

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. OBTENÇÃO DE G6PDH EM PROCESSO DESCONTÍNUO

Foram efetuados treze ensaios em processo fermentativo descontínuo visando estudar a influência de algumas condições de cultivo sobre a obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase a partir do microrganismo geneticamente modificado *Saccharomices cerevisiae* W303-181. A seguir temos a Tabela 5.1 que descreve as variáveis estudadas em cada um dos treze ensaios.

Tabela 5.1: Ensaios Descontínuos de *S.cerevisiae* W303-181 mantendo-se fixos N = 400 rpm e T = 30° C.

Ensaios Preliminares	Variável em Relação ao Ensaio Padrão	Condições de Cultivo
D-1	Ensaio Padrão (Estudos Anteriores)	$\phi_{ar} = 1,7$ vvm; pH 5,7;; C:N 6,7 g/g; Glicose: 20g/L; YNB: 7,4 g/L; Micronutrientes: 20mg/L
D-2	Glicose; C:N	C:N 3,35 g/g; Glicose:10 g/L
D-3	Aeração; C:N; Glicose	$\phi_{ar} = 0,8$ vvm; C:N 3,35 g/g; Glicose: 10 g/L;
D-4	Glicose; YNB; Micronutrientes;	Glicose: 10 g/L; YNB: 3,7 g/L; Micronutrientes: 10 mg/L
D-5	Glicose; YNB	Glicose: 10 g/L; YNB: 3,7 g/L
D-6	Aeração; Glicose; YNB	$\phi_{ar} = 2,2$ vvm; Glicose: 10 g/L; YNB: 3,7 g/L
Ensaios Finais	Variável de Estudo	Condições de Cultivo
D-7	Aeração; pH	$\phi_{ar} = 1,7$ vvm; pH 4,6
D-8	Aeração; pH	$\phi_{ar} = 2,2$ vvm pH 4,6
D-9	Aeração; pH	$\phi_{ar} = 0,8$ vvm; pH 4,6
D-10	Aeração; pH; Glicose	$\phi_{ar} = 0,8$ vvm; pH 5,7; Glicose: 20 g/L
D-11	Aeração; pH	$\phi_{ar} = 0,8$ vvm; pH 5,7
D-12	Aeração; pH	$\phi_{ar} = 0,0$ vvm; pH 5,7
D-13	Aeração; pH	$\phi_{ar} = 0,0$ vvm; pH 4,6

Foram efetuados seis ensaios preliminares visando a otimização do cultivo através da variação das concentrações de nutrientes e da aeração empregada. Após esta otimização preliminar foi efetuado um estudo complementar da interferência do binômio pH/aeração sobre a produção da enzima G6PDH pelo microrganismo estudado.

JIN *et al.* (1997) desenvolveram uma análise do balanço estequiométrico de fluxos metabólicos para o cultivo de levedura modificada geneticamente para examinar a fisiologia celular e a relação entre a produção de proteínas heterólogas e os fluxos metabólicos. Efetuando cultivos em meios contendo Galactose e Galactose com Etanol, concluíram que o consumo de fonte de Carbono para a biossíntese da proteína heteróloga foi entre duas a cinco vezes maior durante a fase exponencial em relação à fase estacionária e que houve uma amplificação da atividade da Via das Pentoses resultando em um aumento da expressão da proteína heteróloga e da formação de ATP. Concluiu-se, portanto, que para obter-se a maior produção de G6PDH era necessário prolongar ao máximo a fase exponencial de cultivo da levedura e buscar a melhor condição para que se tivesse a máxima atividade da Via das Pentoses.

Segundo WHITE (1954), a obtenção de elevadas concentrações de células depende do pH, temperatura, componentes do meio de cultura e da eficiência no transporte de oxigênio até as células.

A seguir descrevemos os resultados obtidos para cada variável analisada no processo descontínuo tendo na Tabela 5.2 um resumo dos principais parâmetros obtidos em cada um dos treze ensaios realizados.

Tabela 5.2: Resultados e Parâmetros obtidos para ensaios descontínuos.

Ensaio	T* (h)	Y* <sub>X/S</sub> (g cél./g subst.)	Pr* <sub>X</sub> (U/L .h)	Pr* <sub>G6PDH</sub> (U/L .h)	Ae (U/g cél)
D-1 (Padrão)	20	0,19	0,08	6,1	55
D-2	10	-----	----	0,3	24
D-3	3	-----	----	----	6
D-4	2	0,07	0,07	2,2	18
D-5	12	0,13	0,05	4,7	45
D-6	12	0,28	0,13	10,5	86
D-7	8	0,18	0,10	5,4	78
D-8	12	0,10	0,09	3,3	29
D-9	8	0,08	0,08	3,8	29
D-10	12	0,04	0,06	0,3	9
D-11	4	0,09	0,05	5,8	22
D-12	12	0,03	0,03	2,3	25
D-13	6	0,04	0,07	4,8	27

### 5.1.1. Ensaios variando concentração de Glicose (D-1 e D-5):

A seguir estão dispostos os gráficos de crescimento celular e atividades específicas dos ensaios onde a variável estudada foi a concentração da fonte de carbono (glicose) fornecida no meio de cultivo:

Através dos resultados expostos concluiu-se que para o ensaio utilizando 20g/L de Glicose (D-1), houve acoplamento parcial entre crescimento celular e consumo de substrato e acoplamento total entre consumo de substrato e a biossíntese de G6PDH. A máxima velocidade específica de crescimento celular e consumo de glicose ocorreram em 12 e 16h de cultivo, respectivamente, tendo início um decaimento de seus valores após esse período.

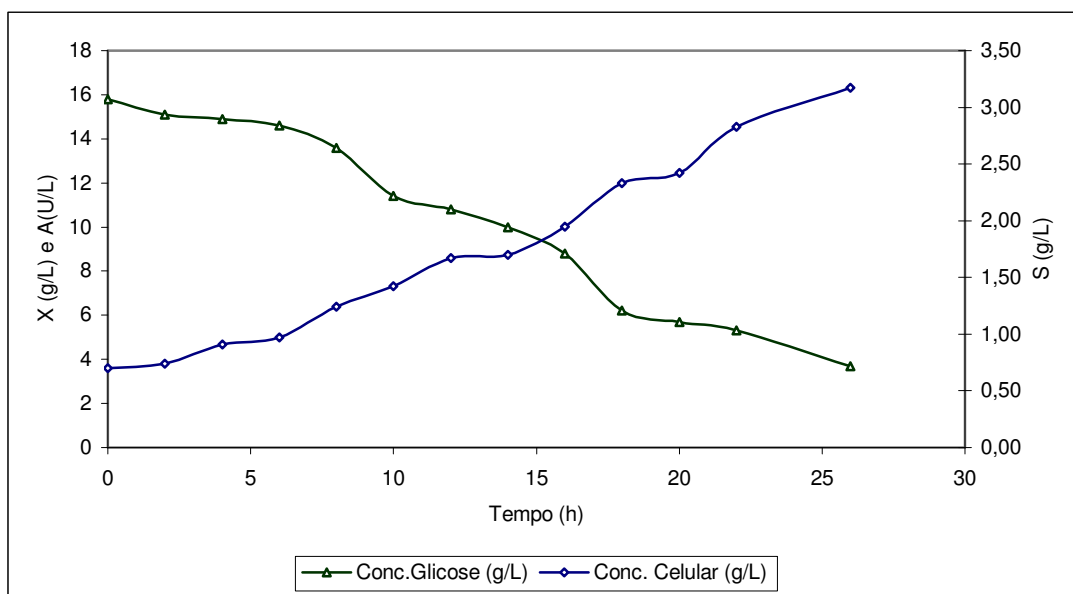


Figura 5.3: Variação da Concentração Celular (X) e Concentração de glicose (S) no decorrer do tempo (t) no Ensaio D-1.

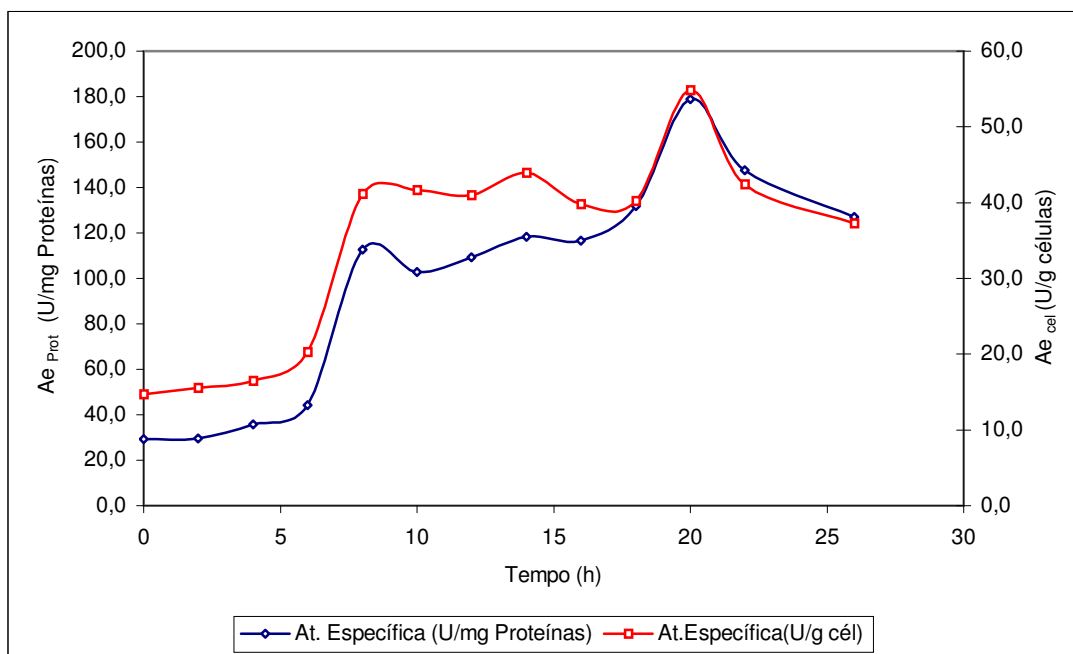


Figura 5.4: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-1.

Através dos gráficos 5.3 e 5.4 podemos verificar que houve crescimento celular durante todo o cultivo, porém, o consumo de glicose e a biossíntese de G6PDH começaram a cair após 18h. Por ainda existir cerca de 6,0 g/L de Glicose neste tempo de cultivo, não se pôde afirmar que a queda nas velocidades de consumo de glicose e de biossíntese de G6PDH estivessem ligadas à escassez da fonte de carbono. Uma justificativa a ser considerada, então, seria a presença de metabólitos inibidores à biossíntese de G6PDH. Estes metabólitos seriam acumulados durante todo o cultivo e atingiriam uma concentração inibitória neste ponto da fermentação gerando uma alteração nas vias metabólicas utilizadas pelo microrganismo nesta nova condição a que estaria sendo exposto (final da fermentação). Sabe-se que o sinal que inicia a repressão pela glicose é desconhecido, porém, acredita-se que esteja ligado aos níveis de glicose-6-fosfato. Sendo a glicose-6-fosfato o substrato da enzima G6PDH e a síntese da enzima depende da demanda ocasionada pela reação de conversão de glicose-6-fosfato em 6-fosfogliconato, temos que, quando em uma situação de inibição por substrato, os níveis de G6PDH obtidos tendem a cair.

Através dos perfis de curvas obtidos para  $\mu_s$  Vs. T,  $\mu$  Vs. T e  $\mu_P$  Vs. T e apresentados no item 5.1.9 (Gráficos 5.29 e 5.30), verificou-se um desacoplamento entre crescimento celular e biossíntese da G6PDH após 18h de cultivo e, através do gráfico 5.4, verificou-se desacoplamento entre a produção de proteínas e a biossíntese de G6PDH diante da queda da atividade específica em proteína (U/mg Proteínas totais). Estes resultados indicam que após 18h, o microrganismo deixa de priorizar a biossíntese de G6PDH e passa a produzir outro tipo de proteína, o que confirmaria uma alteração das vias metabólicas utilizadas após esse tempo de cultivo. Uma outra possível justificativa para a queda na biossíntese de G6PDH ao final de cultivo seria a escassez de micronutrientes, necessários a essa biossíntese (Histidina, Triptofano, Adenina e Uracila), e que foram fornecidos no meio sintético utilizado.

Uma forma de se buscar a confirmação para essa justificativa vem da própria modificação genética do microrganismo, em que foram bloqueadas

as vias metabólicas para a biossíntese dos quatro micronutrientes adicionados ao meio. O bloqueio da enzima ADE13, existente na via de síntese da Adenina, gera o acúmulo de um precursor desta via, que tem como característica a coloração rósea. Quando da escassez de Adenina no meio, a levedura passa a ativar a via correspondente à biossíntese da Adenina, o que resultará no acúmulo do precursor róseo (adenylosuccinato). O tempo em que o meio de cultivo passou a ter coloração rósea intensa foi verificado e anotado para todos os ensaios e, no caso, foi no tempo de 18h de cultivo que o meio adquiriu a tonalidade descrita, o que justifica a afirmação de estarmos trabalhando com escassez de micronutrientes nesta condição.

Ao analisarmos o ensaio D-5, onde a concentração de Glicose foi reduzida à metade, e tendo por base os resultados apresentados nas tabelas A4.3 e A4.4 do APÊNDICE IV, verificamos que houve um crescimento celular de 37% e o consumo de Glicose atingiu 97%, enquanto que para o ensaio D-1 (20g/L Glicose), nestas referidas tabelas, o crescimento celular e o consumo de Glicose foram da ordem de 77% o que indica que o consumo de Glicose estava em grande parte sendo desviado para o metabolismo basal do microrganismo e para a divisão celular. O mesmo não foi verificado quando se utilizou 10 g/L de Glicose, onde o baixo crescimento indica um desvio da glicose consumida para a biossíntese de outros componentes do metabolismo, no caso, da G6PDH. O menor crescimento celular implicou em uma queda no fator de conversão substrato/célula ( $Y_{X/S}$ ) quando da utilização de 10g/L de Glicose. Esta variação foi da ordem de 41% mas resultou em um aumento de 29,4% no valor alcançado para o fator de conversão célula/produto ( $Y_{P/X}$ ), em relação aos valores obtidos para 20g/L de Glicose, e que estão dispostos na tabela A4.1 do APÊNDICE IV, o que vem a confirmar que a glicose desviada do crescimento celular foi utilizada para a biossíntese da G6PDH.

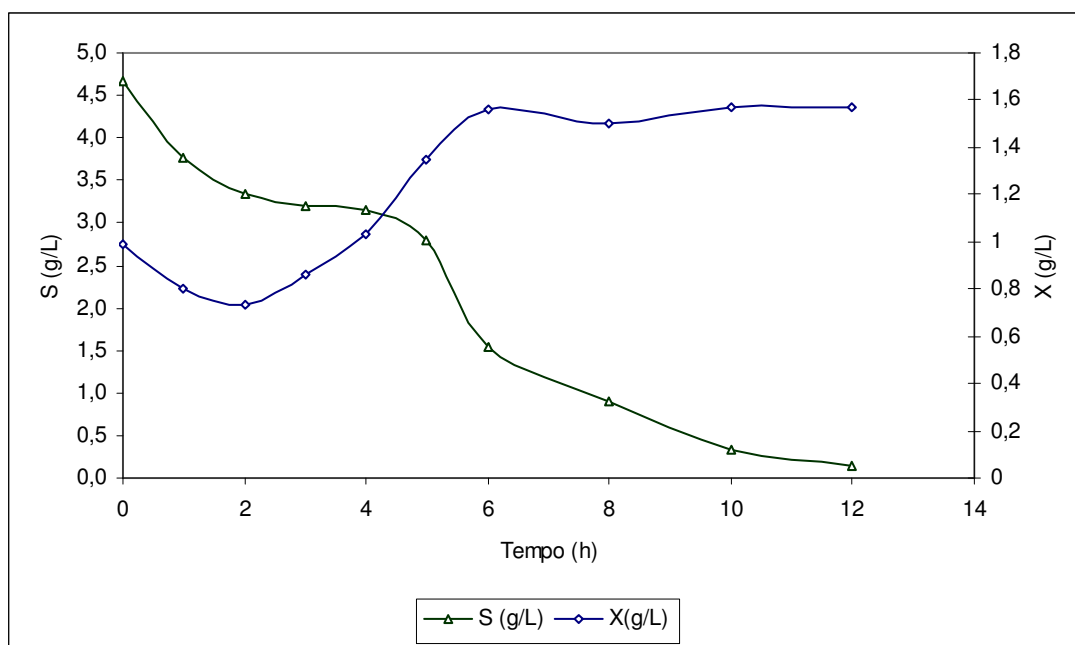


Figura 5.5: Variação da Concentração Celular (X) e concentração de Glicose (S) em função do tempo (t) no Ensaio D-5

Através dos resultados expostos nos gráficos 5.5 e 5.6 concluiu-se que para o ensaio utilizando 10g/L de Glicose, houve acoplamento entre crescimento celular, consumo de substrato e a biossíntese de G6PDH.

