiu em adicionar 1,5 g de NaH₂PO₄ no melaço diluído a 1:2 com água destilada e autoclavar a 121 °C por 10 min. Após ficar em repouso por 48 h, o sobrenadante foi recolhido e diluído para obter 20 g/L de ART.

Os cultivos foram realizados em agitador rotativo a 100 rpm, 30°C por 24 h.

7.3.4. Rompimento celular

Uma amostra de 5 mL de meio fermentado foi centrifugado (3025xg, por 30 min. a 6 °C) e o *pellet* ressuspendido em 5 mL da seguinte solução: Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5, MgCl₂ 5 mmol/L, EDTA 0,2 mmol/L, β-mercaptoetanol 10 mmol/L e

ácido aminocapróico 2 mmol/L. Logo após, as células foram rompidas em vórtice, na presença de 7,45 g de pérolas de vidro (0,5 mm de diâmetro), durante 24 min. Os tubos foram mantidos resfriados através de banho de gelo. Os fragmentos celulares e as pérolas de vidro foram removidos por centrifugação (3025xg, por 30 min. a 6 °C) e o sobrenadante usado para medidas de atividade enzimática e de teor de proteínas.

7.3.5. Métodos analíticos

A concentração celular foi determinada utilizando-se de uma curva de calibração que correlaciona absorvância com a massa seca. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (DU 640, Beckman) a 600 nm, utilizando-se água destilada como análise em branco. A concentração de glicose foi determinada pela técnica de detecção de açúcares redutores totais (ART), descrita por SOMOGYI (1952). A atividade enzimática de G6PDH foi feita de acordo com BERGMEYER *et al.* (1983). O teor de proteínas totais foi obtido utilizando-se a metodologia proposta por LOWRY *et al.* (1951).

7.3.6. Parâmetros de cultivo

Células produzidas (X_{prod}), fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$), produtividade em células (Pr_X), enzima produzida ($G6PDH_{prod}$), fator de conversão de substrato em enzima ($Y_{P/S}$), produtividade em enzimas (Pr_{enz}), atividade específica de G6PDH em relação a proteínas ($G6PDH/g_{proteína}$), atividade específica de G6PDH em relação a células ($G6PDH/g_{célula}$), produção em proteínas ($Prot_{prod}$), velocidades específicas máximas de crescimento celular (μ_X) e de produção de G6PDH (μ_{G6PDH}) foram calculados da seguinte forma:

$$X_{prod} = \Delta X \quad (7.1)$$

$$G6PDH_{prod} = \Delta U \quad (7.2)$$

$$Y_{X/S} = \Delta X / \Delta S \quad (7.3)$$

$$Y_{P/S} = \Delta U / \Delta S \quad (7.4)$$

$$Pr_X = \Delta X / \Delta t \quad (7.5)$$

$$Pr_{enz} = \Delta U / \Delta t \quad (7.6)$$

$$G6PDH / g_{proteína} = U / prot. \quad (7.7)$$

$$G6PDH / g_{célula} = U / X \quad (7.8)$$

$$\mu_x = \left(\frac{1}{X} \right) \left(\frac{dX}{dt} \right) \quad (7.9)$$

$$\mu_{G6PDH} = \left(\frac{1}{X} \right) \left(\frac{dU}{dt} \right) \quad (7.10)$$

$$Prot_{prod} = \Delta Prot \quad (7.11)$$

Em que: $\Delta t = (t_f - t_i)$, $\Delta X = (X_f - X_i)$, $\Delta U = (U_f - U_i)$, $\Delta Prot_{prof} = (Prot_i - Prot_f)$, t_i = tempo inicial (h), t_f = tempo final (h), $prot.$ = teor de proteínas totais (g/L), $Prot_i$ = teor de proteínas totais no início do cultivo (g/L), $Prot_f$ = teor de proteínas totais no final do cultivo (g/L), X_i = concentração celular inicial (g/L), X_f = concentração celular final (g/L), U_i = atividade de G6PDH inicial por litro de meio cultivado (U/L), U_f = atividade de G6PDH final por litro de meio cultivado (U/L).

7.4. Resultados e discussão

LOJUDICE *et al.* (2001) desenvolveram uma cepa de levedura geneticamente modificada, a *S. cerevisiae* W303-181, que expressa em grandes quantidades a enzima G6PDH. O meio de cultivo empregado por esses autores era composto por glicose 20 g/L, YNB (*Yeast Nitrogen Base*) 7,4 g/L e 20 mg/L de micronutrientes (adenina, histidina, triptofano e uracila). Essa cepa deveria ser cultivada em meio de cultivo ausente de leucina, pois ela carrega em seu plasmídio o marcador Leu2, que torna o plasmídio responsável pela síntese de leucina, que é indispensável para a sobrevivência do microrganismo.

DANESI *et al* (2005) cultivaram, com sucesso, a *S. cerevisiae* W303-181 para a produção de G6PDH em um meio de cultivo composto por melaço de cana-de-açúcar e extrato de leveduras, o qual apresenta leucina em sua composição. Portanto, fez-se necessário um estudo mais detalhado do cultivo dessa levedura na presença de leucina a fim de determinar a sua influência na produção de G6PDH. A *S. cerevisiae* W303-181 foi cultivada em meio G+YNB (glicose 20 g/L, YNB 7,4 g/L, adenina a 68 mg/L, uracila a 47 mg/L, triptofano a 80 mg/L e histidina a 66 mg/L) contendo leucina em diferentes concentrações (0, 80, 160 e 240 mg/L). Além desses, um outro cultivo foi feito usando meio M+EL (melaço de cana-de-açúcar 20

g/L de ART (açúcares redutores totais) de e extrato de levedura obedecendo a relação C:N (carbono:nitrogênio) igual a 10) (Tabela 7.1).

Como pode ser observado na figura 7.1, os cultivos C1, C2, C3 e C4, conduzidos com meio de cultivo G+YNB com diferentes teores de leucina apresentaram o mesmo perfil de crescimento celular, consumo de ART e produção de G6PDH. A produção em células e em enzimas apresentou uma pequena variação, 2,49-2,94 g/L e 1991-2447 U/L, respectivamente, como pode ser visto na Tabela 7.2. A figura 7.3 mostra que os perfis das velocidades específicas de crescimento celular e de produção de G6PDH foram idênticos e, ainda, seus valores máximos variaram pouco, 146-163 h⁻¹ e 124 e 162 U/gh, respectivamente (Tabela 7.2). Ainda, como pode ser visto na tabela 7.2, foi pequena, também, a variação de outros parâmetros como produtividade em enzimas (207-234 U/Lh) e em células (288-263 g/Lh), atividade específica de G6PDH em relação ao teor de proteínas (5494-5945 U/g) e em relação à células (764-866 U/g) e fatores de conversão de substrato em células (0,116-0,140 U/g) e substrato em enzimas (110-120 U/g). Esses resultados confirmam, então, que concentrações de leucina compreendidas entre 0-240 mg/L não apresentaram influência na formação de biomassa ou na produção de enzima, em cultivos de 24 h.

O cultivo C5, no qual foi empregado o M+EL, apresentou perfil de crescimento celular, consumo de ART e produção de G6PDH é diferente dos demais (Figura 7.1). As suas velocidades máximas de crescimento (0,064 h⁻¹) e de produção (100 U/gh) foram menores que a dos demais cultivos. Contudo, o cultivo manteve-se por mais tempo nas máximas velocidades de crescimento e produção e, ao fim do cultivo, atingiram a produção em células de 3,10 g/L e em enzima de 1724 U/L. Essas menores produções são acompanhadas, também, por baixas produtividades em células (0,111 g/Lh) e em enzimas (141 g/Lh), além dos baixos fatores de conversão de substrato em células (0,11 g/g) e em enzimas (100 U/g).

]

TABELA 7.2 – Parâmetros de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 para a produção de glicose-6-fosfato desidrogenase.