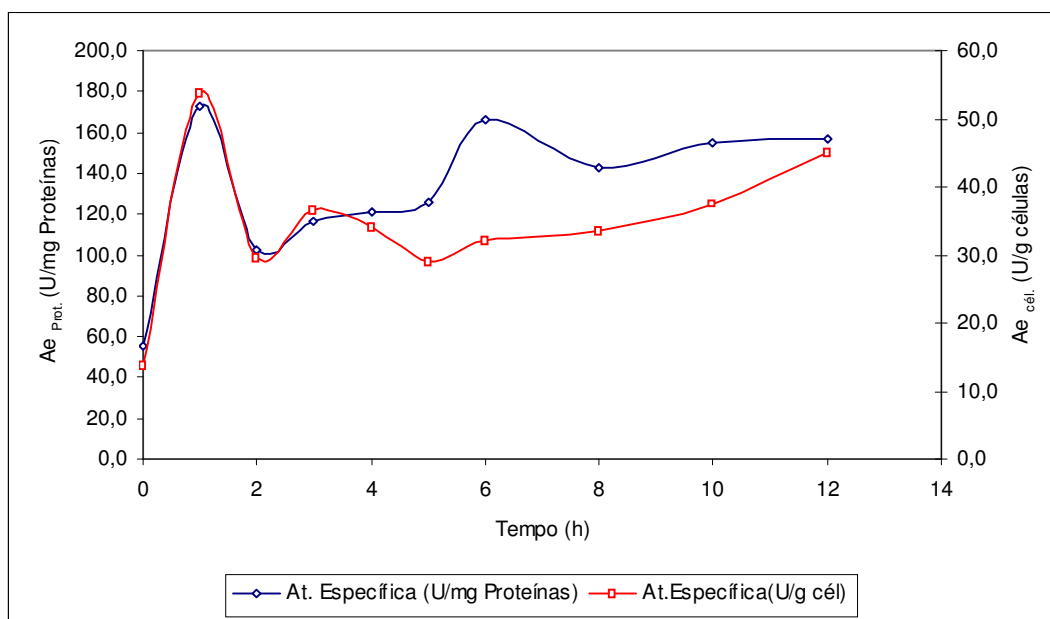


Figura 5.6: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cél}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-5

A melhora nos resultados, quando ocorreu acoplamento entre crescimento celular, consumo de glicose e biossíntese de G6PDH indicam que a máxima produção de G6PDH ocorrerá em cultivos onde as condições utilizadas permitam este acoplamento.

Através da Tabela A3.5 podemos verificar que após 8h de ensaio ocorreu desacoplamento entre crescimento celular e biossíntese de G6PDH, uma vez que a atividade enzimática continuou aumentando mesmo após ter sido atingida a fase estacionária de crescimento celular neste cultivo.

A tabela A3.5 mostra que, no final do cultivo, a glicose consumida estava sendo utilizada principalmente para a biossíntese de G6PDH, uma vez que o aumento na concentração de proteínas era acompanhado por um aumento na atividade enzimática obtida. Este aumento na atividade enzimática, mesmo diante de um meio limitado em Glicose (em 6h de ensaio tinha-se 1,54g/L de Glicose) e do início da fase estacionária de crescimento celular, indica que ainda não havia sido atingida a condição onde os micronutrientes estivessem em concentração limitante para a manutenção da biossíntese da G6PDH e manutenção celular.

Sabe-se que altas concentrações de Glicose podem causar o chamado *Efeito Crabtree*, ou seja, uma repressão do metabolismo da levedura, gerando a conversão do Piruvato em Etanol e, com isso, redução no ATP formado pelo Ciclo de Krebs.

Os resultados obtidos comprovaram que ao reduzirmos a concentração de Glicose, ocorreu uma redução no tempo final de cultivo e uma melhora no tempo de geração, conforme podemos verificar na Tabela A3.5, do APÊNDICE III. Este resultado sugere a existência de *Efeito Crabtree* do tipo “*long-term*” (PRONK *et al.*, 1996) quando utilizamos as condições do ensaio D-1 e que isto estaria ocorrendo devido uma insuficiência na capacidade respiratória de dissimilação do Piruvato. Pode-se dizer que, nestas condições, temos uma fermentação alcoólica aeróbia sobre elevada velocidade de crescimento e sobre elevadas concentrações de Glicose.

Outra justificativa estaria no fato de que, ao trabalharmos com elevadas concentrações de Glicose, estaremos reduzindo a captação de Glicose pelo



seu sistema metabólico de alta afinidade, que é dependente da Hexoquinase. Com isso, a maior parcela da Glicose está sendo captada pelo seu sistema de baixa afinidade, ou seja, pela difusão facilitada, que independe da Hexoquinase (BISSON,1983 ; HORAJ, 1997).

### 5.1.2. Ensaios variando relação carbono-nitrogênio (D-1, D-2 e D-3):

Analisando a influência da relação carbono-nitrogênio sobre a biossíntese da G6PDH, concluiu-se pelos dados expostos na tabela A3.1 (Ensaio Padrão) e A3.2 que uma relação 3,35 g/g (D-2), onde a quantidade de nitrogênio disponível no meio é maior, não era favorável ao crescimento celular e biossíntese de G6PDH. A quantidade de íons amônio pode causar um efeito inibitório no crescimento celular e na biossíntese de algumas proteínas (MENDOZA-VEGA et al., 1994).

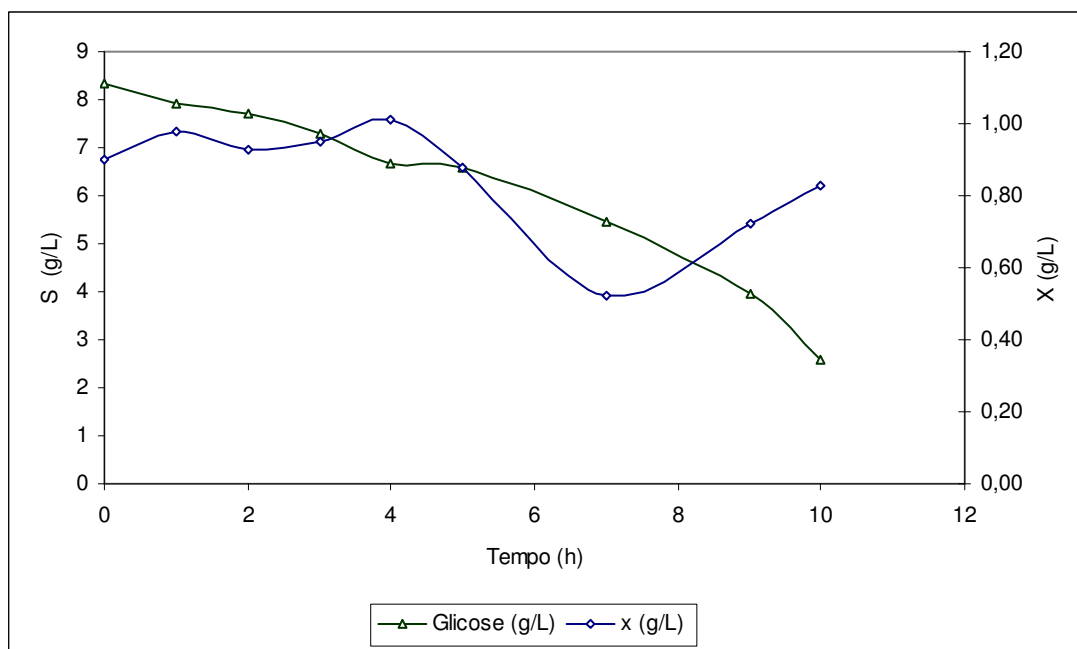


Figura 5.7: Variação da Concentração Celular (X) e concentração de Glicose (S) em função do tempo (t) no Ensaio D-2

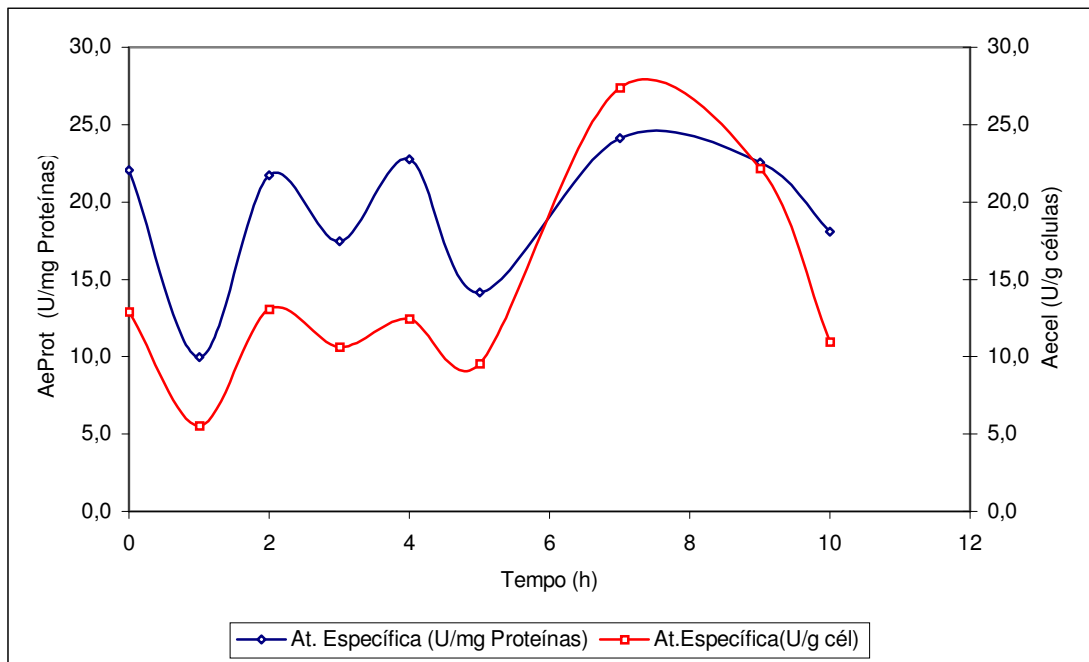


Figura 5.8: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-2

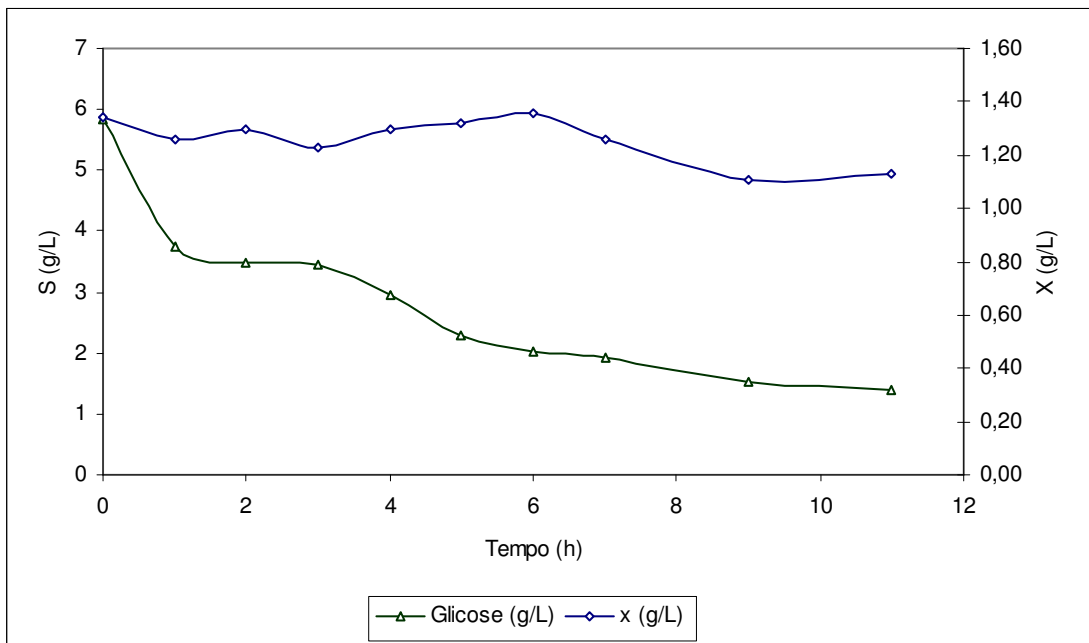


Figura 5.9 : Variação da Concentração Celular ( $X$ ) e concentração de Glicose ( $S$ ) em função do tempo ( $t$ ) no Ensaio D-3

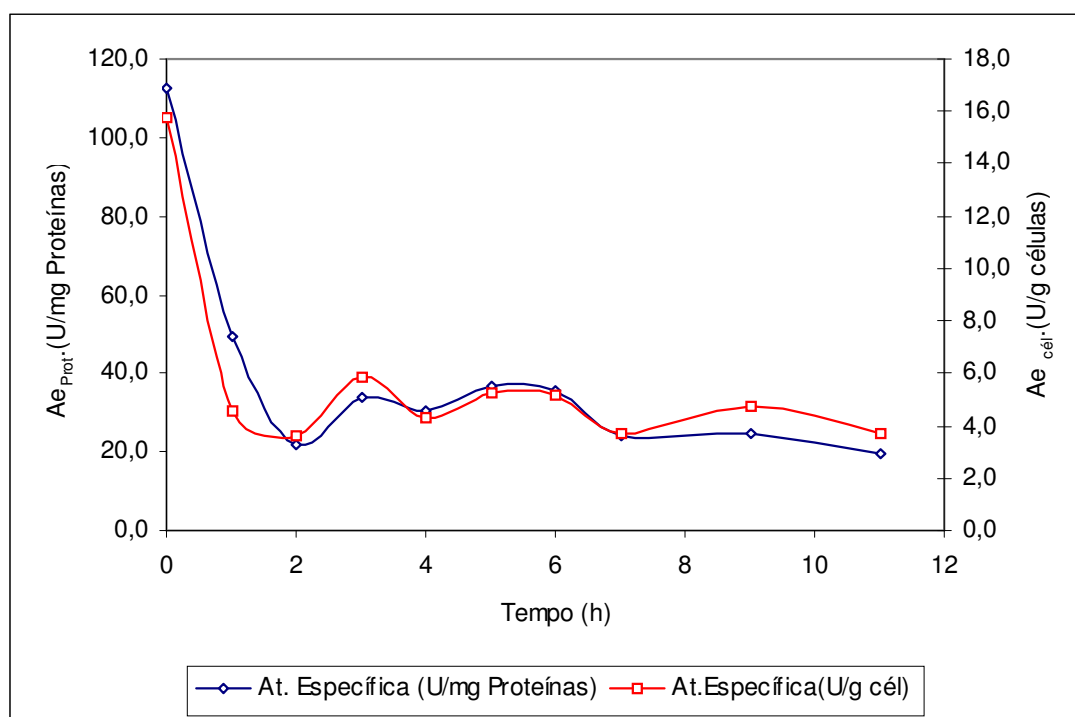


Figura 5.10: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-3

Diante de uma taxa de crescimento celular de 11%, como a verificada para este ensaio e exposta na Tabela A4.3., do APÊNDICE IV, pode-se dizer que o crescimento celular foi afetado pelo Efeito Amônia que ocorreu neste cultivo.

Segundo LANG *et al.* (1997), um aumento na relação carbono-nitrogênio de 4g/g para 6,5g/g resultou em um alto nível de produtividade, à qual permaneceu constante durante todo o cultivo. Foi descrito também que menores concentrações de nitrogênio (4g/g) foram suficientes para que tivéssemos um bom crescimento.

Ao analisarmos os resultados apresentados neste trabalho, notamos que as mesmas conclusões podem ser obtidas uma vez que o melhor resultado em produção de G6PDH foi obtido quando da utilização da relação carbono-nitrogênio 6,7 g/g (D-1), ocorrendo queda da atividade enzimática durante o cultivo quando utilizando 3,35 g/g (D-2).

O “Efeito Amônia” foi descrito por WIAME *et al.* (1985) e MENDOZA-VEGA *et al.* (1994) e seria a repressão causada pelo excesso de íons amônia presente no meio. A repressão catabólica por nitrogênio é um fenômeno regulatório que inibe fortemente a transcrição de genes que codificam proteínas (ROUSSELET *et al.*, 1995), influenciando também na concentração de NADP presente no interior da célula.

### 5.1.3. Ensaios variando concentração de micronutrientes (D-4 e D-5):

Analisando a influência da concentração de micronutrientes adicionados no meio, concluiu-se que os micronutrientes desempenham papel fundamental durante o cultivo e apresentam uma concentração limite onde, abaixo da mesma, não ocorreria crescimento celular e biossíntese de G6PDH.

A seguir são apresentados os gráficos de crescimento celular e atividades específicas em função do tempo para o ensaio utilizando 10 mg/L de micronutrientes (D-4):

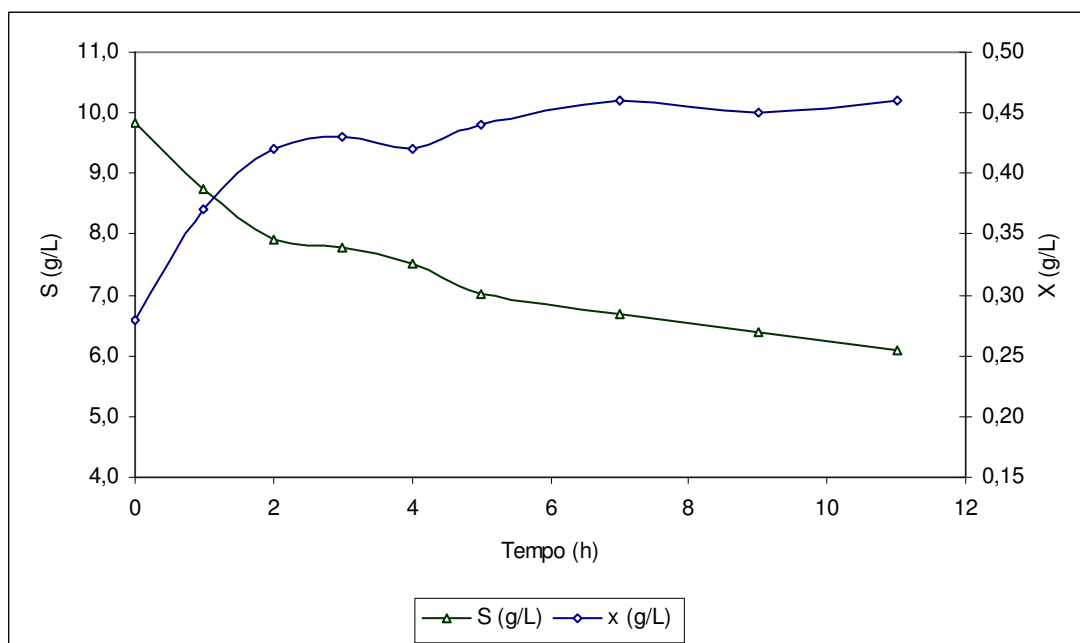


Figura 5.11: Variação da Concentração Celular (X) e concentração de Glicose (S) em função do tempo (t) no Ensaio D-4

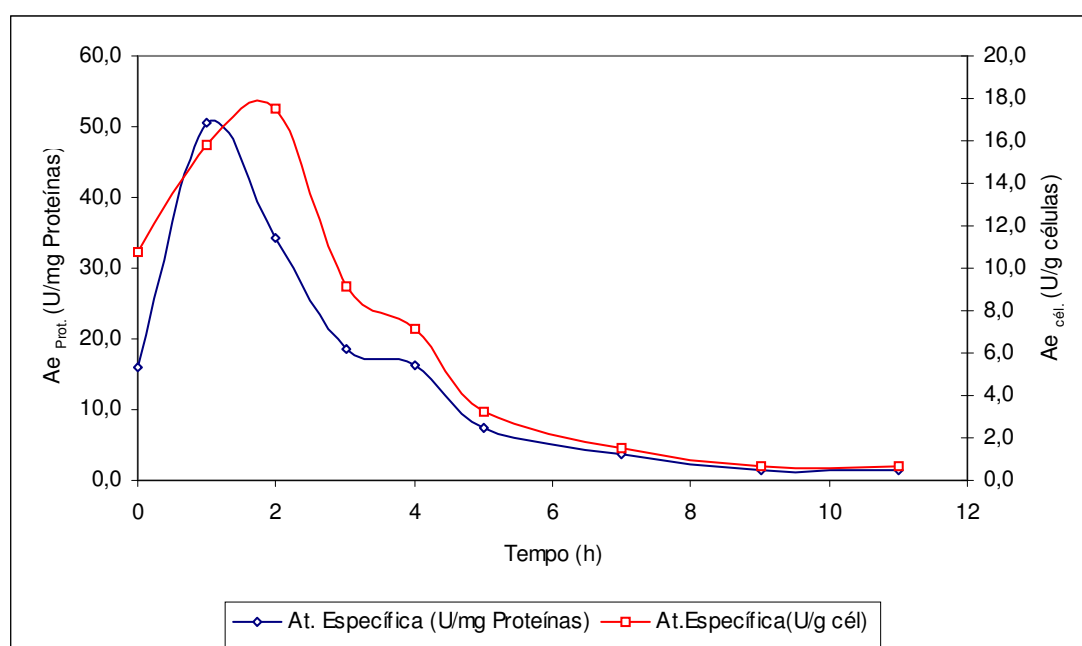


Figura 5.12: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-4

De acordo com os resultados obtidos para o ensaio D-4 e apresentados nos gráficos 5.11 e 5.21, além da tabela A3.4. do APÊNDICE III, verificou-se que uma concentração de 10mg/L de micronutrientes é insuficiente para o microrganismo. Através do gráfico 5.11, verificamos que houve crescimento celular apenas durante as duas primeiras horas de cultivo, seguindo-se uma longa fase estacionária. Apesar do pequeno período de crescimento celular houve um crescimento da ordem de 39%, conforme verificado na Tabela A4.3., do APÊNDICE IV, e o consumo de glicose foi da ordem de 38%, conforme verificado na Tabela A4.4., do APÊNDICE IV. Diante destes resultados, conclui-se que a maior parte da Glicose consumida pelo microrganismo foi utilizada no crescimento celular (duas primeiras horas) e na manutenção celular.

O gráfico 5.12 mostra a queda na atividade enzimática após duas horas de cultivo, o que indica não só a inativação da biossíntese de G6PDH, como a provável utilização dos aminoácidos que compõem sua estrutura para a biossíntese de proteínas essenciais ao metabolismo celular. A necessidade de utilizar aminoácidos prontos e presentes na estrutura da G6PDH

disponível e em excesso no interior da célula viria da carência de dois aminoácidos e duas bases nitrogenadas no meio, o que estaria limitando o metabolismo basal.

Como mostra o gráfico 5.12 a concentração de proteínas continuou aumentando no decorrer do cultivo, mesmo diante da queda da atividade de G6PDH e da fase exponencial de crescimento celular, o que indica que a proteína produzida não veio da biossíntese da G6PDH, reforçando a idéia da utilização de aminoácidos da própria estrutura da G6PDH.

Conclui-se que a concentração de 10mg/L para estes micronutrientes é considerada limitante para a síntese de proteínas, o que faz com que o microrganismo desvie seu metabolismo energético e passe a privilegiar as vias diretamente ligadas à manutenção da célula, impedindo o crescimento celular e a síntese de proteínas heterólogas, notadamente, da G6PDH através do plasmídeo inserido.

LANG *et al.* (1997) estudaram diversas fontes de aminoácidos (como caseína, peptona e extrato de levedura) e verificaram que todos os suplementos testados apresentaram efeito positivo na produção de biomassa e, em particular, o extrato de levedura influenciou em um melhor resultado para a produtividade da proteína de interesse por grama de massa seca. Foi também verificado que o uso de concentrações superiores a 2% para essa fonte alternativa incorrerá em aumento na produtividade da proteína de interesse e não incorre em problemas de perda de plasmídeo. Através destes resultados podemos sugerir estudos futuros para o *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 utilizando outras fontes de aminoácidos mais baratas do que a utilizada no preparo do meio de cultivo sintético utilizado neste trabalho.

#### **5.1.4. Ensaios variando pH e Aeração (D-5 a D-13):**

A aeração e o pH foram os parâmetros estudados desde o ensaio D-5 até o ensaio D-13, de forma que pudesse abranger todas as situações possíveis de aeração (ambiente microaerado, baixa aeração, aeração moderada e aeração elevada). Cada aeração foi verificada para os dois pH

estudados (4,6 e 5,7) e que, segundo ROSSI (2002) seriam os dois valores de pH mais adequados para o cultivo deste microrganismo.

SILVA *et al.* (2001) comentam que, por se tratar de um microrganismo facultativo, o *S.cerevisiae* tem no oxigênio um fator crucial para a definição de seu metabolismo, porque este participa na geração de energia, através da cadeia respiratória (CTE – Cadeia de Transporte de Elétrons) dentro da mitocôndria e que, por sua vez, é fundamental para a obtenção de velocidades específicas de crescimento celular significativas.

Segundo OURA (1974), a capacidade de leveduras manterem um metabolismo aeróbio varia quando cultivadas sobre diferentes intensidades de aeração, sendo este, o principal agente controlador da capacidade de crescimento da levedura utilizando somente o metabolismo oxidativo. Segundo SILVA *et al.* (2001), a maior produtividade obtida no cultivo de *S.cerevisiae* visando a obtenção de Hexoquinase foi correspondente ao  $K_{La}$  de  $60h^{-1}$ , que seria resultado de uma aeração de 1,7vvm sob agitação de 400rpm, portanto, sob condições de aeração moderada. SILVA *et al.* (2001) também citaram que não houve aumento na produtividade quando da utilização de valores de  $K_{La}$  maiores que  $60h^{-1}$  e justificaram este resultado como sendo causado pela saturação da via respiratória pelo oxigênio.

OURA (1974) também comenta que elevadas concentrações de oxigênio no meio durante o cultivo, interferem no metabolismo, pois, podem surgir efeitos tóxicos de hiperoxia e que podem ser notados com o aparecimento anormal de etanol ou acetaldeído.

Ao analisarmos os ensaios de aeração efetuados em pH 5,7, verificou-se que os melhores resultados foram alcançados nos ensaios em elevada aeração (2,2vvm – Ensaio D-6). Através dos dados apresentados nas tabela 5.2 verificamos um aumento significativo nos parâmetros de produtividade em célula e em G6PDH quando comparamos o ensaio em 2,2vvm (D-6) com os ensaios nas demais condições (D-5, D-11 e D-12).

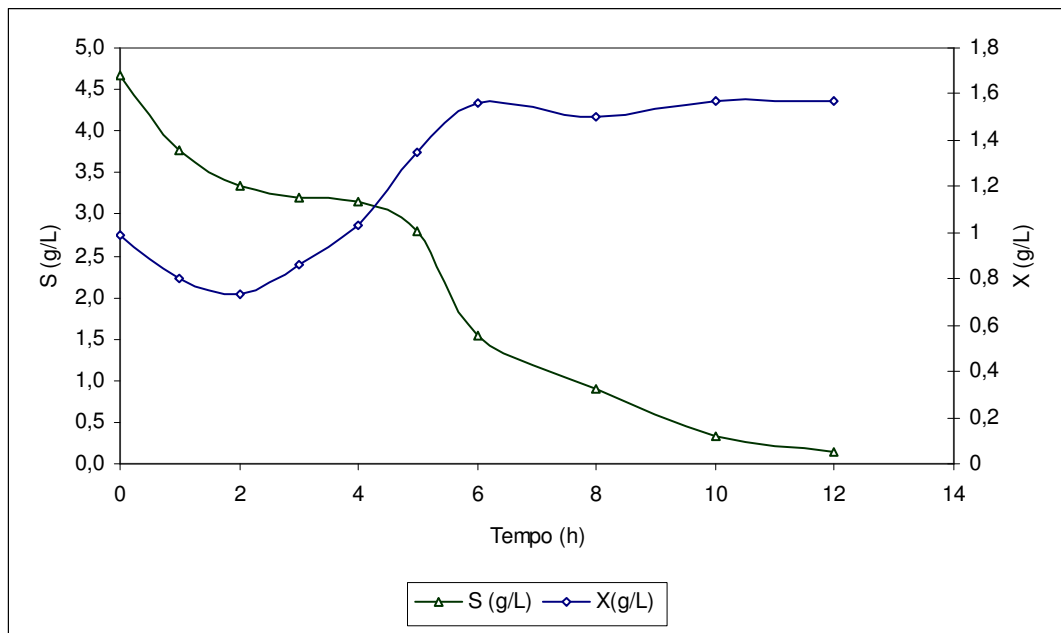


Figura 5.13: Variação da Concentração Celular (X) e concentração de Glicose (S) em função do tempo (t) no Ensaio D-5

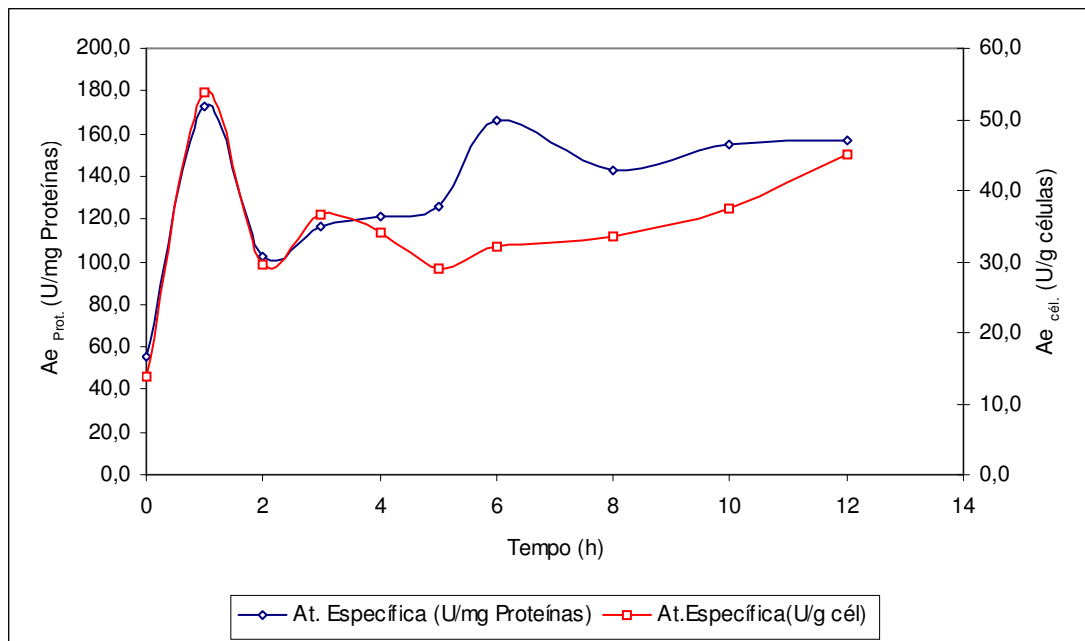


Figura 5.14: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-5



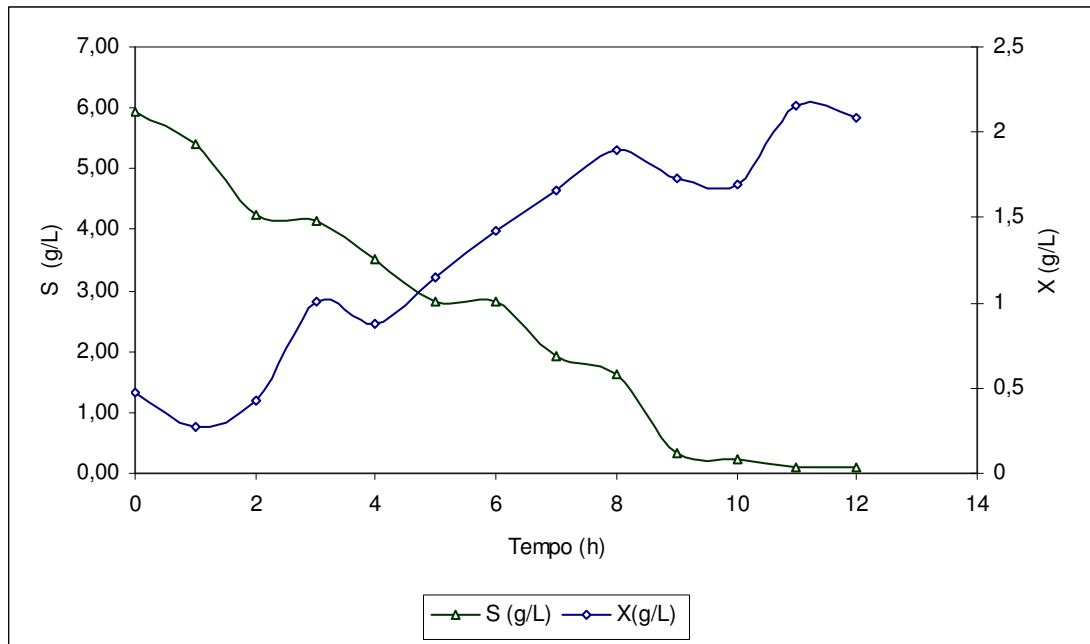


Figura 5.15: Variação da Concentração Celular (X) e concentração de Glicose (S) em função do tempo (t) no Ensaio D-6