Parâmetros de cultivo	Cultivos em agitador rotativo				
	C1	C2	C3	C4	C5
X_i (g/L)	0,89	0,91	0,93	0,92	1,14
X_{max} (g/L)	3,52	3,85	3,55	3,40	3,10
X_f (g/L)	3,52	3,85	3,55	3,40	3,10
X_{prod} (g/L)	2,63	2,94	2,62	2,49	1,96
$\mu_{x,max}$ (h^{-1})	0,163	0,160	0,146	0,156	0,064
$Pr_{x,max}$ (g/Lh)	0,263	0,261	0,228	0,261	0,111
U_i (U/L)	453	444	487	466	741
U_{max} (U/L)	2806	2891	2772	2457	2508
U_f (U/L)	2806	2891	2772	2457	2508
$G6PDH_{prod}$ (U/L)	2352	2447	2285	1991	1767
$\mu_p max$ (U/gh)	124	148	162	147	100
Pr_{enz} (U/Lh)	207	232	234	228	141
$G6PDH/g_{proteína}$ (U/g)	5945	5879	5494	5724	4248
$G6PDH/g_{célula}$ (U/g)	797	774	866	764	999
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,14	0,140	0,12	0,13	0,11
$Y_{P/S}$ (U/g)	114	120	118	110	100
$Prot_{prod}$ (g/L)	0,190	0,210	0,221	0,185	0,382

Os valores mais baixos dos fatores de conversão apresentadas pelo cultivo C5 sugerem que a levedura utilizou os nutrientes para a produção de outros metabólitos. Ao analisar a tabela 7.2, é possível observar que foi encontrado o mais alto valor de produção em proteínas intracelulares para o cultivo C5 em relação aos demais cultivos, o que justificaria os menores valores para ambos os fatores de conversão.

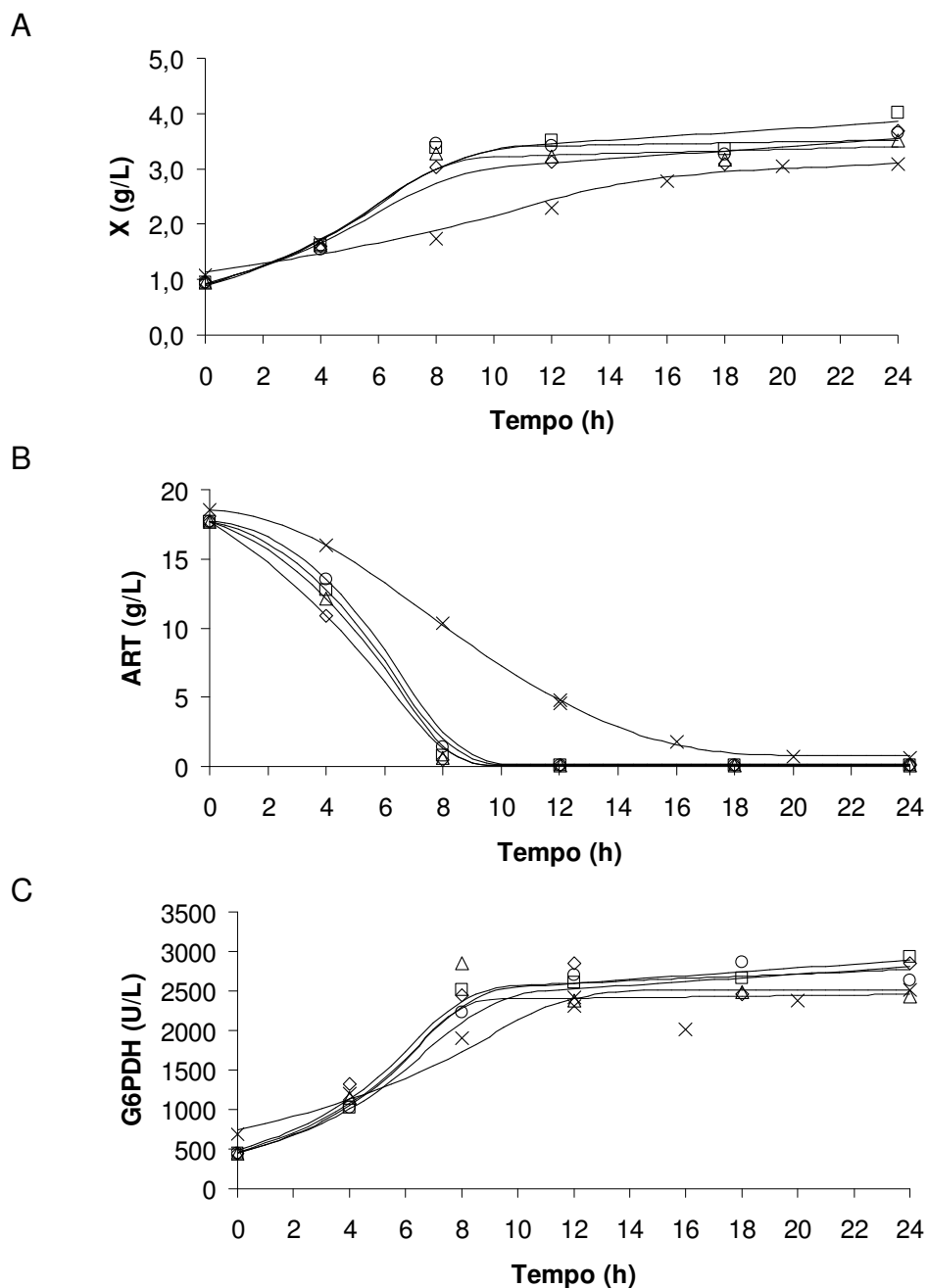


FIGURA 7.1 – A: Concentração celular (X); B: Teor de açúcares redutores totais (ART) e C: Atividade de G6PDH (G6PDH) em função do tempo de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em agitador rotativo a 100 rpm e 30 °C por 24 h. (-O-) Cultivo C1 (meio de cultivo G+YNB); (-□-) Cultivo C2 (meio de cultivo G+YNB+ leucina 80 mg/L); (-◇-) Cultivo C3 (meio de cultivo G+YNB+ leucina 160 mg/L); (-△-) Cultivo C4 (meio de cultivo G+YNB+ leucina 240 mg/L) e (-X-) Cultivo C5 (meio de cultivo ME+EL).