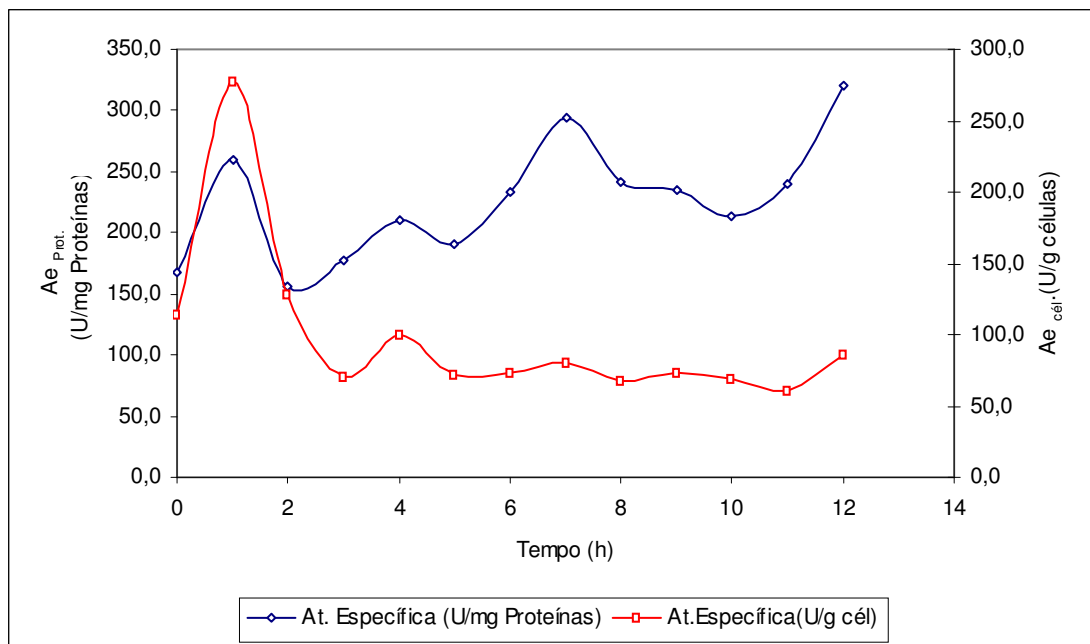


Figura 5.16: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-6

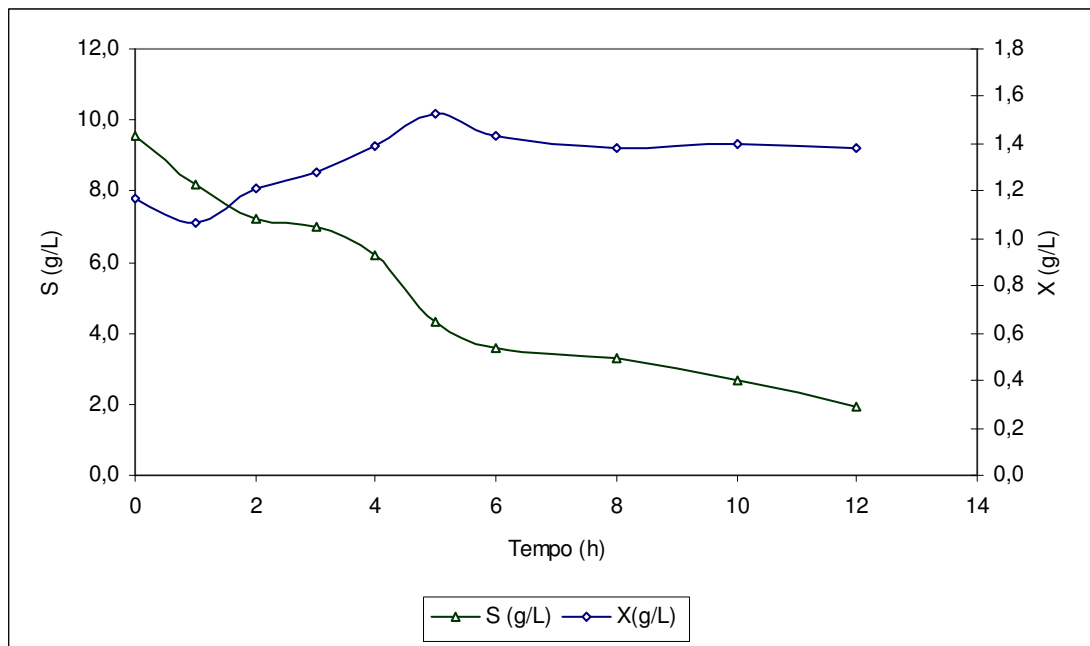


Figura 5.17: Variação da Concentração Celular (X) e concentração de Glicose (S) em função do tempo (t) no Ensaio D-11

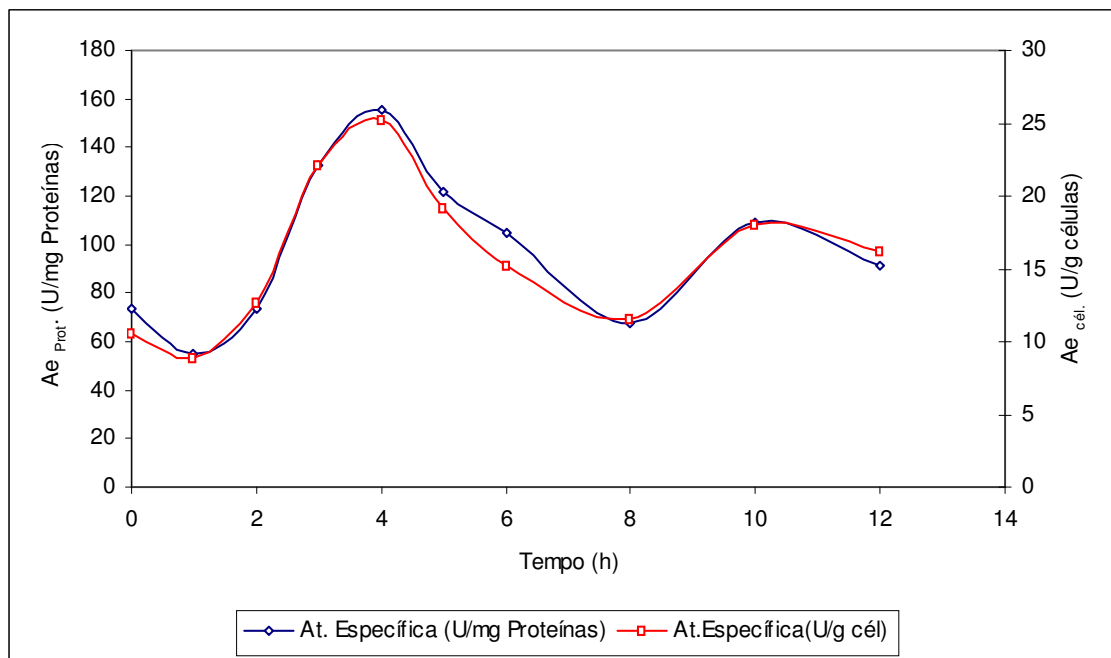


Figura 5.18: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-11

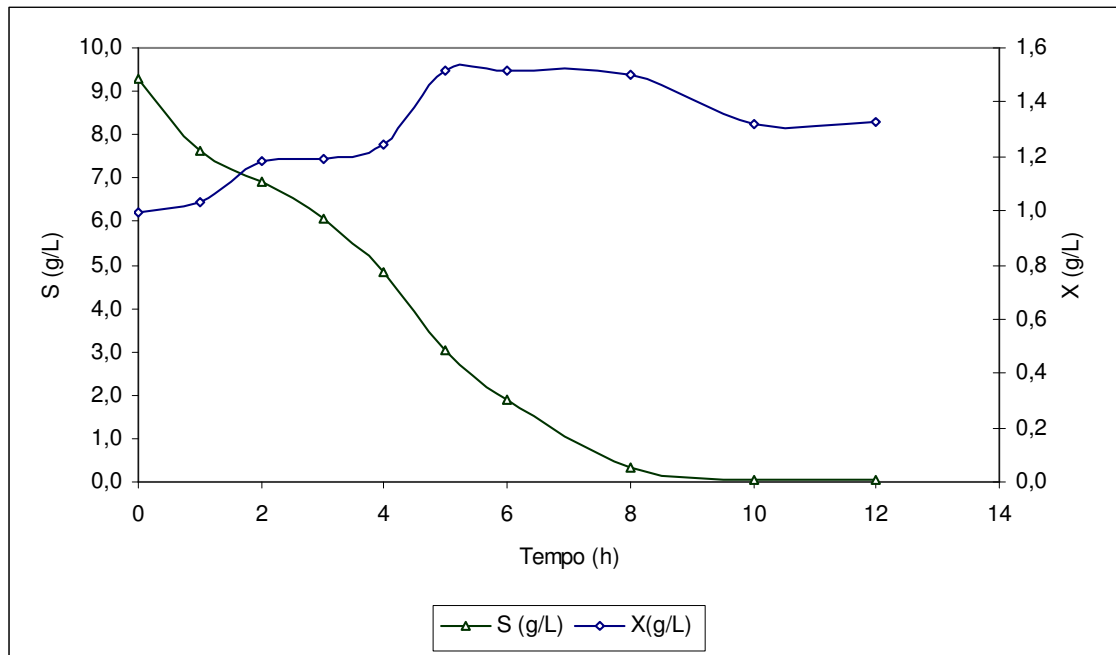


Figura 5.19: Variação da Concentração Celular (X) e concentração de Glicose (S) em função do tempo (t) no Ensaio D-12

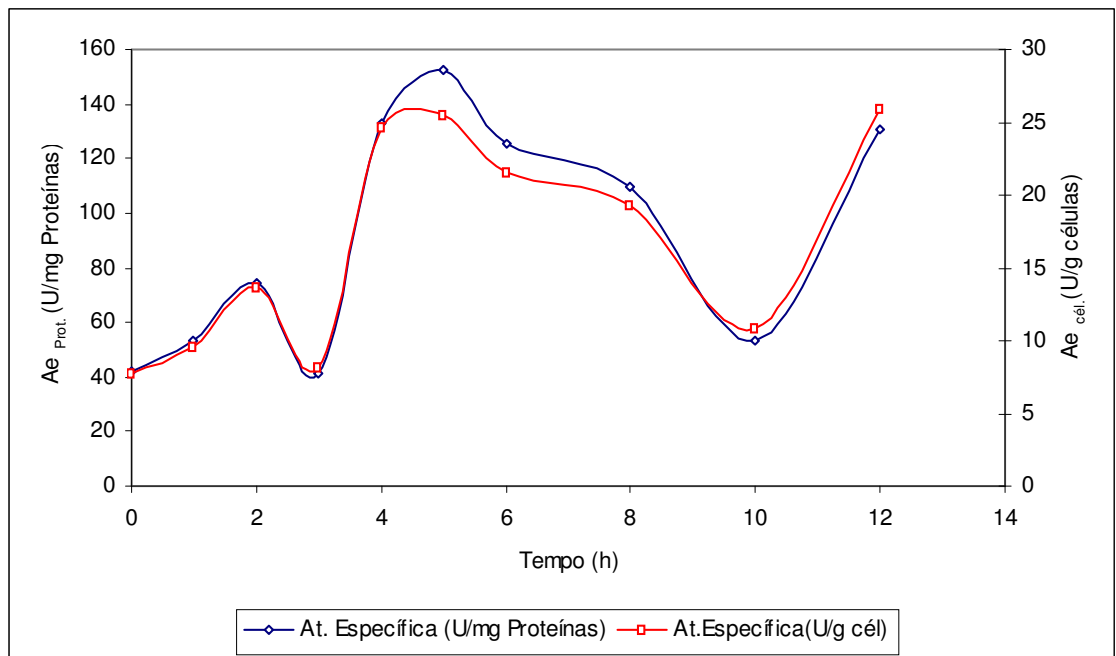


Figura 5.20: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-12

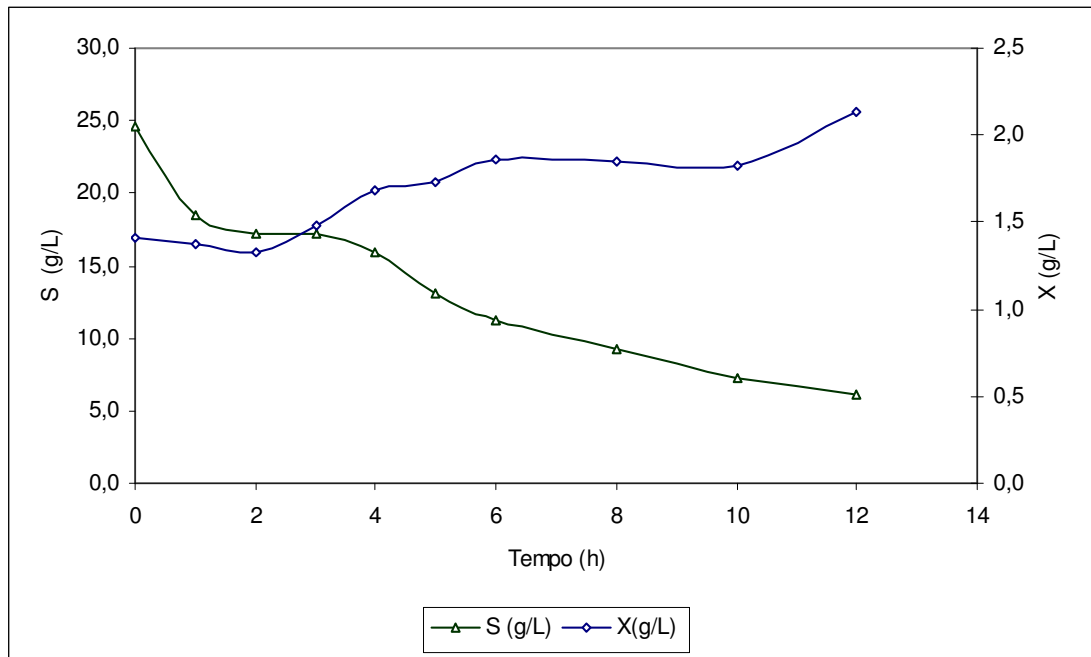


Figura 5.21: Variação da Concentração Celular (X) e concentração de Glicose (S) em função do tempo (t) no Ensaio D-10

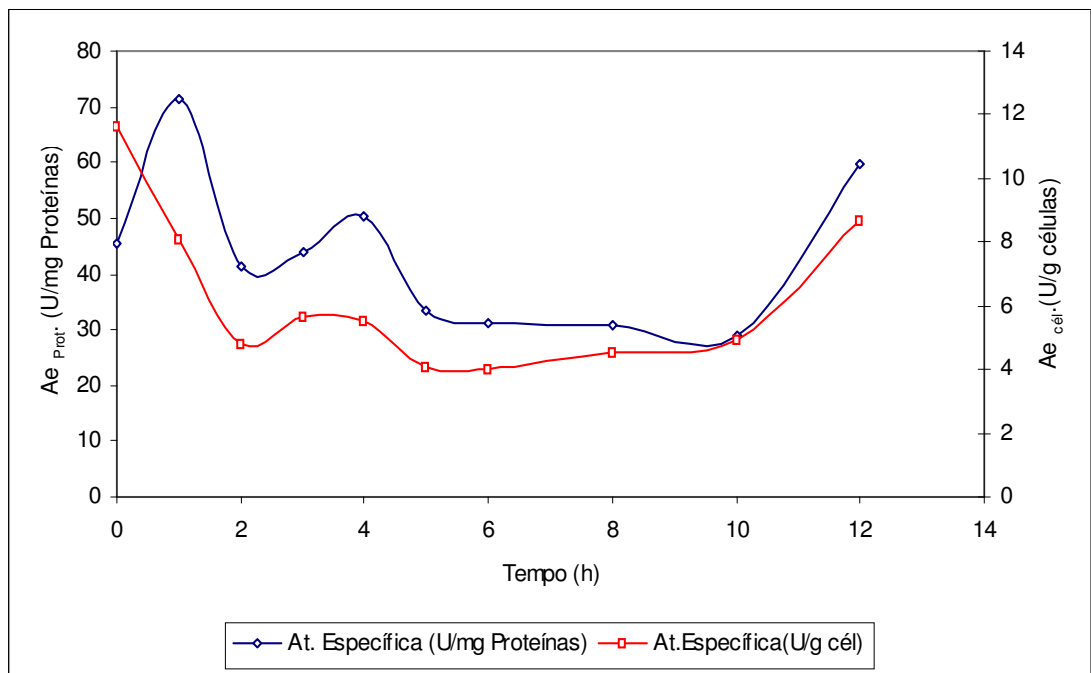


Figura 5.22: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-10

O crescimento celular também foi otimizado nessas condições, o que pôde ser verificado ao compararmos os resultados obtidos para  $Y_{X/S}$ . (Tabela A4.1 – APÊNDICE IV; Tabela 5.1). Estes resultados mostram a importância da aeração no metabolismo deste microrganismo, uma vez que, sendo um microrganismo de metabolismo facultativo (capaz de realizar respiração e fermentação) necessitará do suprimento de oxigênio no meio em quantidade tal que regule seu metabolismo na direção da respiração. Deslocar e manter o metabolismo da levedura de forma a regulá-las sobre respiração celular implica no aumento da disponibilidade de ATP, que passa a ser gerado pelo Ciclo de Krebs, além do que já é fornecido pela oxidação da glicose na Via Glicolítica. Por se tratar de um microrganismo modificado geneticamente (apresenta um plasmídeo inserido em seu núcleo celular), a necessidade de ATP deste será ainda maior que a do microrganismo selvagem. A necessidade de ATP não será apenas para a manutenção do seu metabolismo basal ou do crescimento celular, mas também se tem a necessidade de ATP para a biossíntese da G6PDH plasmidial.