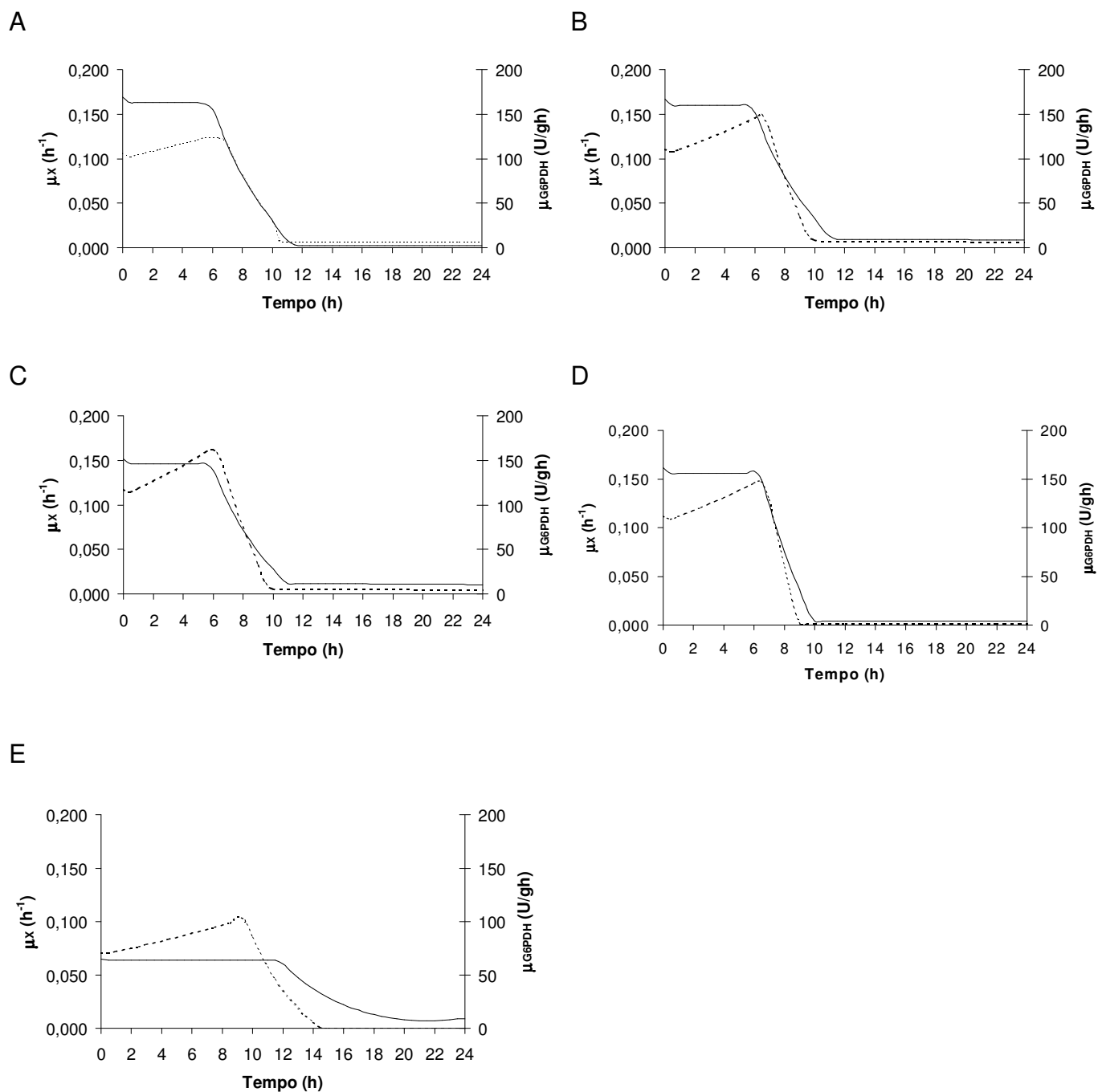


FIGURA 7.2 – Velocidade específica de crescimento celular (-) e de produção de G6PDH (- -), em função do tempo de cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em agitador rotativo a 100 rpm e 30 °C por 24 h. A: Cultivo C1 (meio de cultivo G+YNB); B: Cultivo C2 (meio de cultivo G+YNB+ leucina 80 mg/L); C: Cultivo C3 (meio de cultivo G+YNB+ leucina 160 mg/L); D: Cultivo C4 (meio de cultivo G+YNB+ leucina 240 mg/L) e E: Cultivo C5 (meio de cultivo ME+EL).

7.5. Conclusão

Concluiu-se que teores de leucina entre 0-240 mg/L não influenciaram no crescimento celular ou na produção de enzima nos cultivos estudados, indicando que a cepa empregada apresenta um plasmídeo estável no tocante à sua manutenção na célula. O meio de cultivo composto por melaço de cana-de-açúcar e extrato de leveduras mostrou-se atrativo para a produção da enzima devido ao seu mais baixo custo, em comparação com o meio sintético. Contudo, estudos de processo fermentativo em biorreator devem ser conduzidos a fim de otimizar a aplicação do meio de cultivo composto por melaço de cana-de-açúcar e extrato de leveduras para a produção de G6PDH.

7.6. Agradecimentos

Ângelo Samir Melim Miguel agradece à FAPESP/Brasil, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro, à Professora Carla Columbano Oliveira que conduziu a transformação da levedura *S. cerevisiae* W303-181 e a Usina Açucareira Éster (Cosmópolis/SP) por ter cedido o melaço de cana-de-açúcar.

CONCLUSÕES

Foi feito um estudo de otimização e padronização do preparo do inóculo de *S. cerevisiae* W303-181. Concluiu-se que a manutenção dessa cepa a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ é adequada ao procedimento de preparo do inóculo. O emprego de meio de cultura líquido e agitação, aliado à utilização da cepa armazenada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, propiciaram maiores velocidades específicas de crescimento celular na etapa de inóculo, reduzindo consideravelmente o tempo total de preparo. Esse tempo de preparo reduziu de 114 h (primeira condição) para de 48 h e 64 h para a segunda e terceira condições, respectivamente. A segunda e terceira condições apresentarem perfis de crescimento semelhantes, além de fornecerem massa celular o suficiente (acima de 1,25 g/L) para dar continuidade aos processos, portanto, ambas podem ser utilizados para no preparo do inóculo.

Nos ensaios em regime descontínuo alimentado com vazão de alimentação exponencialmente crescente, estudaram-se valores para a constante de tempo (K). Cinco foram os valores estudados para K (0,2, 0,3, 0,5, 0,7 e 0,8 h^{-1}). Os resultados mostraram que o mais alto nível síntese de G6PDH por *S. cerevisiae* W303-181 ocorreu em $K = 0,2\text{ h}^{-1}$. Encontrou-se para $K = 0,2\text{ h}^{-1}$ os maiores valores de concentração celular máxima ($X_{\text{max}} = 2,14\text{ g/L}$) e atividade máxima de G6PDH ($U_{\text{max}} = 3421,64\text{U}$), produtividade es células e enzimas ($\text{Pr}_X = 0,25\text{ U/g}_{\text{células}}$ e $\text{Pr}_{\text{enz}} = 0,44\text{ U/g}_{\text{proteínas}}$). A síntese da enzima está associada ao crescimento celular e o plasmídeo não é perdido durante o cultivo.

Foi feito, também, um estudo para determinar a influência da concentração de micronutrientes na produção de G6PDH. Concluiu-se que a concentração de micronutrientes apresenta influência na formação de biomassa e na síntese da enzima. Ao se empregar o meio de cultivo cujas concentrações desses micronutrientes tenham sido otimizadas (adenina a 68 mg/L, uracila a 47 mg/L, triptofano a 80 mg/L e histidina a 66 mg/L), a atividade específica de G6PDH atingiu um valor médio de 7927 U/L, 3,2 vezes maior que o encontrado para o cultivo 1 (2484 U/L), cujo meio apresentava 20 mg/L de micronutrientes. Através do cultivo de *S. cerevisiae* W303-181 em meio de cultivo otimizado, usando agitador rotativo, verificou-se a reprodutibilidade dos resultados encontrados no planejamento experimental, uma vez que a atividade específica de G6PDH e de concentração celular (8343 U/g e 3,21 g/L) foram muito próximas aos valores encontrados para o

meio otimizado do planejamento experimental (7927 U/g e 3,42 g). Ainda, verificou-se que a produção da enzima está associada ao crescimento celular.

Estudou-se à produção de G6PDH de *S. cerevisiae* W303-181 em regime descontínuo alimentado conduzido com vazões de alimentação exponencialmente crescente e decrescente. Os maiores níveis de produção de G6PDH ocorreram com vazão de alimentação exponencialmente crescente com $K = 0,2 \text{ h}^{-1}$ e meio de cultivo no qual as concentrações dos micronutrientes tenham sido otimizadas (adenina 67 $\mu\text{g/mL}$, uracila 47 $\mu\text{g/mL}$, histidina 66 $\mu\text{g/mL}$ e triptofano 80 $\mu\text{g/mL}$). Quanto maior o volume de solução de glicose adicionada à dorna nas primeiras horas de processo, menores os níveis de produção de G6PDH. O valor de K nesses cultivos determina o comportamento de diversos parâmetros de cultivo, como velocidades específicas máximas produção de G6PDH e enzima produzida, além de produtividades e fatores de conversão. Verificou-se, também, que a produção da enzima está associada ao crescimento celular.

No estudo da influência da concentração inicial de glicose e tempo de alimentação do biorreator para a produção de G6PDH, encontrou-se, para os cultivos com diferentes concentrações iniciais de glicose e mesmo tempo de alimentação, produção em células e em enzimas apresentaram valores muito próximos (3,13 g/L e 3249 U/L, 4,10 g/L e 3773 U/L e 3,16 g/L e 3599 U/L para respectivamente). Concluiu-se, portanto, que a concentração inicial de glicose não favoreceu a formação de biomassa ou a produção de enzimas. Contudo, determina e as máximas velocidades específicas de crescimento celular e de produção de G6PDH, com as maiores velocidades correspondendo às menores concentrações iniciais. Nos cultivos alimentados desde o início do processo, o aumento do tempo de alimentação de 3 para 5 h favoreceu a formação de biomassa sem prejudicar a produção de G6PDH.