Os resultados apresentados na Tabela A4.1. do APÊNDICE IV e Tabela 5.1 mostram que uma aeração de 0,8vvm resultou em melhor produtividade para G6PDH ( $Pr_{G6PDH}$ ) do que quando se utilizou aeração de 1,7vvm, mas o mesmo não foi verificado para os parâmetros de crescimento celular ( $Y_{X/S}$  e  $Pr_x$ ). Ou seja, os resultados indicaram que quanto maior a aeração fornecida, maior será o desvio metabólico em direção à respiração, mas não implicará no aumento da produtividade da G6PDH quando levamos em conta o máximo de G6PDH produzida. Sob baixa aeração, o microrganismo desvia seu metabolismo em direção à fermentação aeróbia, o que pode ser comprovado pelo baixo crescimento celular e um possível aumento na concentração de etanol no meio. O microrganismo deixa de fornecer ATP para o crescimento celular e passa a priorizar apenas o seu metabolismo basal. O plasmídeo tende a permanecer ativo durante o cultivo, uma vez que, sempre que houver necessidade de Leucina e G6PDH por parte do microrganismo, o mesmo estará sendo ativado.

Segundo SILVA *et al.* (2001), para elevados valores de  $K_La$  a concentração intracelular de ATP pode ser tão elevada que passe a inibir a biossíntese de Hexoquinase. Ao compararmos esta afirmação com os resultados obtidos neste trabalho para o pH 5,7, verificamos que o mesmo não ocorreu, sendo o melhor resultado atingido quando da utilização de elevada aeração.

Com relação aos ensaios utilizando pH 4,6 (Ensaio D-7, D-8, D-9 e D-13), concluiu-se que os melhores resultados surgiram quando se utilizou aeração moderada (1,7vvm) no ensaio D-7.

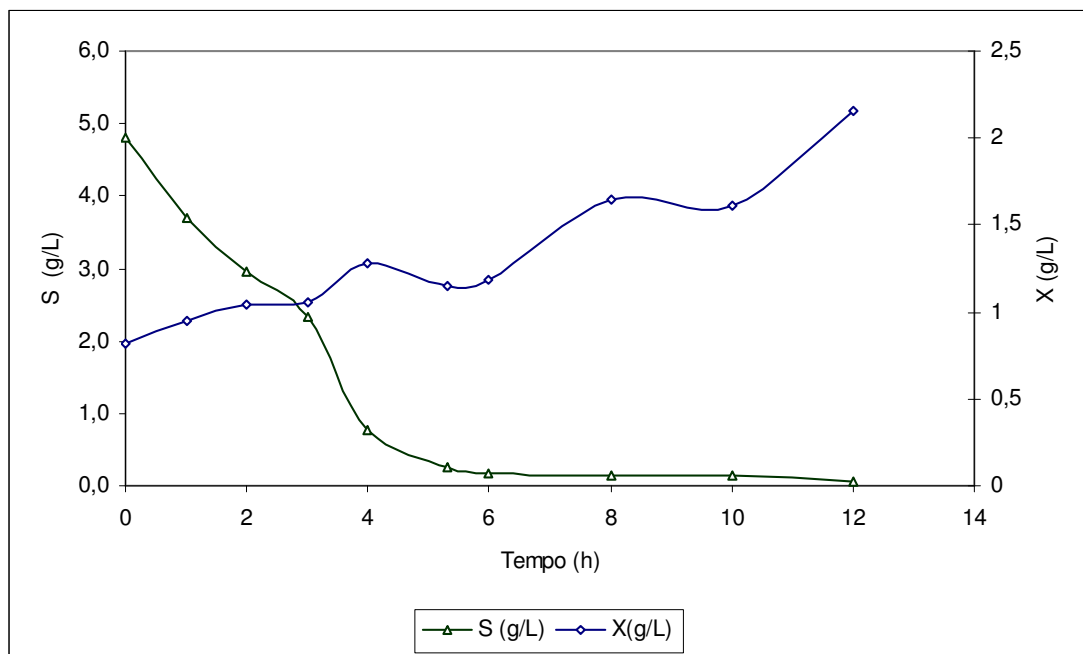


Figura 5.23: Variação da Concentração Celular (X) e concentração de Glicose (S) em função do tempo (t) no Ensaio D-7

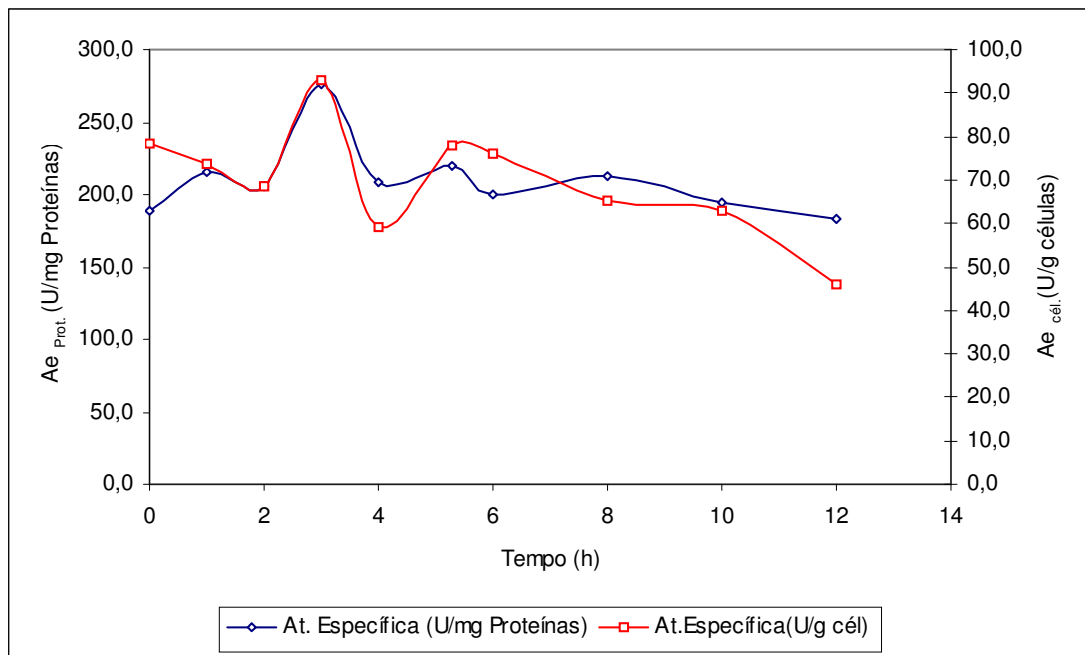


Figura 5.24: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-7

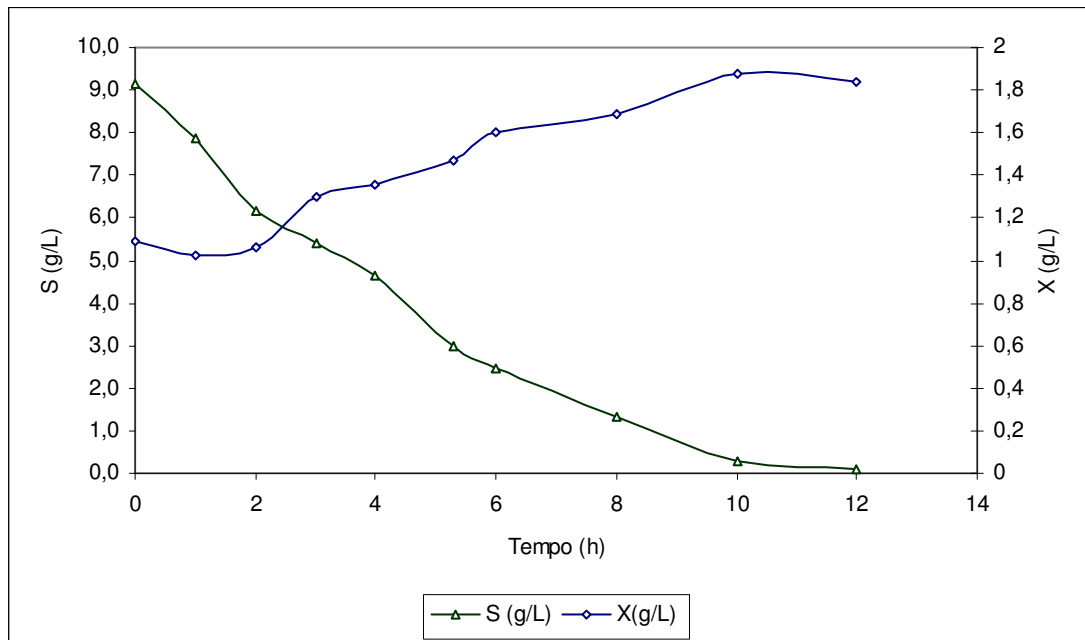


Figura 5.25: Variação da Concentração Celular ( $X$ ) e concentração de Glicose ( $S$ ) em função do tempo ( $t$ ) no Ensaio D-8

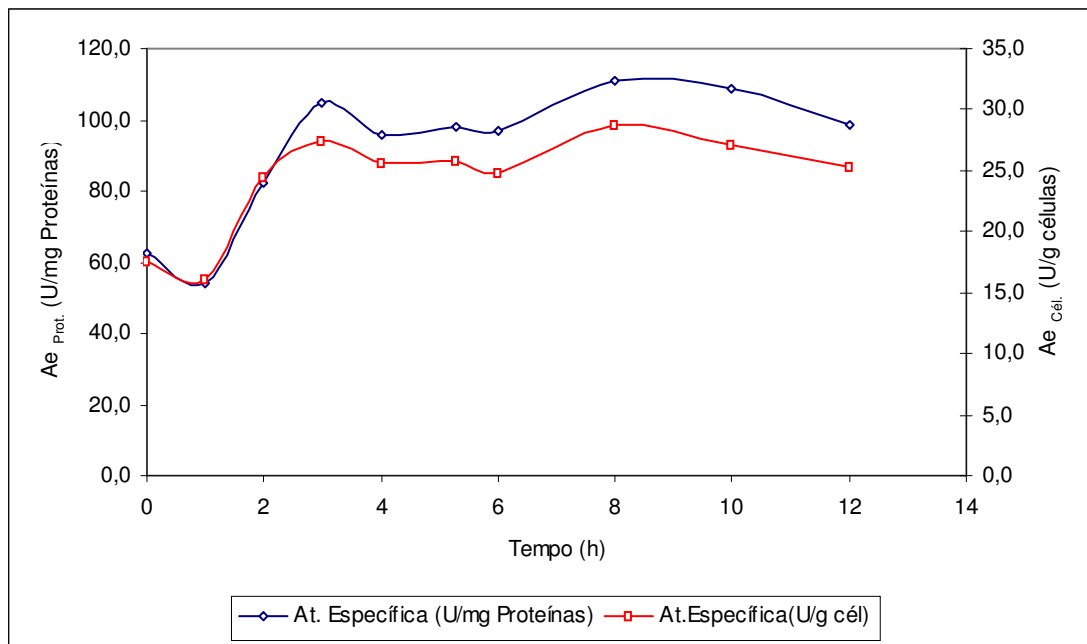


Figura 5.26: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-8

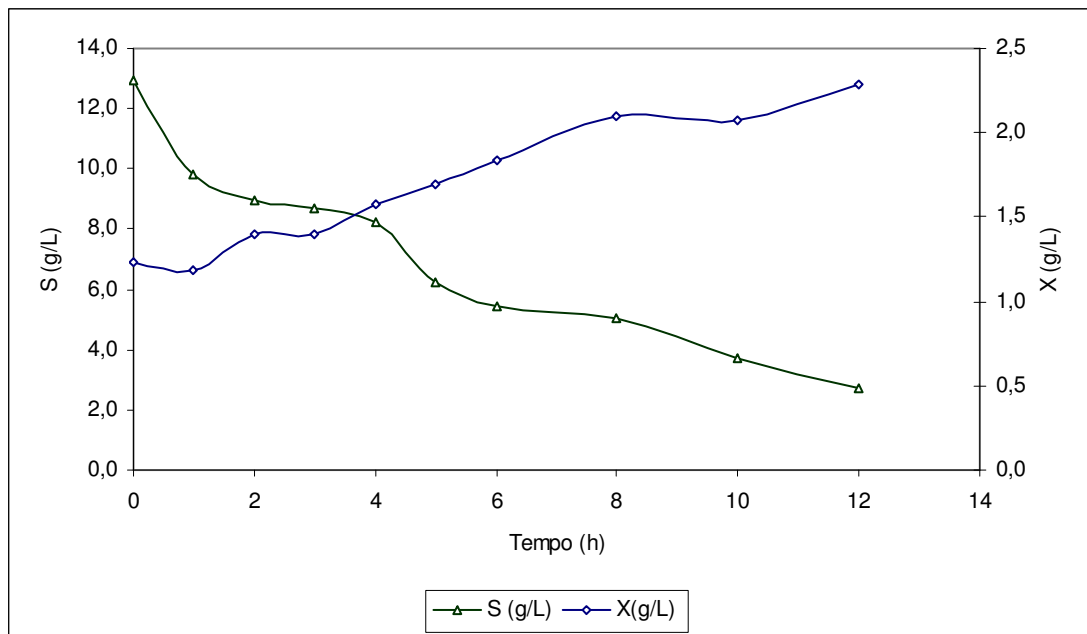


Figura 5.27: Variação da Concentração Celular ( $X$ ) e concentração de Glicose ( $S$ ) em função do tempo ( $t$ ) no Ensaio D-9