No estudo da influência da leucina na produção de G6PDH, concluiu-se que teores de leucina entre 0-240 mg/L não influenciaram no crescimento celular ou na produção de enzima nos cultivos estudados. O meio de cultivo composto por melaço de cana-de-açúcar e extrato de leveduras mostrou-se atrativo para a produção da enzima devido ao seu mais baixo custo, comparado com o custo do meio sintético. Contudo, estudos de processo fermentativo em biorreator devem ser conduzidos a fim de otimizar a aplicação do meio de cultivo composto por melaço de cana-de-açúcar e extrato de leveduras para a produção de G6PDH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHÃO-NETO, J.; INFANTI, P.; VITOLO, M. Hexokinase production from *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**,v.57/58, p.407-412, 1996.
- ABRAHÃO-NETO, J.; INFANTI, P.; VITOLO, M. Influence of pH, temperature and dissolved oxygen concentration on the production of glucose-6-phosphate dehydrogenase and invertase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Braz. J. Chem. Eng.**,v.14, n.1, p.89-94, 1997.
- AGUERO, J.M.Z. **Estudo da inativação da glicoamilase e da influência de fosfatos na produção da enzima em cultivos de *Aspergillus awamorii***. São Paulo, 1998. 142p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- ALTERTHUM, F. Elementos de microbiologia. In: BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. **Biotecnologia Industrial: fundamentos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.1, cap.1, p.1-32.
- ALTINTAS, M. M.; ÜLGEN, K. Ö.; KIRDAR, B.; ÖNSAN, Z. I.; OLIVER, S. G. Optimal substrate feeding policy for fed-batch cultures of *S. cerevisiae* expressing bifunctional fusion protein displaying amylolytic activities. **Enzyme Microb. Technol.** , v. 33, p. 262-269, 2003.
- AU, S.W.N.; GOVER, S.; LAM, V.M.S.; ADAMS, M.J. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. **Structure**, v.8, n.3, p.293-303, 2000.
- BAE, S.-M.; PARK, Y.-C.; LEE, T.-H.; KWEON, D.-H.; CHOI, J.-H.; RYU, Y.W.; SEO, J.H. Production of xylitol by *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene in repeated fed-batch and cell-recycle fermentations. **Enzyme Microb. Technol.**, v.35, n.6/7, p.545-549, 2004.
- BALAGUER, P.; TÉROUANNE, B.; ELIAOU, J-F.; HUMBERT, M.; BOUSSIOUX, A.-M.; NICOLAS, J. C. Use of glucose-6-phosphate dehydrogenase as a new label for nucleic acid hybridization reactions. **Anal. Biochem.**, v. 180, p. 50-54, 1989.
- BASSI, A.S.; TANG, D.Q.; BERGOUGNOU, M.A. Mediated, amperometric biosensor for glucose-6-phosphate monitoring based on entrapped glucose-6-phosphate dehydrogenase, Mg²⁺ ions, tetracyanoquinodimethane, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in carbon paste. . **Anal. Biochem.**, v. 268, n. 2, p. 223-228,1999.
- BENÍTEZ, T., RAMÍREZ, J.M.G., CASTREJÓN, F., CODÓN, A.C. Development of new strains for the food industry. **Biotechnol. Prog.**, v.12, p.149-163, 1996.

- BERGMEYER, H.U.; GRASSL, M.; WALTER, H.-E. Enzymes: hexokinase. In: BERGMEYER, H.U.; BERGMEYER, J.; GRASSL, M., eds. **Methods of enzymatic analysis**. 3.ed. Weinheim, Deerfield Beach: Verlag Chemie, 1984. v.2, cap.2.2.1, p.222-223.
- BOCCHINI, D. A.; ALVES-PRADO, H. F.; BAIDA L. C.; ROBERTO, I. C.; GOMES, E.; DA SILVA, R. Optimization of xylanase production by *Bacillus circulans* D1 in submerged fermentation using response surface methodology. **Process. Biochem.**, 38, 727-731, 2002.
- BOROSS, L.; SIMON, M.; KOTORMAN, M.; SZAJANI, B. Characterization and analytical application of glycolytic enzymes immobilized covalently on "Akrilex" carries. In: EUROPEAN CONGRESS ON BIOTECHNOLOGY, 4, Amsterdam, 1987. **Proceedings**. Amsterdam, 1987. v.2, p.331.
- BOX, G.E.P.; HUNTER, W.G.; HUNTER, J.S. **Statistics for experiments**: an introduction to design, data analysis and model building. New York: John Wiley, 1978. 653p. (Wiley Series in Probability and Mathematical Statistics).
- BUCKLAND, B.C.; LILLY, M.D. Fermentation: an overview. **Biotechnology**, v.3, p.7-22, 1993.
- BYERS, B. Cytology of the yeast life cycle. In: STRATHERN, J.N.; JONES, E.W.; BROACH, J.R., eds. **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae***: life cycle and inheritance. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. part.A, p.59-96. (Cold Spring Harbor monograph series).
- CARLSON, M. Regulation of sugar utilization in *Saccharomyces* species. **J. Bacteriol.**, Baltimore, v.169, n.11, p.4873-4877, 1987.
- CARVALHO, J. C. M.; AQUARONE, E.; SATO, S.; BRAZZACH, M. L.; ALMEIDA, K. A.; BORZANI, W. Influence of exponentially decreasing feeding rates on fed-batch ethanol fermentation of sugar cane blackstrap molasses. **Biotechnol. Lett.**, v. 12, p. 177-182, 1990.
- CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua. In: BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; SCHIMIDELL, W. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.2, cap.10, p.194.
- CASTRO, I. M.; BRANDÃO, R. L. A biologia molecular e a produção de enzimas de interesse comercial. In: **Enzimas como agentes biotecnológicos**, 1ed. Ribeirão Preto, Editora Legis Summa, 2004, cap. 3, p.21-34.
- CHATEL, S., VOIRIN, A., LUCIANI, A.; ARTAUD, J. Starch identification and determination in sweetened fruit preparations. **J. Agric. Food Chem.**, v. 44, n. 2, p. 502-506, 1996.

- CHEM, Y.; KIRK, N.; PIPER, P. W.; Effects of medium composition on M α 1 promoter-directed secretion of a small protease inhibitor in c batch fermentation. **Biotechnol. Lett.**, v. 15, n. 3, p.223-228, 1993.
- CHIRUVOLU, V.; STRATTON, J. M.; OTT, T. L.; BAZER, F. W.; MEAGHER, M. M. Effect of media composition on growth, plasmid stability and ovine interferon- τ production in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Ferment. Bioeng.**, v.82, n.6, p.565-569,1996.
- CHOI, C.-M.; KIM, M.-D.; RHEE, S.-K.; SEO, J.-H. Effects of medium composition on hirudin production in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Lett.**, n.18, v.10, 1129-1132, 1996.
- CHU, J.; ZHANG, S.; ZHUANG, Y. Optimization of cultural conditions for enhancing the expression of human interferon-a2a by recombinant yeast. **Process Biochem.**, v.39, p.2069-2073, 2004.
- COHEN, P.; ROSEMEYER, M. A. Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.8, p.8-15, 1969.
- COOPER, T. G. Nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. In: Strahern, J. N., JONES, E. W., BROACH, J. R., eds. **The Molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: metabolism and gene expression**. Cold Spring Harbor Laboratory, pt.B, p. 39-99, 1982..apud SILVA, M. E. **Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultivo visando a obtenção de hexoquinase (EC 2.7.1.1) e glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) em *Saccharomyces cerevisiae***. São Paulo, 1998. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêutica – Universidade de São Paulo.
- CORTÉS, G.; TRUJILLO-ROLDÁN, M.A.; RAMÍREZ, O.T.E.; GALINDA, E. Production of β -galactosidase by *Kluyveromyces marxianus* under oscillating dissolved oxygen tension. **Process Biochem.**, n.40, p.773-778, 2005.
- COSGROVE, M.S.; TAYLOR, C.; PALUDAN, S.; ADAMS, M.J.; LEVY, H.R. On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Biochemistry**, n.37, p.2759-2767, 1998.
- DA SILVA, N. A.; BAILEY, J. Influence of dilution rate and induction of cloned gene expression in continuous fermentation of recombinant yeast. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 37, p. 309-317, 1991.
- DANESI, E. D. G.; MIGUEL, A. S. M; RANGEL-YAGUI, C. O; CARVALHO, J. C. M; PESSOA-JR, A 2005 Effect of carbon:nitrogen ratio (C:N) and substrate source on glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) production by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Food Eng.**, v.75, p.96-103, 2006.