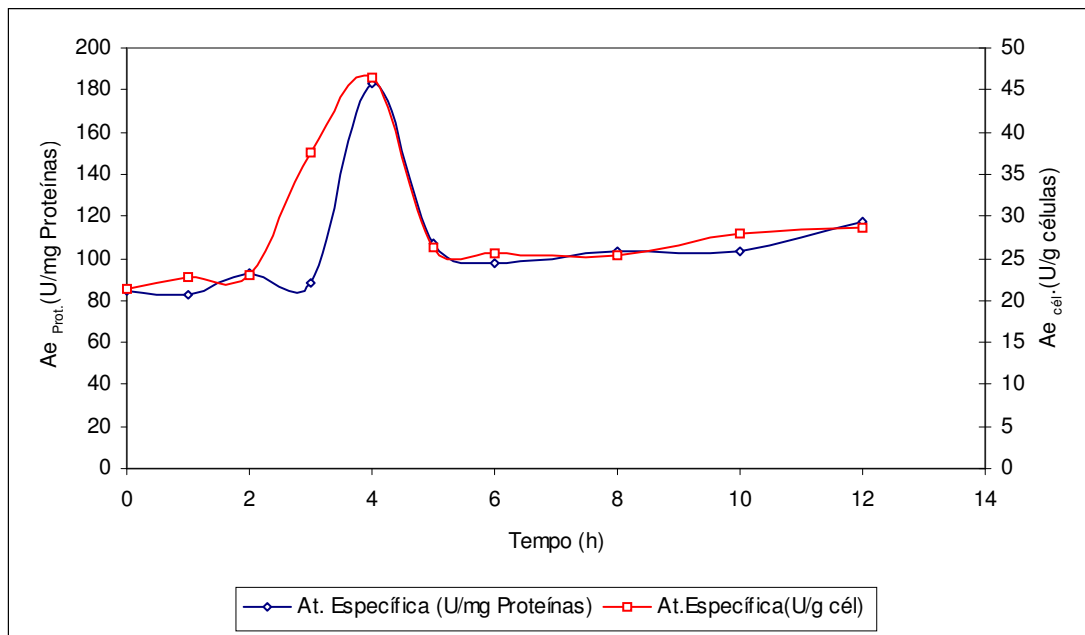


Figura 5.28: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-9

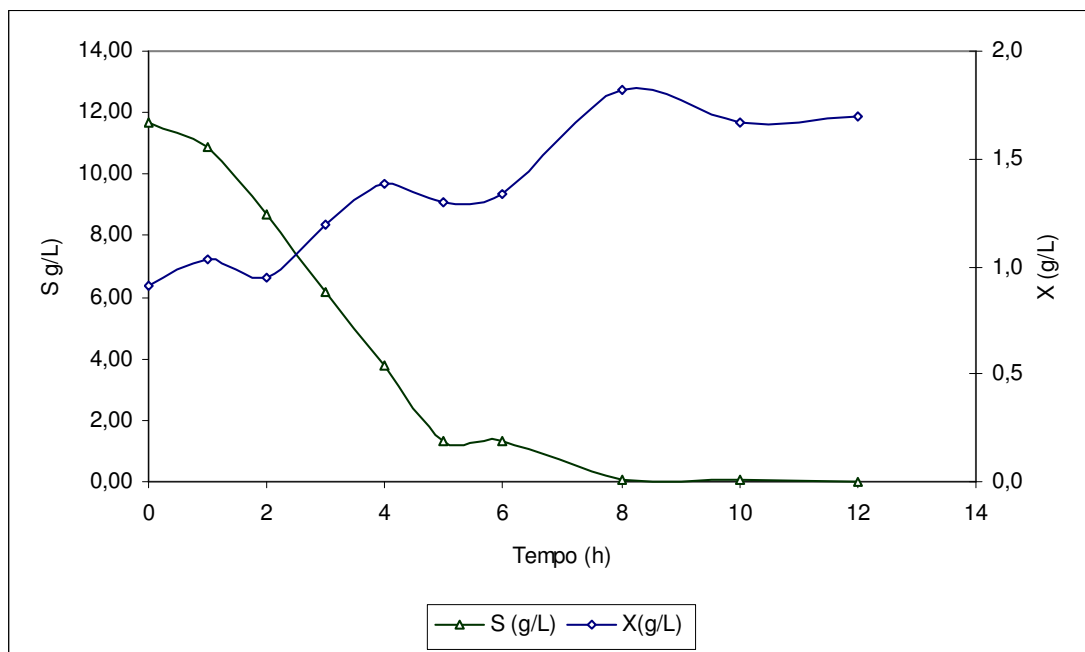


Figura 5.29: Variação da Concentração Celular (X) e concentração de em função do tempo (t) no Ensaio D-13

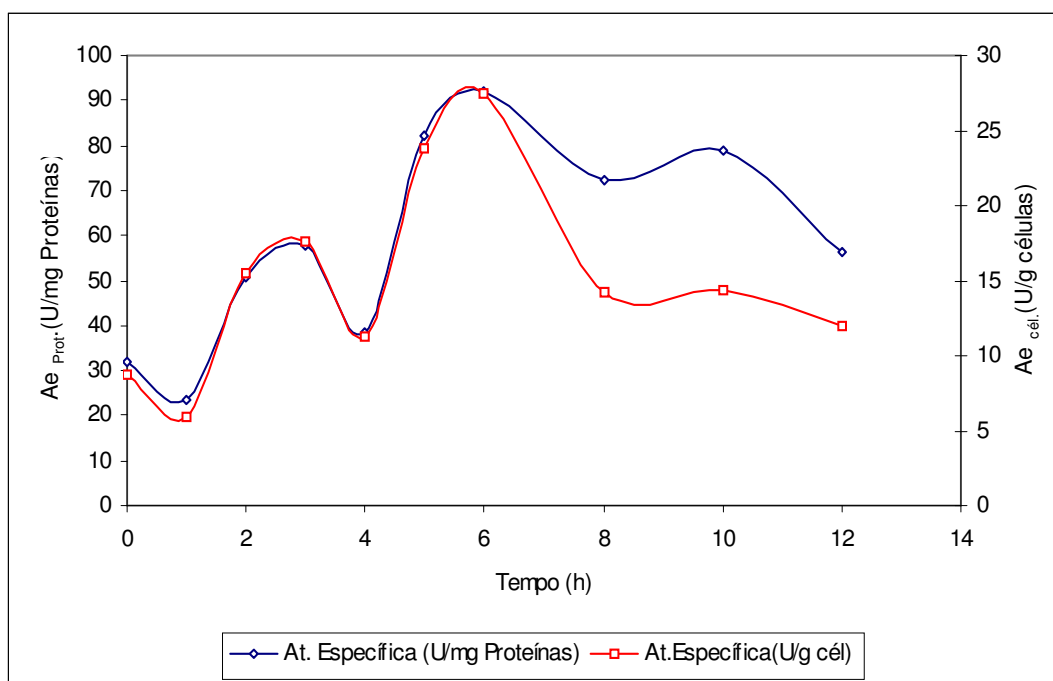


Figura 5.30: Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e da Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) no Ensaio D-13

Este dado indica que, sob pH 4,6, elevada aeração (D-8, gráficos 5.25 e 5.26) ocasionaria efeito de hiperoxia e, conseqüentemente, distúrbios no metabolismo celular. Uma justificativa para este fato seria que, em pH 4,6, seria mais fácil uma ligação entre moléculas de oxigênio formando o radical livre  $O_3^-$ , que seria prejudicial à célula. Para o pH 4,6, a afirmação feita por SILVA *et al.* (2001) de que a concentração de ATP em cultivos utilizando condições de aeração ( $K_{La}$ ) elevadas pode ser fator inibitório para a biossíntese da enzima de interesse pode ser uma justificativa para o resultado obtido, onde a maior produtividade foi alcançada em aeração moderada (1.7 vvm, D-7) conforme podemos observar pela tabela A4.1 e A4.2 do APÊNDICE IV. A diferença entre as melhores condições de aeração para cada valor de pH utilizado indica que o pH influencia no transporte de oxigênio para a célula e, conseqüentemente, na geração de ATP.

A formação deste radical seria dificultada quando em pH 5,7, tornando possível a utilização de maiores níveis de oxigênio dissolvido no meio.

Ainda para os ensaios em pH 4,6, ao analisarem-se os resultados apresentados nas tabelas A4.1, A4.2. e 5.1, verificou-se que a produtividade em G6PDH ( $Pr_{G6PDH}$ ) foi maior no ensaio em ambiente microaerado (D-13) do que nos ensaios com baixa aeração (D-9) e elevada aeração (D-8), só sendo menor que a produtividade obtida no ensaio com aeração moderada (D-7). Isto ocorreu, provavelmente, porque ao se levar em conta como final de cultivo o ponto onde se obteve a máxima atividade enzimática, no ensaio microaerado, isto veio a ocorrer quando o microrganismo estava com seu metabolismo sofrendo uma regulação promovida pelo chamado *Efeito Pasteur*, ou seja, mesmo diante de limitada disponibilidade de oxigênio, em um certo intervalo do cultivo, a afinidade do microrganismo foi maior para o desvio ao metabolismo respiratório do que para o metabolismo fermentativo, o que poderia disponibilizar um maior nível de ATP para a biossíntese de G6PDH durante o intervalo em que este efeito esteve presente.

Analisando-se as curvas de Variação da Concentração Celular ( $X$ ) e concentração de Glicose ( $S$ ) em função do tempo ( $t$ ) e de Variação da Atividade Específica Celular ( $Ae_{cel}$ ) e Atividade Específica Protéica ( $Ae_{Prot}$ ) em função do tempo apresentadas para todos os ensaios descontínuos, concluiu-se que as condições de cultivo e a composição de meio utilizados constituíram-se em parâmetros fundamentais a serem otimizados, pois, interfere no crescimento celular e da produção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.

Dependendo da condição de cultivo utilizada, ainda houve crescimento celular e biossíntese de G6PDH mesmo após o consumo quase que total de glicose. Esta situação pode ser visualizada no ensaio D-6, onde ocorreu crescimento celular na ordem de 0,5g/L entre as quatro horas finais de ensaio diante de um consumo de glicose de 0,01g/L. No ensaio D-7, o crescimento foi de 0,6g/L nas duas horas finais de cultivo diante de um consumo de glicose de 0,06g/L..

Ainda segundo SILVA *et al.* (2002), por ser a G6PDH uma enzima constitutiva, sua produção por um microrganismo está ligada à quantidade de biomassa obtida através do processo fermentativo.

Ao analisarmos todos os ensaios descontínuos, em pH 5,7, onde a variável estudada foi a aeração, verificamos que a concentração de glicose atingiu valores abaixo de 1g/L após 6h de cultivo, quando utilizando aeração de 1,7vvm (Tabela A3.5) e de 8h quando utilizando 2,2vvm (Tabela A3.6). Verificou-se que quando a aeração foi reduzida a 0,8vvm, ao final do cultivo ainda existia mais de 1g/L (Tabela A3.11). Em ensaios em ambiente microaerado, ou seja, sem aeração, a concentração de glicose ficou abaixo de 1g/L após 6h de cultivo (Tabela A3.12). As referidas tabelas encontram-se no APÊNDICE III.

Este resultado indica que o consumo de glicose, produção de G6PDH e produção de biomassa são eventos acoplados e fortemente dependentes da aeração e agitação do meio. O consumo maior de glicose no ensaio em ambiente microaerado pode ter sido influenciado pelo *Efeito Pasteur* surgido no final do cultivo e que pode ter acelerado o consumo da glicose presente no meio.

Para os ensaios descontínuos em pH 4,6, onde a variável estudada foi a aeração, verificou-se que utilizando aeração de 1,7vvm a concentração de glicose atingiu níveis abaixo de 1g/L após 4h de cultivo (Tabela A3.7). O mesmo resultado não foi verificado para aeração de 2,2vvm, onde a concentração de glicose permaneceu acima de 2g/L até o final de cultivo (Tabela A3.8).

Nos ensaios descontínuos utilizando aeração 0,8vvm, a concentração de glicose atingiu níveis abaixo de 1g/L após 8h de cultivo (Tabela A3.9) e após 6h de cultivo para o ensaio em ambiente microaerado (Tabela A3.13). Como justificativa para o resultado obtido em aeração de 2,2vvm temos uma situação de hiperoxia causada por um excesso de oxigênio dissolvido no meio e que inibem o metabolismo normal da levedura.

Segundo SILVA *et al.* (2002), a formação de G6PDH não varia de forma significativa para valores de  $K_L a$  maiores que  $60h^{-1}$  pelo fato desta enzima

ser mais influenciada pela razão  $\text{NADP}^+:\text{NADPH}$  no citoplasma do que pela razão  $\text{ADP}:\text{ATP}$ .

#### **5.1.5. Análise dos dados de crescimento celular nos ensaios descontínuos:**

A razão  $\text{NADP}^+:\text{NADPH}$  depende mais do metabolismo redutível do microrganismo. Segundo POSTMA *et al.* (1988), a concentração de  $\text{NADP}^+$  cai linearmente com o aumento das taxas de diluição (D) a ponto de a enzima não ser mais detectada a partir de taxas de diluição da ordem de  $0,44 \text{ h}^{-1}$ . Sendo a G6PDH, a primeira enzima da via metabólica das Pentoses e a enzima chave para a formação de NADPH nas leveduras, também foi observado uma queda acentuada em sua produção quando submetido a elevadas taxas de diluição. Altas taxas de diluição geram o *Efeito Crabtree*, pois, o elevado crescimento celular faz com que a concentração da fonte de carbono no meio seja limitante (baixas concentrações).

Concluiu-se que em situações onde este efeito regulatório do metabolismo esteja presente, nós teremos uma queda na biossíntese de G6PDH. O *Efeito Crabtree* foi observado no ensaio descontínuo utilizando 20g/L de Glicose como fonte de carbono (D-1) e quando este efeito regulatório foi eliminado do cultivo, ao reduzirmos a concentração de Glicose para 10g/L mantendo os demais parâmetros (D-5), observamos melhor crescimento celular, visualizado pela redução do tempo de geração de 17,6h para 3,5h, conforme observado na Tabela A4.3 do APÊNDICE IV.

Através dos dados apresentados na tabela A4.3 do APÊNDICE IV, podemos concluir que os parâmetros que influenciaram mais no crescimento celular foram a relação carbono – nitrogênio (concentração de íons amônio), concentração de glicose e concentração de micronutrientes, como podemos observar nos ensaios D-1, D-2, D-3 e D-4, onde os cultivos apresentaram as menores taxas de crescimento celular em porcentagem, e conseqüentemente, os menores valores de tempo de geração ( $T_g$ ) e  $\mu_{\text{max}}$ .

A partir do Ensaio D-5 até o Ensaio D-13, os parâmetros avaliados foram o pH e a aeração e através da Tabela A4.2 do APÊNDICE IV, podemos observar que existe uma interação entre os dois parâmetros. Uma das justificativas para essa interação está que o pH interfere na estrutura da membrana celular, de forma que facilite ou dificulte a passagem de nutrientes e o fluxo de prótons e elétrons.

#### ***5.1.6. Análise dos dados de consumo de substrato nos ensaios descontínuos:***

Através dos dados apresentados na Tabela A4.4, podemos observar que os ensaios onde os parâmetros avaliados foram as concentrações de componentes do meio (Glicose, Micronutrientes e Relação Carbono-Nitrogênio) apresentaram as menores taxas de consumo de substrato. A provável justificativa para esse fenômeno está na existência de efeitos de regulação do metabolismo do microrganismo e que surgem diante de condições com excesso ou limitação de substrato, excesso de íons amônio no meio ou limitação de aminoácidos essenciais não metabolizados pela levedura. As influências do pH e da aeração são decisivas, porém, para definir qual metabolismo será seguido preferencialmente pela levedura (Respiração ou Fermentação).

Em ensaios onde a concentração de oxigênio fornecida não é suficiente, ocorrerá um favorecimento do metabolismo fermentativo aeróbio em relação à respiração celular, com a formação de etanol, que será excretado no meio.

Segundo DE MORAIS (1984), o etanol inibe a permeabilidade da membrana celular a prótons, o que interfere na formação de ATP pela via oxidativa. Desta forma, o etanol interfere na formação e estabilidade da força motora de prótons, envolvida em diversos sistemas de transporte intramembranar. Portanto, nos ensaios com baixa aeração e microaeração, a produção de etanol poderá interferir no transporte de prótons, aminoácidos, íons amônio e glicose.

Os ensaios onde ocorreu crescimento celular mesmo diante de meio exaurido de glicose (período final de cultivo) foram os melhores resultados para cada pH estudado (5,7 e 4,6) indicando ser um comportamento normal do microrganismo diante de uma situação metabolicamente favorável.

Segundo SILVA *et al.* (2001) este fenômeno poderia ser compreendido caso se considerasse que após o consumo de glicose, outra substância se tornava o substrato para a levedura. Neste caso, o provável substrato natural para a levedura ,após a condição de meio exaurido de glicose, seria o etanol acumulado no meio durante o cultivo.

De acordo com ROSE & HARRISON (1989) e REHM & REED (1993), a produção de etanol é característica da *S.cerevisiae*, mesmo diante de aeração elevada, ou seja, o efeito Pasteur não ocorre constantemente nesta espécie de levedura. Porém, segundo PRONK *et al.* (1996) o Efeito Pasteur, ou seja, a supressão da fermentação alcoólica na presença de oxigênio pode ser observada em todas as leveduras facultativas que não exibam o Efeito Crabtree. Em *S. cerevisiae*, o Efeito Pasteur só ocorre diante de baixos fluxos glicolíticos, ou seja, em uma situação de baixo crescimento celular.

Em alguns ensaios foi observado um aumento da atividade enzimática nas horas finais de cultivo (Tabelas A3.5 e A3.6) mesmo diante de meio já exaurido de Glicose.

Segundo JIN *et al.*, o metabolismo de etanol conjugado ao metabolismo de uma fonte de carbono fornecida em células geneticamente modificadas promoveria o aumento do fluxo para Acetyl-CoA e para o ciclo de Krebs. Os dois metabolismos conjugados também aumentariam o fluxo direcionado à síntese de vários precursores (como aminoácidos e ácidos nucleicos) necessários para a produção da proteína heteróloga.

Portanto, o aumento da atividade da G6PDH observado no final de alguns cultivos poderia ser atribuído à combinação de metabolismos da glicose e do etanol, tendo este último se acumulado no meio durante o cultivo.

Ao analisarmos a Tabela A3.7, verificamos que a concentração de glicose no meio estava abaixo de 0,14g/L e conforme apresentado na tabela A6.7, a partir de 8h de ensaio a velocidade específica de consumo de substrato foi zero, enquanto que a velocidade específica de crescimento celular foi mantida, o que sugere uma mudança na via metabólica utilizada, que estaria deixando de metabolizar a Glicose, já limitante no cultivo, e passaria a priorizar a utilização de outro composto como substrato, provavelmente, o etanol gerado.