- DAS NEVES, L. C. M.; PESSOA-JR, A.; VITOLO, M. Production of glucose 6-phosphate dehydrogenase from genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* grown by batch fermentation process. **Biotechnol. Progress**. P.1136-1139, 2005.
- DE DEKEN, R. H. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. **J. Gen. Microbiol.** v.44, p.149-156, 1966.
- DHURJATI, P.; COPPELLA, S. α -factor directed expression of the human epidermal growth factor in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.**, v.33, p.976-983, 1989.
- DOES, A.L.; BISSON, L.F. Comparison of glucose uptake kinetics in different yeasts. **J. Bacteriol.**, v.171, n.3, p.1303-1308, 1989.
- DUMONT, F.; MARECHAL, PIERRE-ANDRÉ; GERVAIS, P. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates. **Cryobiology**, v.46, p.33-42, 2002.
- ECHEGARAY, O.F.; AQUARONE, E.; CARVALHO, J.C.M.; FERNANDES, A.N.R.; SATO, S.; VITOLO, M. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. **Biomass Bioenerg.**, v.19, p.39-50, 2000.
- ENTIAN, K.D. Sugar phosphorylation in yeast. In: ZIMMERMANN, F.K.; ENTIAN, K.D., eds. **Yeast sugar metabolism: biochemistry, genetics, biotechnology and applications**. Lancaster: Technomic, 1997. p.67-79.
- FREY, S.D.; ELLIOTT, E.T.; PAUSTIAN, K. Application of the hexokinase-glucose-6-phosphate dehydrogenase enzymatic assay for measurement of glucose in amended soil. **Soil Biol. Biochem.**, v.31, n.6, p.933-935, 1999.
- FURLAN, S.A.; CASTRO, H.F. Xylitol production by *Candida parapsilosis* under fed-batch culture. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.44, p.125-128, 2001.
- GABRIELSEN, O.S.; REEP, S.; SEATHER, O.; BLINGSMO, O.R.; SLETTEN, K.; GORDELADZE, J.O.; HØGSET, A.; GAUTIVIK, V.T.; ALESTRØM, P.; ØYEN, T.B.; GAUTIVIK, K.M. Efficient secretion of human parathyroid hormone by *Saccharomyces cerevisiae*. **Gene**, v.90, p.255-262, 1990.
- GANCEDO, J.M. Carbon catabolite repression in yeast. **Eur. J. Biochem.**, v.206, p.297-313, 1992.
- GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial enzymology**. 2.ed. London: MacMillan Press, 1996. 609P.

- HALL, G.M., ed. **Methods of testing protein functionality**. London: Blackie Academic and Professional, Chapman & Hall, 1996. 265p.
- HISS, A. Cinética de processos fermentativos. In: SCHIMIDELL, W.; LIMA, U.A.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.2, cap.6, p.93-122.
- HORÁK, J. Yeast nutrient transporters. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1331, n.1, p.41-79, 1997. *apud* SILVA, M. E. **Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultivo visando a obtenção de hexoquinase (EC 2.7.1.1) e glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) em *Saccharomyces cerevisiae***. São Paulo, 1998. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêutica – Universidade de São Paulo.
- ISHAQUE, A.; MILLHAUSEN, M.; LEVY, H. On the absence of cysteine in glucose-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v.59, p.894, 1974.
- KIERS, J.; ZEEMAN, A.M.; LUTTIK, M.; THIELE, C.; CASTRILLO, J.I.; STEENSMA, H.Y.; DIJKEN, J.P.V.; PRONK, J.T. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. **Yeast**, Chichester, v.14, p. 459-469, 1998.
- KILIKIAN, B.V.; PESSOA Jr., A. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SCHIMIDELL NETTO, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. **Biotechnologia industrial: engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.2, cap.21, p.493-522.
- KIM, H. J.; KIM, Y. H.; ROH, Y. H.; SEONG, B. L. e SHIN, C. S. Optimization of enterokinase fermentation using a recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochem.** v.40, p.717-722, 2005.
- KOTIK, M.; KOBANOVÁ, M.; MARENOVÁ, H.; KYSLIK, P. High-level expression of a fungal pyranose oxidase in high cell-density fed-batch cultivations of *Escherichia coli* using lactose as inducer. **Protein Expr. Purif.**, v.36, p. 61–69, 2004.
- LEE, J.; LEE, S. Y.; PARK, S.; MIDDELBERG, A. P. J. Control of fed-batch fermentations, **Biotechnol. Adv.**, 17, 29-48, 1999.
- LEE, W.; RYU, YEON-WOO; SEO, JIN-HO. Characterization of two-substrate fermentation process for xylitol production using recombinant *Saccharomyces cerevisiae* containing xylose reductase gene. **Process Biochem.** v. 35, p. 1199-1203, 2000.
- LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 2.ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 839p.

- LI, C.; BAI, J.; CAI, Z.; OUYANG, Z. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. **J. Biotechnol.**, v.93, p.27-34, 2002.
- LILLY, M.D. Production of intracellular microbial enzymes. In: WINGARD JUNIOR, L.B.; KATCHALSKI-KATZIR, E.; GOLDSTEIN, L., eds. **Appl. Biochem. Bioeng.**, New York: Academic Press, 1979. v.2, p.306.
- LOJUDICE, F. H.; SILVA, D. P.; ZANCHIN, N. I. T.; OLIVEIRA, C.C.; PESSOA JR, A. Overexpression of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) in Genetically Modified *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 91/93, p. 161-169, 2001.
- LOWRY, O.H.; ROSEBOUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin-phenol-reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, p.265-275, 1951.
- MARZZOCO, A.; TORRES, B.B. **Bioquímica básica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 360p.
- MEDEIROS, M.B. **Utilização de Glicídios por Leveduras: Controle da Assimilação da Sacarose em Hansenula Anomala Associado à Fonte Inorgânica de Nitrogênio**. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, *apud* SILVA, M. E. **Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultivo visando a obtenção de hexoquinase (EC 2.7.1.1) e glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) em Saccharomyces cerevisiae**. São Paulo, 1998. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêutica – Universidade de São Paulo. 989. 86p.
- MIGUEL, A. S. M.; NEVES, L. C. M.; VIOTOLO, M.; PESSOA-JR, A. Effect of flow rate pattern on glucose-6-phosphate dehydrogenase synthesis in fed-batch culture of recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Progr.**, n.19, p.320-324, 2003.
- MØLLER, K.; SHARIF, M. Z.; OLSSON, L. Production of α -amylase by *Saccharomyces Kuyveri* in glucose-limited cultivations. **J. Biotechnol.**, v.111, p.311-318, 2004.
- MORI, H.; ISHIDA, M.; OKAMOTO, S. Glucose determination using a flow system with enzyme reactor and application to analysis of glucose content in beverages. **J. Health Sci.**, v. 45, n. 3, p. 126-129, 1999.
- MURPHY, A; KAVANAGH K. Emergence of *Saccharomyces cerevisiae* as a human pathogen. Implications for Biotechnology. **Enzyme Microb. Tech.**, V.25, p.551-557, 1999.