#### ***5.1.7. Análise dos dados de produção de G6PDH nos ensaios descontínuos:***

Através dos dados apresentados nas Tabelas A4.5 e A4.6 do APÊNDICE IV podemos concluir que todos os parâmetros avaliados interferem na biossíntese da G6PDH.

Ao analisarmos todos os ensaios em conjunto, podemos observar uma tendência a crescimento na atividade específica da G6PDH, o que reflete uma maior produção da mesma, em condições onde a concentração de glicose esteja abaixo de 5g/L, provavelmente por nesta situação, termos um desvio metabólico mais favorável à via de respiração celular, o que determinaria uma maior disponibilidade de ATP para a biossíntese.

#### ***5.1.8. Análise dos dados de consumo de ácido e base durante o controle de pH nos ensaios descontínuos:***

Através dos dados apresentados pela Tabela A4.7 verificamos que o consumo de base foi sempre maior que o consumo de ácido nos ensaios em pH 5,7.

Segundo DE MORAIS (1984), a extrusão de íons  $H^+$  durante o cultivo podem causar a acidificação do meio, o que justificaria a necessidade de maior consumo de base para que o pH se mantenha o mesmo. A extrusão de íons  $H^+$  é importante, pois, durante a respiração celular, o ATP só será formado diante da existência de um gradiente de prótons entre o meio



extracelular e o ambiente intracelular. Este gradiente, é que permitirá a entrada destes cátions  $H^+$  através da enzima ATPase, que por sua vez, catalisa a reação de formação do ATP.

Analisando os ensaios em pH 5,7 verificamos que os maiores consumos de base ocorreram nos cultivos com aeração moderada (D-5) e com baixa aeração (D-11), porém, ao relacionarmos a relação consumo de base / consumo de ácido, verificamos que a maior acidificação ocorreu no ensaio em aeração moderada, seguida pelo ensaio em elevada aeração (D-6). Nota-se que o efluxo de prótons é bem menor em cultivos microaerados, pois, apenas 27% da base foi consumida neste ensaio, o que se justifica pelo fato de neste ensaio estarmos com um favorecimento da via fermentativa do metabolismo celular, que utiliza o próprio etanol como acceptor final de elétrons e deixa de utilizar a CTE para este fim, pois o oxigênio disponível é insuficiente e não poderá ser utilizado como acceptor final.

#### ***5.1.9. Perfis das Curvas de Velocidades Específicas de Crescimento Celular, Consumo de Substrato e Produção de G6PDH.***

Os perfis obtidos para as curvas de  $\mu_s$  Vs. T ,  $\mu$  Vs. T e  $\mu_P$  Vs. T serão apresentados a seguir:

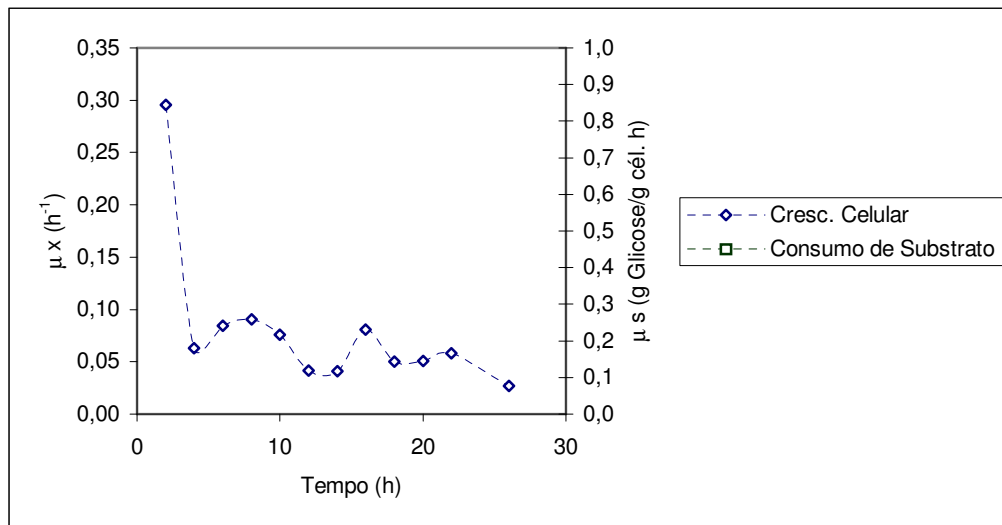


Figura 5.31: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Consumo de Substrato ( $\mu_s$ ) no tempo para o Ensaio D-1

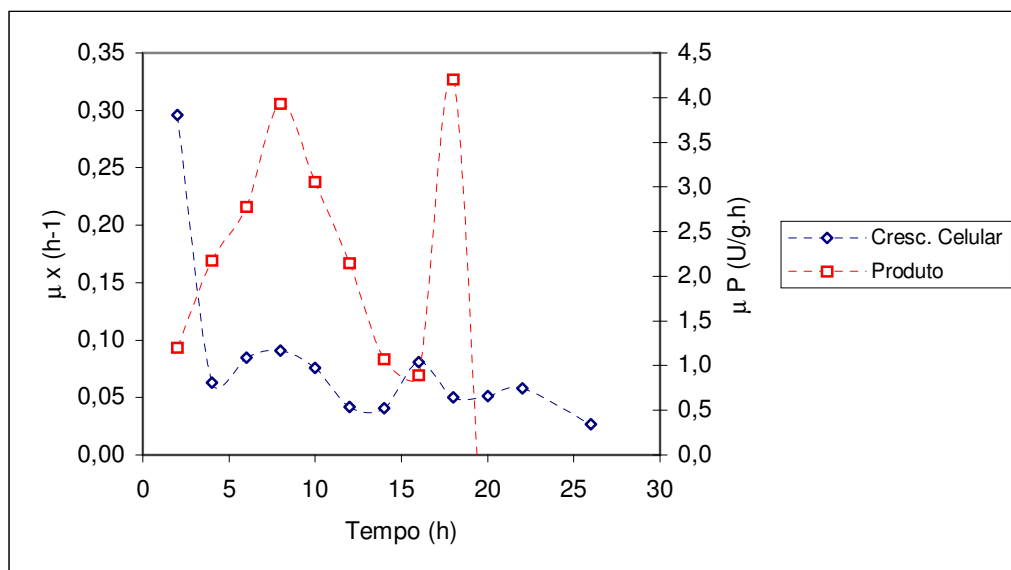


Figura 5.32: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Produção de G6PDH ( $\mu_P$ ) no tempo para o Ensaio D-1

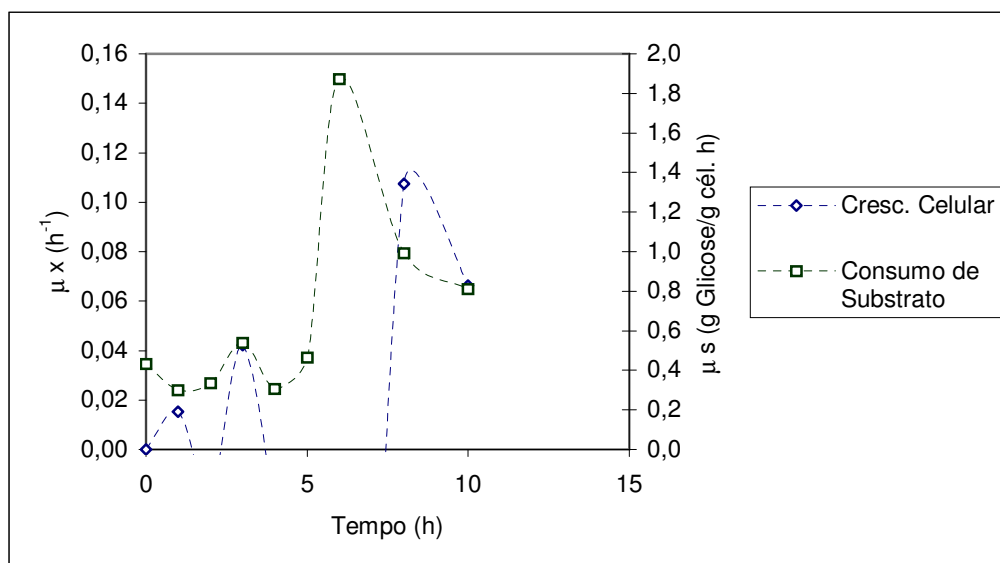


Figura 5.33: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Consumo de Substrato ( $\mu_s$ ) no tempo para o Ensaio D-2

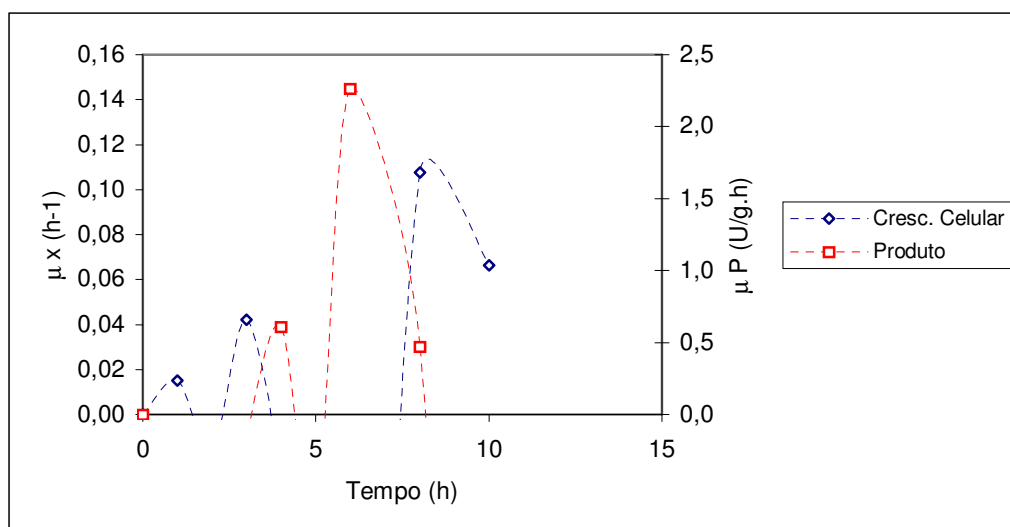


Figura 5.34: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Produção de G6PDH ( $\mu_P$ ) no tempo para o Ensaio D-2

Através dos resultados apresentados para velocidades específicas no ensaio D-2, verificamos desacoplamento entre crescimento celular e consumo de glicose (Gráfico 5.33) e entre crescimento celular e biossíntese de G6PDH (Gráfico 5.34), mas os perfis das curvas indicam acoplamento entre consumo de glicose e biossíntese de G6PDH.

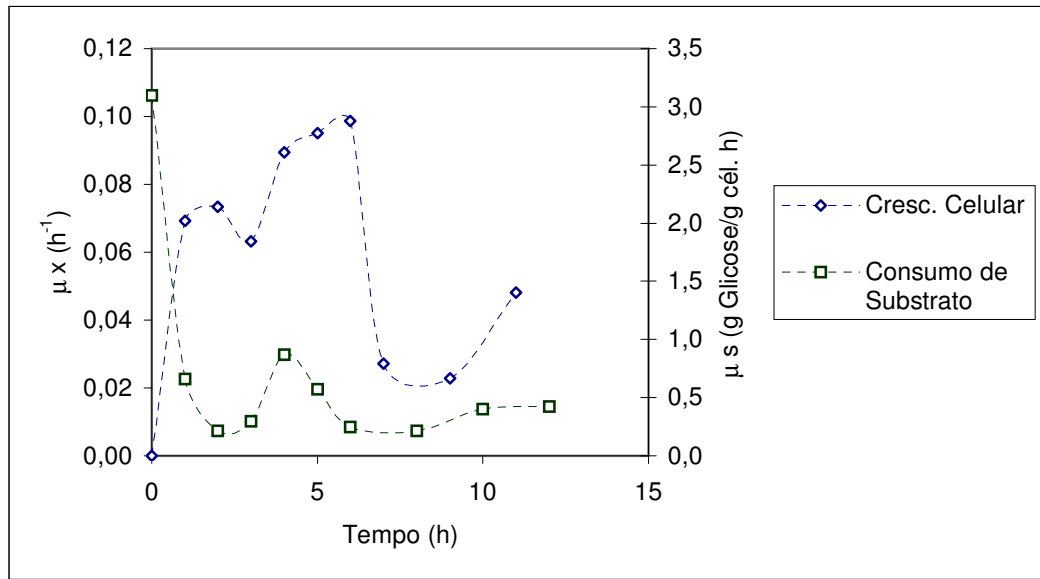


Figura 5.35: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Consumo de Substrato ( $\mu_s$ ) no tempo para o Ensaio D-3

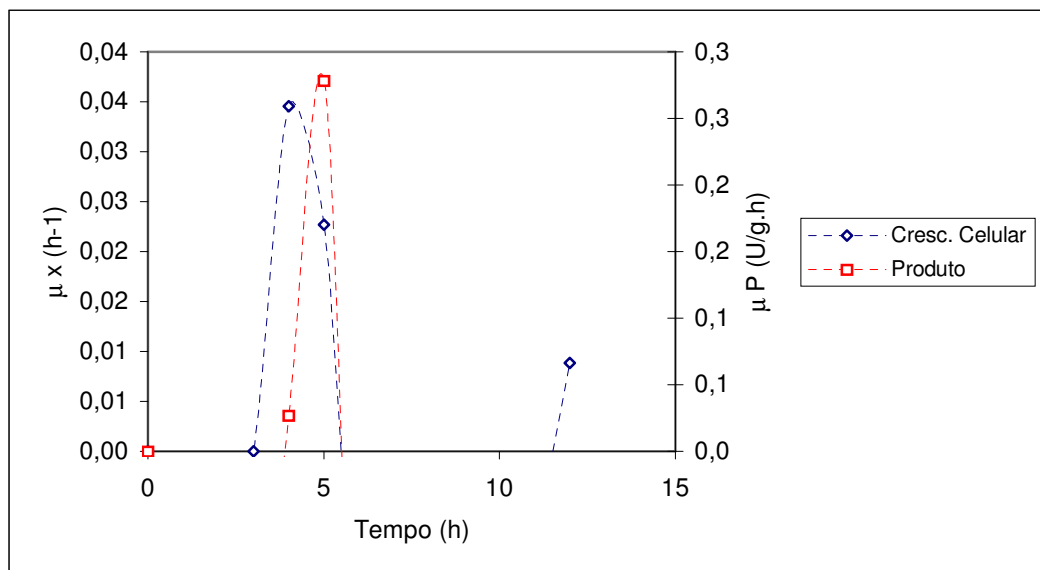


Figura 5.36: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Produção de G6PDH ( $\mu_P$ ) no tempo para o Ensaio D-3

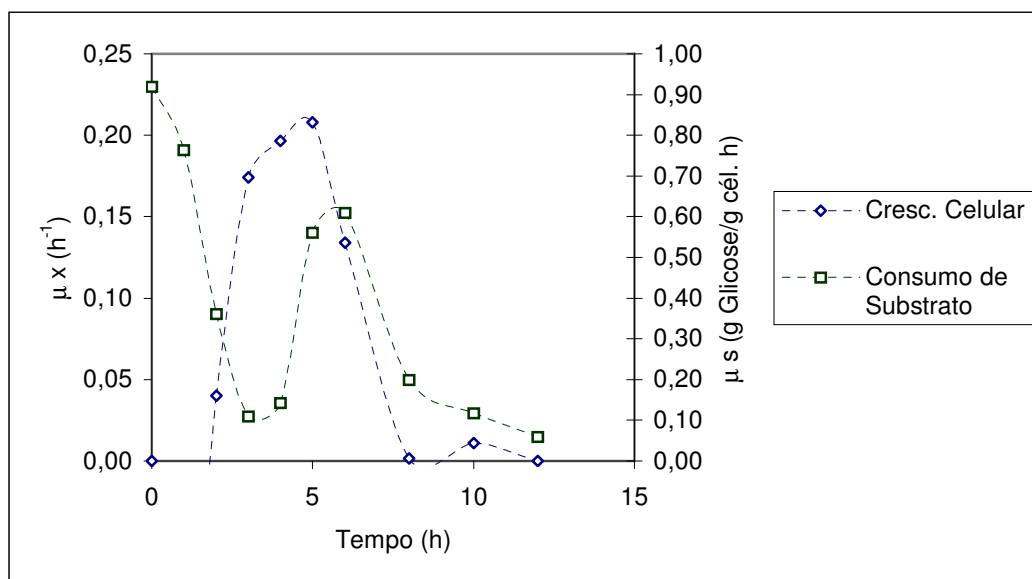


Figura 5.37: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Consumo de Substrato ( $\mu_s$ ) no tempo para o Ensaio D-4