- NASCIMENTO, A. A.C.; ESPREÁFICO, E. M.; LARSON, M. L.; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M.; RODRIGUES, V. *Tecnologia do DNA recombinante*. Apostila do curso tecnologia do DNA recombinante, [s.n.], 2003.
- NEVES, L.C.M. **Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae* W303-181**. São Paulo, 2003. 284p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- OGDEN, J. E.; STANWAY, C. A.; KIM, S.; MELLOR, J.; KINGSMAN, A. J.; KINGSMAN, S. M. Efficient expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PGK gene depends on an upstream activating sequence but does not require TATA sequences. **Mol. Cell. Biol.**, v.6, p.4335-4343, 1986.
- OLIVE, C. LEVY, H. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. **Method Enzimol.** New York. v.41. part b, p.196,1975.
- ÖZER, N.; AKSOY, Y.; ÖGUS, I.H. Kinetic properties of human placental glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.33, n.3, p.221-226, 2001.
- PARELLADA, J.; NARVÁEZ, A.; LÓPEZ, M. A.; DOMÍNGUEZ, E.; FERNÁNDEZ, J. J.; PAVLOV, V.; KATAKIS, I. Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications, **Anal. Chim. Acta**, v.362, p.47-57, 1998.
- PARK, Y.K. Produção de enzimas. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W., coord. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgar Blücher, 1975. 285p. (Biotecnologia, v.1).
- PATKAR, A.; SEO, J. H. Fermentation kinetics of recombinant yeast in batch and fed-batch cultures. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 40, p.103-109, 1992.
- PELCZAR Jr., M.J.; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R.; EDWARDS, D.D.; PELCZAR, M.F. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2.ed. São Paulo: Makron, 1996. v.1, cap.10, p.268.
- PESSOA-JR, A.; VITOLO, M.; HUSTEDT, H. Use of $k_L a$ as a criterion for scaling up the inulinase fermentation process. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.57/58, p.699-709, 1996.
- PRONK, J.T.; STEENSMA, H.Y.; DIJKEN, J.P.V. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, Chichester, v.12, p.1607-1633, 1996.
- RANGEL-YAGUI, C.O.; DANESI, E.D.G.; CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Chlorophyll production from *Spirulina platensis*: cultivation with urea addition by fed-batch process. **Biores. Technol.**, v.92, n.2, p.133-141, 2004.

- REED, G.; PEPPLER, H.J. **Yeast technology**. Westport: AVI Publisher, 1973.
- REGULY, J.C. **Biotecnologia dos processos fermentativos**. 3.ed. Pelotas: Universitária, UFPel, 1998.
- REHM, H.J.; REED, G., eds. **Biotechnology**. 2.ed. Weinheim, New York: VCH, 1993, 803p.
- REIFENBERGER, E.; BOLES, E.; CIRIACY, M. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. **Eur. J. Biochem.**, Berlin, v.245, n.2, p.324-333, 1997.
- SILVA, M.E. **Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultivo visando a obtenção de hexoquinase (EC 2.7.1.1) e glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) em *Saccharomyces cerevisiae***. São Paulo, 1998. 85p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêutica – Universidade de São Paulo.
- ROCHA FILHO, J.A.; VITOLO, M. **Enzimas no contexto da síntese orgânica**. São Paulo: Autores, 1998. 84p.
- RODRIGUES, D. C. G. A.; FELIPE, M. G. A., SILVA, J. B. A.; VITOLO M. Response surface methodology for xylitol production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolyzate using controlled vacuum evaporation process variables. **Process Biochem.** v.38, p.1231-1237, 2003.
- RODRIGUES, D. C. G. A.; SILVA, S. S.; FELIPE, M. G. A. Using response-surface methodology to evaluate xylitol production by *Candida guilliermondii* by fed-batch process with exponential feeding rate. **J. Biothechnol.** v.62, p. 73-77, 1998.
- ROMANOS, M.A.; SCORER, C.A.; CLARE, J.J. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast**, v.2, n.6, p.423-428, 1992.
- ROSE, A.H.; HARRISON, J.S., eds. **The yeast**. 2.ed. New York, London: Academic Press, 1999.
- ROSSI, F.G. **Obtenção da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase por processo fermentativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada (W303-181)**. São Paulo, 2002. Dissertação de Mestrado – Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de São Paulo.
- ROWLAND, P.; BASAK, A.K.; GOVER, S.; LEVY, H.R.; ADAMS, M.J. The three-dimensional structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. **Structure**, v.2, n.11, p.1073-1087, 1994.

- SANTUCCI, M. C. C.; ALVIM, I. D.; SCHMIT, F.; FARIA, E. V.; SGARBIERI, V. C. Enriquecimento de macarrão tipo tubo (massa curta) com derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.): impacto nutricional e sensorial. **Cienc. Tecnol. Aliment.** v.23, n.2, p.290-295, 2003.
- SCHIMIDELL, W.; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e processo fermentativo. In: BORZANI, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; SCHIMIDELL, W. **Engenharia bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.2, cap.8, p.180-181.
- SCHNELLE, P.D.; RICHARDS, J.R. **A review of industrial reactor control**: difficult problems and workable solutions. In: MORARI, M.; McAVOY, T.J., eds. **Chemical process control: CPC 111**. Amsterdam: CACHE-Elsevier, 1986. p.749-802. (Proceedings of the third International Conference on Chemical Process Control, 3, Asilomar, 1986).
- SCHU, P.; RITH, M. Evaluation of different parameters of the production and cryopreservation of seed cultures with recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Cryobiology**, v.32, p.379-388, 1995.
- SCOPES, R.K. **Protein purification**: principles and practice. New York: Springer-Verlag, 1994. 329p. (Springer advanced texts in chemistry).
- SEGEL, I.H. **Bioquímica**: teoria e problemas. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1979. 527p.
- SEVERO, L.G. **Determinação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD) em eritrócitos humanos**. São Paulo, 1979. 68p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêutica – Universidade de São Paulo.
- SHENE, C.; MIR, N.; ANDREWS, B. A.; ASENJO, J. Effect of the growth conditions on the synthesis of a recombinant β -1,4- endoglucanase in continuous and fed-batch cultures. **Enzymol. Microb. Technol.**, v.27, n.3/5, p.248-253, 2000.
- SIGMA CHEMICAL COMPANY. **Biochemicals organic compounds and diagnostic reagents**. Saint Louis: Sigma Chemical, 1996. 2608p.
- SILVA, D.P. **Obtenção das enzimas hexoquinase e glicose-6-fosfato desidrogenase utilizando *Saccharomyces cerevisiae***. São Paulo, 2000. 165p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- SILVA, D.P.; PESSOA Jr., A.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M. Effect of agitation and aeration on the production of hexokinase by *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.91/93, p.605-613, 2001.

- SILVA, D.P.; PESSOA Jr., A.; ROBERTO, I.C.; VITOLO, M. Effect of K_La on the production of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Saccharomyces cerevisiae* grown by fermentation process. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.98/100, p.205-213, 2002.
- SILVA, N.A.; BAILEY, J. Influence of dilution rate and induction of cloned gene expression in continuous fermentation of recombinant yeast. **Biotechnol. Bioeng.**, v.37, p.309-317, 1991.
- SOMOGYI, M. Notes on Sugar Determination. **J. Biol. Chem.** v. 195, p.19-23, 1952.
- TEROUANNE, B.; BENCHEICK, M., BALAGUER, P.; BOUSSIOUX, A.M.; NICOLAS, I. C. Bioluminescent assays using glucose-6-phosphate dehydrogenase - Application to biotin and streptavidin detection. **Anal. Biochem.**, v. 180, n. 1, p. 43-49, 1989.
- TONG, G.E.; INLOES, D.S. Making more. **CHEMTECH**, n.9, p.567-573, 1990.
- VAN KLEEFF, B.H.A.; KUENEN, J.G.; HONDERD, G.; HEIJNEN, J.J. Using heat-flow measurements for the feed control of a fed batch fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. **Thermochim. Acta**, v.309, p.175-180, 1998.
- VOUGHT, V.; CICCONE, T.; DAVINO, M.H.; FAIRBAIRN, L.; LIN Y.; COSGROVE, M. S.; ADAMS, M. J. Delineation of the roles of amino acids involved in the catalytic functions of *Leuconostoc mesenteroides* glucose 6-phosphate dehydrogenase. **Biochemistry**, Washington, v. 12, n. 49, p.15012-15021, 2000.
- WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. Chichester, New York: John Wiley, 1998. 350p.
- WANG, D.I.C.; COONEY, C.L.; DEMAIN, A.L.; DUNNILL, P.; HUMPHREY, A.E.; LILLY, M.D. **Fermentation and Enzyme Technology**. New York: John Wiley & Sons, 1979. 374p. *apud* SILVA, M. E. **Estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio no meio de cultivo visando à obtenção de hexoquinase (EC2.7.1.1) e glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) em *S. cerevisiae***. São Paulo, 1998. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.
- WANG, Z.; DA-SILVA, N.A. Improved protein synthesis and secretion through medium enrichment in a stable recombinant yeast strain. **Biotechnol. Bioeng.** v. 42, p. 95-102, 1993.
- WHITAKER, J.R. Enzymes in analytical chemistry. In: FOX, P.F., ed. **Food enzymology**. London, New York: Elsevier, 1991. v.2, 378p.

WISEMAN, A.; WOODWARD, J. Industrial yeast invertase stabilization. **Process Biochem.**, London, v.10, p.24-&, 1975.

YAMANE, T.; SHIMIZU, S. Fed-batch techniques in microbial process. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.30, p.147-194, 1984.

YOSHIDA, F.; YAMANE, T.; NAKAMOTO, K. I. Fed-batch hydrocarbon fermentation or with colloidal emulsions feed. **Biotch. Bioeng.** V.15, p.257-270, 1973.

ZAITZEVA, E. A.; CHUKRAI, E. S.; POLTORAK, O. M. Thermostability of yeast hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, Totowa, v.61, p.67-74, 1997.

ZIGOVA, J. Effect of *RQ* and pre-seed conditions on biomass and galactosyl transferase production during fed-batch culture of *S. cerevisiae* BT 150. **J. Biothechnol.** v.80, p.55-62, 2000.

ZIGOVA, J.; MAHLE, M.; PASCHOLOD, H.; MALISSARD, M.; BERGER, E. G.; WEUSTER-BOTZ, D. Fed-batch production of a soluble, β -1,4-galactosyltransferase with *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzymol. Microb. Technol.**, v. 25, p. 201-207, 1999.

APÊNDICE

APÊNDICE 1

Determinação da equação da vazão de alimentação exponencialmente crescente

Para a alimentação exponencialmente crescente, teremos:

$$\phi = \phi_0 \times e^{K \times t} \quad (\text{equação 1.1})$$

Onde:

ϕ = vazão de alimentação (L/h)

ϕ_0 = vazão de alimentação máxima (L/h)

K = constante de adição exponencial (L/h²)

T = tempo (h)

Por definição:

$$\phi = dV/dt \quad (\text{equação 1.2})$$

Onde:

dV = variação do volume(L)

dt = variação do tempo (h)

Substituindo a equação 1.2 na equação 1.1, teremos:

$$dV/dt = \phi_0 \times e^{K \times t} \quad (\text{equação 1.3})$$

Integrando:

$$\Delta V = (V - V_0) = (\phi_0/K) \times (e^{K \times t} - 1) \quad (\text{equação 1.4})$$

Onde:

$V - V_0$ = variação do volume (L)

Quando $t = \phi$ e $V = V_f$, temos:

$$(V_f - V_0) = (\phi_0/K) \times (e^{K \times \phi} - 1) \quad (\text{equação 1.5})$$

Onde :

V_f = volume final (L)

Rearranjando a equação 1.4, teremos:

$$(\phi_0/K) = (V - V_0)/(e^{K \times t} - 1) \quad (\text{equação 1.6})$$

Substituindo a equação 1.6 na equação 1.5, teremos:

$$(V - V_0) = (V_f - V_0) \times (e^{K \times t} - 1)/(e^{K \times \phi} - 1) \quad (\text{equação 1.7})$$

Exemplo de cálculo para a vazão de alimentação exponencialmente crescente nas seguintes condições:

$$V = ? \text{ (L)}$$

$$V_0 = 1,5 \text{ L}$$

$$V_f = 2 \text{ L}$$

$$K = 0,5 \text{ h}^{-1}$$

$$t = ? \text{ (h)}$$

$$\phi = 5 \text{ h}$$

t	$V_f - V_0$	$e^{K \times t} - 1$	$e^{K \times \phi} - 1$	$V - V_0$	V
0	1,5	0,000	11,182	0,000	
0,5	1,5	0,284	11,182	0,038	0,038
1,0	1,5	0,649	11,182	0,087	0,049
1,5	1,5	1,117	11,182	0,150	0,063
2,0	1,5	1,718	11,182	0,230	0,081
2,5	1,5	2,490	11,182	0,334	0,104
3,0	1,5	3,482	11,182	0,467	0,133
3,5	1,5	4,755	11,182	0,638	0,171
4,0	1,5	6,389	11,182	0,857	0,219
4,5	1,5	8,488	11,182	1,139	0,282
5,0	1,5	11,182	11,182	1,500	0,361

APÊNDICE 2

Determinação da equação da vazão de alimentação exponencialmente decrescente

Para a alimentação exponencialmente crescente, teremos:

$$\phi = \phi_0 \times e^{-K \times t} \quad (\text{equação 2.1})$$

Onde:

ϕ = vazão de alimentação (L/h)

ϕ_0 = vazão de alimentação máxima (L/h)

K = constante de adição exponencial (L/h²)

T = tempo (h)

Por definição:

$$\phi = dV/dt \quad (\text{equação 2.2})$$

Onde:

dV = variação do volume(L)

dt = variação do tempo (h)

Substituindo a equação 2.2 na equação 2.1, teremos:

$$dV/dt = \phi_0 \times e^{-K \times t} \quad (\text{equação 2.3})$$

Integrando:

$$\Delta V = (V - V_0) = (-\phi_0/K) \times (e^{-K \times t} - 1) \quad (\text{equação 2.4})$$

Onde:

$V - V_0$ = variação do volume (L)

Quando $t = \phi$ e $V = V_f$, temos:

$$(V_f - V_0) = (-\phi_0/K) \times (e^{-K \times \phi} - 1) \quad (\text{equação 2.5})$$

Onde :

V_f = volume final (L)

Rearranjando a equação 2.4, teremos:

$$(-\phi_0/K) = (V - V_0) / (e^{-K \times t} - 1) \quad (\text{equação 2.6})$$

Substituindo a equação 2.6 na equação 2.5, teremos:

$$(V - V_0) = (V_f - V_0) \times (e^{-K \times t} - 1) / (e^{-K \times \phi} - 1) \quad (\text{equação 2.7})$$

Exemplo de cálculo para a vazão de alimentação exponencialmente decrescente nas seguintes condições:

$$V = ? \text{ (L)}$$

$$V_0 = 1,5 \text{ L}$$

$$V_f = 2 \text{ L}$$

$$K = 0,5 \text{ h}^{-1}$$

$$t = ? \text{ (h)}$$

$$\phi = 5 \text{ h}$$

t	$V_f - V_0$	$e^{-K \times t} - 1$	$e^{-K \times \phi} - 1$	$V - V_0$	V
0	1,5	0,000	-0,918	0,000	
0,5	1,5	-0,221	-0,918	0,361	0,361
1,0	1,5	-0,393	-0,918	0,643	0,282
1,5	1,5	-0,528	-0,918	0,862	0,219
2,0	1,5	-0,632	-0,918	1,033	0,171
2,5	1,5	-0,713	-0,918	1,166	0,133
3,0	1,5	-0,777	-0,918	1,270	0,104
3,5	1,5	-0,826	-0,918	1,350	0,081
4,0	1,5	-0,865	-0,918	1,413	0,063
4,5	1,5	-0,895	-0,918	1,462	0,049
5,0	1,5	-0,918	-0,918	1,500	0,038

APÊNDICE 3

Determinação da concentração celular por massa seca

Para a determinação da concentração celular, 10 mL de meio fermentado foi filtrado por uma membrana de porosidade 0,22µm (Millipore) previamente tarada. A secagem do sistema formado pela massa de células e a membrana foi feito em estufa a 105°C por 2 h. Transcorrido esse tempo, o sistema foi transferido para um dessecador de sílica gel, permanecendo aí até resfriamento, para então ser pesado. A concentração celular fornecida foi obtido através da equação 3 e expressa por grama de massa seca por litro de meio fermentado ($\text{g}_{\text{massa seca}}/\text{L}_{\text{meio fermentado}}$).

$$X \text{ (g/L)} = (M_1 - M_2) \times 100 \quad \text{(equação 3)}$$

Onde: X..... Concentração celular (g/L)
 M₁ Massa da membrana (g)
 M₂..... Massa da membrana mais a massa de células (g)

APÊNDICE 4

Determinação da concentração celular por densidade ótica a 600 nm

A concentração celular foi obtida mediante uma curva de calibração que correlaciona densidade ótica (DO) com massa seca. Para a elaboração desta curva, células da levedura em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas e ressuspendidas em água destilada. Esta suspensão foi diluída 4, 5, 8, 10, 20, 40 e 80 vezes para que a leitura de DO abrangesse toda a faixa de linearidade do aparelho. As absorvâncias foram lidas em espectrofotômetro (Beckman DU 640) a 600 nm, utilizando-se água destilada como análise em branco.

APÊNDICE 5

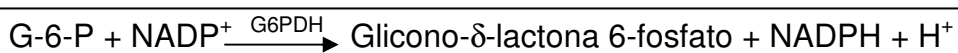
Rompimento celular em vórtice

Uma alíquota de 5 mL de meio fermentado foi transferida para tubos de centrífuga de 15 mL e centrifugada (3025xg, por 30 min e 6 °C) e o “pellet” ressuspendido em 5 mL da seguinte solução: Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,5, MgCl₂ 5 mmol/L, EDTA 0,2 mmol/L, β-mercaptoetanol 10 mmol/L e ácido aminocaprílico 2 mmol/L. Logo após, as células foram rompidas em vórtice, na presença de 7,45 g de pérolas de vidro (0,5 mm de diâmetro). O tempo de rompimento será de 12 minutos de operação em vórtice, devendo ser, a amostra, resfriada em banho de gelo por 30 segundos e mais 30 segundos em operação no vórtice, resultando em 24 minutos de operação. Os fragmentos celulares e as pérolas de vidro foram removidos por centrifugação (3025xg, por 30 min. a 6 °C).

APÊNDICE 6

Determinação da atividade enzimática de G6PDH

Esta determinação foi realizada por análise espectrofotométrica a uma temperatura 30 °C a 340 nm de acordo com o método descrito por BERGMEYER (1984). A atividade da G6PDH foi medida em um sistema enzimático contendo glicose-6-fosfato (G-6-P) e nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADP⁺). A G-6-P foi oxidada, pela presença da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) a Glicono-δ-lactona 6-fosfato e o NADP⁺ foi convertido a nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH). A atividade da G6PDH foi então determinada pela medida da velocidade de formação de NADPH, verificada por espectrofotômetro (Beckman 640 DU).



Reação que mostra a ação da G6PDH sobre o substrato e a redução do cofator

Essa determinação foi realizada em uma cubeta de quartzo juntando-se 30 µL amostra a 615 µL da seguinte solução: Tris-HCl (50 mM, pH 7,5), NADP⁺ (131 mM), cloreto de magnésio (5 mM) e G6P (250 mM). Uma unidade (U) de G6PDH foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 µmol de NADP⁺/min nas condições do experimento.

APÊNDICE 7

Dosagem de proteínas pelo método de Lowry

O teor de proteínas, determinado de acordo com o método de LOWRY (1959), utiliza como padrão a albumina de soro bovino (BSA –“bovine serum albumin”). Preparou-se BSA a 0,4 g/L e faz-se diluições para obter 0,08, 0,16, 0,24, 0,32 e 0,4 g/L para o estabelecimento da curva de calibração.

Soluções:

Solução de albumina

Em balão volumétrico de 100 mL, adicionou-se 0,04 g de BSA. Em seguida adicionar 0,2 mL de NaOH 1,0 mol/L e completar até a marca de aferição. O NaOH é usado para que se obtenha melhor dissolução do BSA e diminuição da formação de espuma.

Solução alcalina

Na CO ₃	20,0 g
NaOH	04,0 g
Água destilada	1000,0 mL

Solução de sulfato cúprico

CuSO ₄	2,0 g
Água destilada	100,0 mL

Solução de tartarato de sódio e potássio

KNaC ₄ H ₄ O ₆	4,0 g
Água destilada	100,0 mL

Preparo da mistura reativa

1 parte de solução sulfato cúprico : 1 parte de solução de tartarato de sódio e potássio : 100 partes de solução alcalina.

Procedimento

Em um tubo de ensaio de 15 mL adicionou-se 5 mL de mistura reativa e 0,5 mL de amostra, deixa-se 10 minutos em repouso, adiciona-se 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu e após aguardar 30 minutos, faz-se as leituras em 660 nm.

APÊNDICE 8

Determinação do valor do k_La

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) foi estimado com base no método polarográfico (WISE, 1951), que estima o valor do k_La baseado na velocidade de dissolução do oxigênio em um meio definido, em função das condições de aeração e agitação. Para estas determinações utilizou-se uma sonda de oxigênio dissolvido (Mettler Toledo®) tipo célula polarográfica. As medidas foram realizadas com o biorreator contendo água em substituição ao meio de cultura, na temperatura de 30 °C, em determinadas condições de agitação e aeração.

Inicialmente a concentração de oxigênio dissolvido no interior da dorna foi reduzida a 0% através de injeção de nitrogênio gasoso ao meio. Logo após, o biorreator foi rapidamente regulado para condições definidas de agitação e aeração, e então foi monitorada a medida do aumento da concentração de oxigênio dissolvido (C) em função do tempo.

De acordo com PIRT (1975), o balanço de massa na fase líquida é dado pela seguinte expressão: $dC/dt = k_La.(C_S - C)$, com C_S igual a concentração de oxigênio dissolvido na saturação (100%). Integrando-se a referida equação e traçando-se a curva $\ln(C_S - C)$ em função do tempo, determina-se a inclinação da reta obtida, correspondente ao valor de coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ($-k_La$).

PIRT, S.J. *Principles of microbe and cell cultivation*. Oxford: Blackwell, 1975. 274p.

WISE, W.S. The measurement of the aeration of culture media. *J. Gen. Microbiol.*, v.5, p.167-177, 1951.

APÊNDICE 9

Determinação da concentração de açúcares redutores totais pelo método de Somogyi

A concentração de glicose, determinado de acordo com o método de SOMOGUI (1952), utiliza como padrão glicose p.a.. Preparou-se glicose a 0,20 g/L e faz-se diluições para obter 0,04, 0,08, 0,12, 0,16 e 0,20 g/L para o estabelecimento da curva de calibração.

Soluções:

Solução alcalina

NaHCO ₃	20,00 g
NaKC ₂ H ₄ O ₆	15,00 g
Na ₂ CO ₃	30,00 g
Na ₂ SO ₄	180,00 g
Água destilada (qsp)	1000,00 mL

Solução alcalino cúprica

CuSO ₄ .5H ₂ O (40 g/L)	100,0 g
Na ₂ SO ₄	46,0 g
Água destilada (qsp)	200,0 mL

Solução arseno-molíbdica

(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ . 4H ₂ O	26,32 g
Na ₂ HAsO ₄ . 7H ₂ O	3,16 g
H ₂ SO ₄ (d=1,84)	22,10 mL
Água destilada (qsp)	500,00 mL

Preparo da mistura reativa

4 partes de solução alcalina para 1 parte de solução alcalino cúprica.

Procedimento

Em um tubo de ensaio de Folin-Wu, adicionou-se 1 mL de mistura reativa e 1 mL de amostra. Devidamente homogeneizado, os tubos foram deixados em banho de água fervente por 10 minutos. Após a fervura, levou-se os tubos a um banho de gelo e foi adicionado, em cada tubo, 2,0 mL da solução arseno-molibdica. Agitou-se o sistema para eliminar os gases formados e completou-se o volume do tubo para 25 mL com água destilada. Após repouso de 20 min, fez-se leituras da absorvância em 540 nm.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)