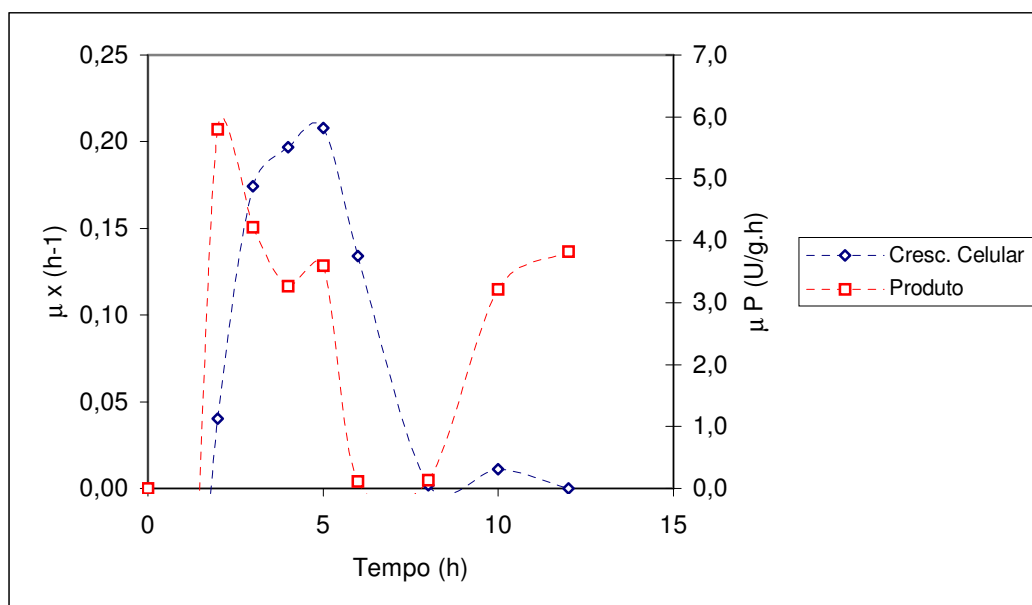


Figura 5.38: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Produção de G6PDH ( $\mu_P$ ) no tempo para o Ensaio D-4

Através dos perfis dos gráficos 5.8 e 5.9, que mostram as curvas de velocidade específica de crescimento, consumo de substrato e biossíntese de G6PDH durante o ensaio D-4, observou-se um acoplamento entre

crescimento celular e consumo de substrato e um desacoplamento entre crescimento celular e biossíntese de G6PDH e consumo de substrato e biossíntese de G6PDH.

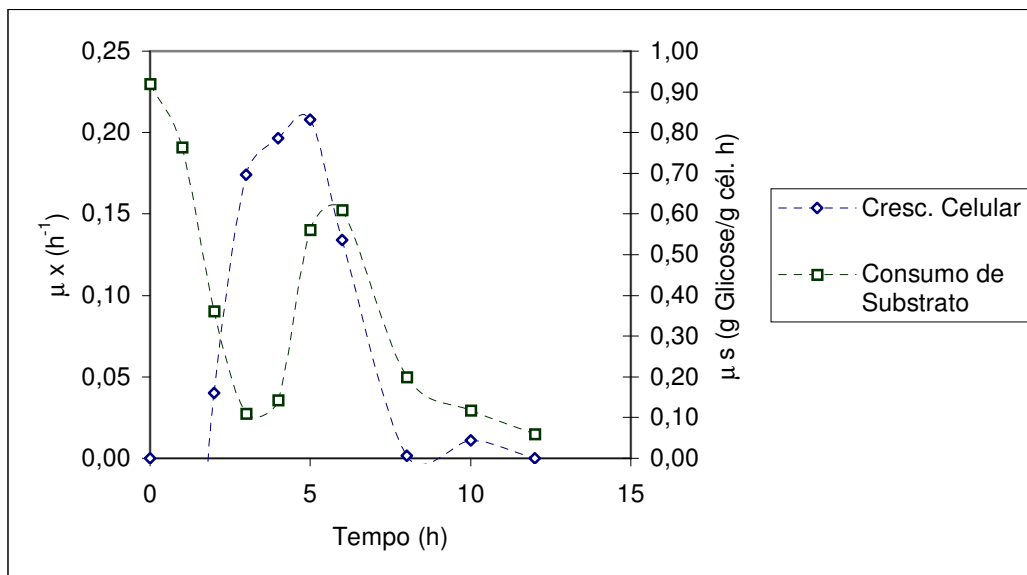


Figura 5.39: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Consumo de Substrato ( $\mu_s$ ) no tempo para o Ensaio D-5

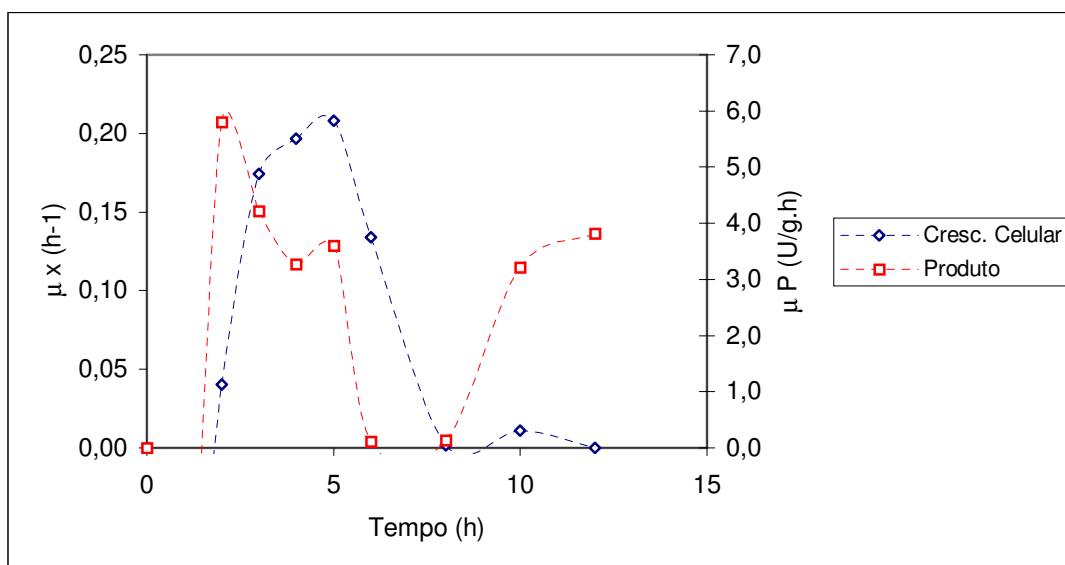


Figura 5.40: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Produção de G6PDH ( $\mu_P$ ) no tempo para o Ensaio D-5

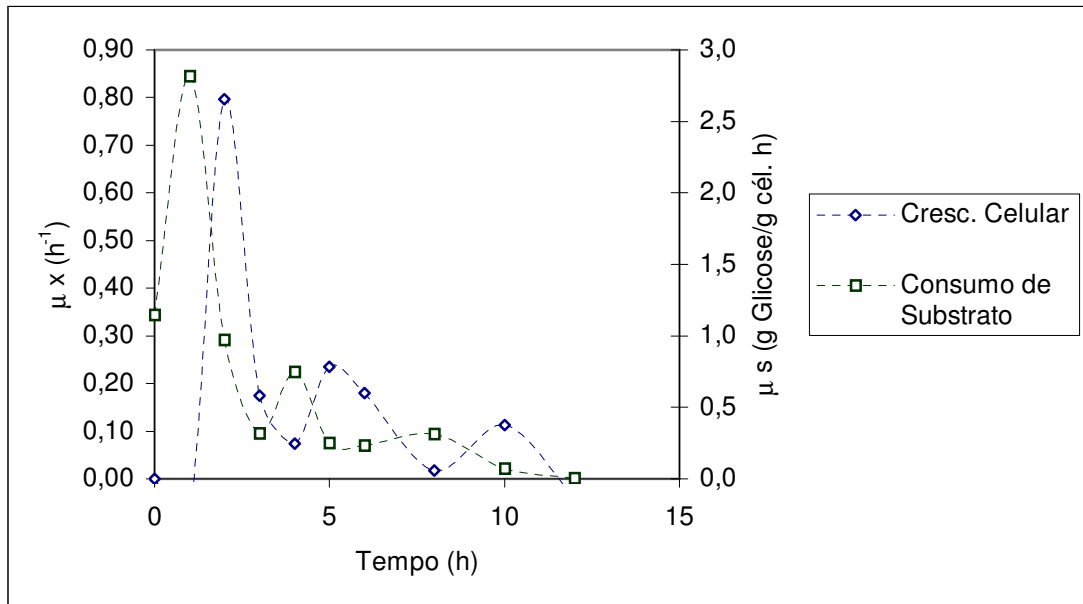


Figura 5.41: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Consumo de Substrato ( $\mu_s$ ) no tempo para o Ensaio D-6

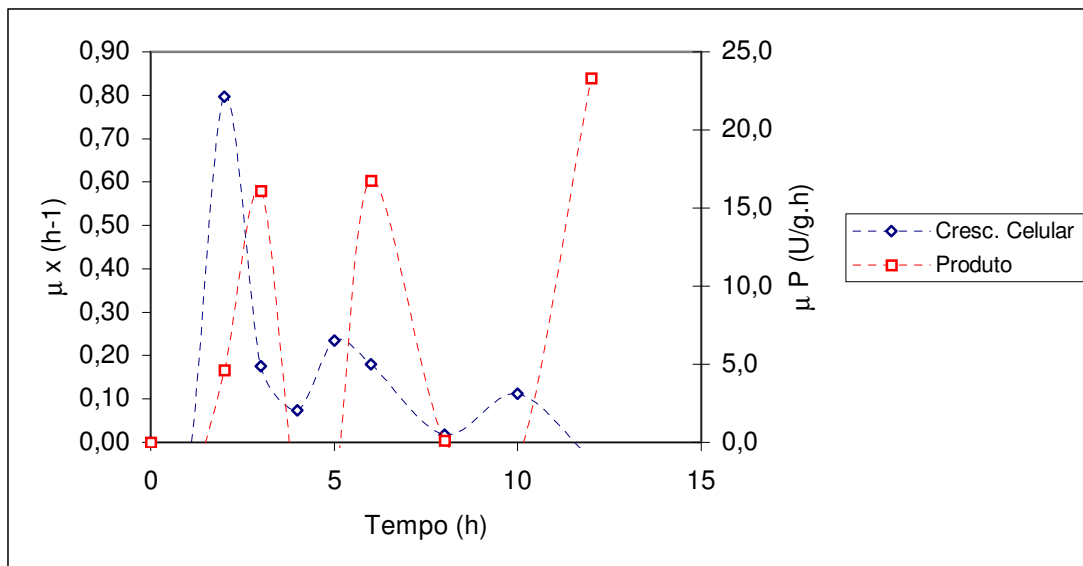


Figura 5.42: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Produção de G6PDH ( $\mu_P$ ) no tempo para o Ensaio D-6

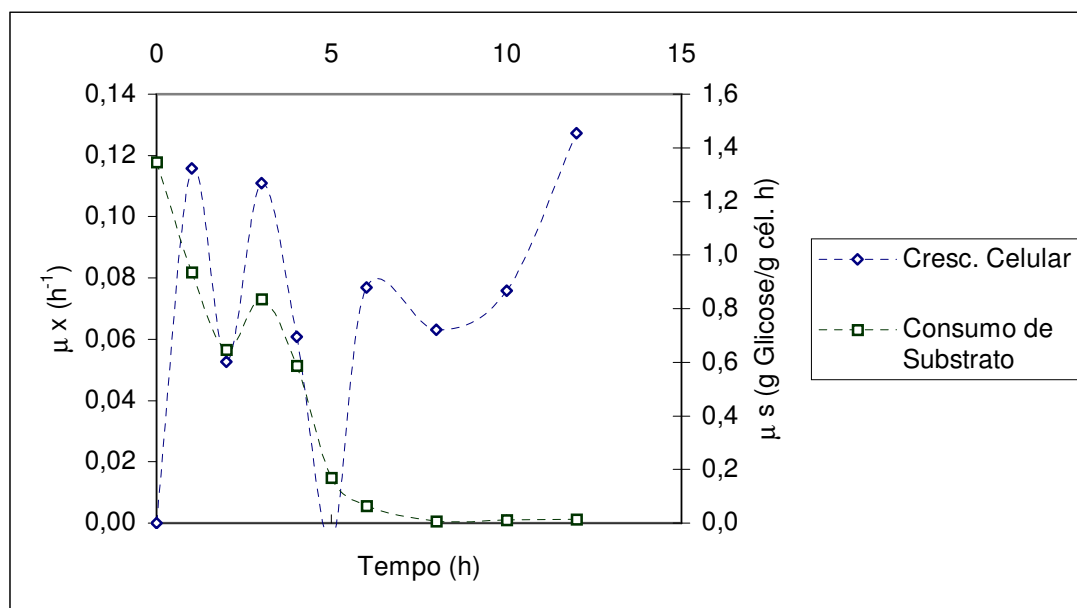


Figura 5.43: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu_x$ ) e de Consumo de Substrato ( $\mu_s$ ) no tempo para o Ensaio D-7

Analisando os gráficos de velocidade específica de crescimento celular, consumo de substrato e biossíntese de G6PDH, podemos concluir que para o pH 5,7, houve acoplamento entre crescimento celular e consumo de substrato e crescimento celular e biossíntese de G6PDH quando o microrganismo foi exposto a condições de oxigênio limitante (baixa aeração e ambiente microaerado). Houve desacoplamento entre consumo de substrato e biossíntese quando se utilizou ambiente de baixa aeração (0,8vvm, D-11). Com relação aos ensaios de aeração e pH, temos que para os ensaios onde se utilizou pH 5,7, no caso de aeração moderada (D-5), houve acoplamento entre crescimento celular e consumo de substrato (gráfico 5.10) e crescimento celular e biossíntese de G6PDH (gráfico 5.11), mas, houve desacoplamento entre consumo de substrato e biossíntese de G6PDH. Para o ensaio utilizando aeração elevada (melhor resultado – D-6), houve desacoplamento parcial entre crescimento celular e consumo de substrato (gráfico 5.12), crescimento celular e biossíntese de G6PDH (gráfico 5.13) e consumo de substrato e biossíntese de G6PDH, sugerindo que a melhor condição de cultivo é aquela onde se consegue acoplar,



mesmo que parcialmente, o consumo de substrato à biossíntese de G6PDH.

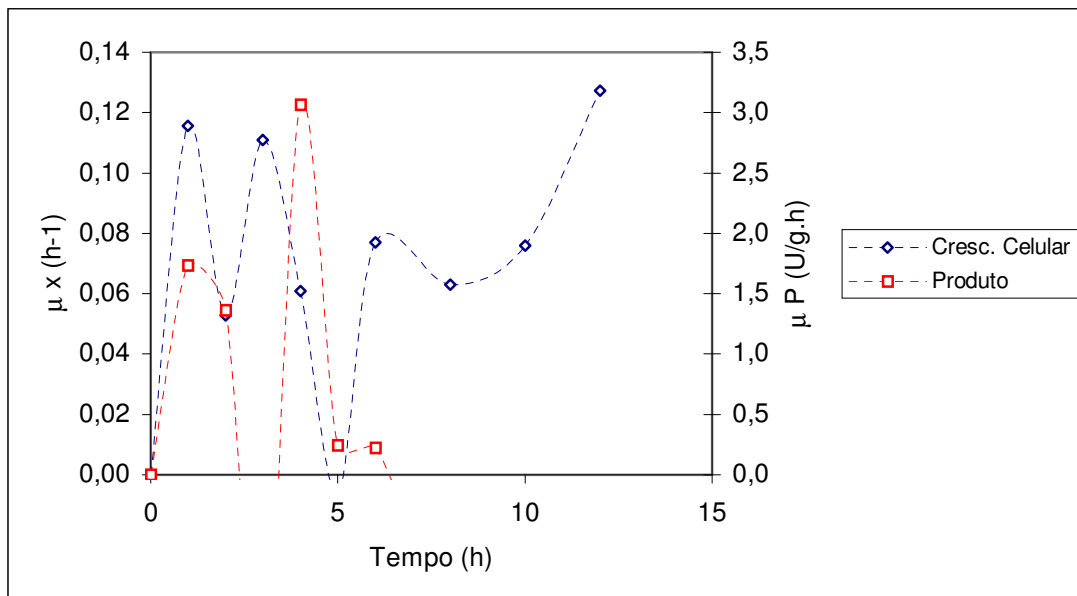


Figura 5.44: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Produção de G6PDH ( $\mu_P$ ) no tempo para o Ensaio D-7

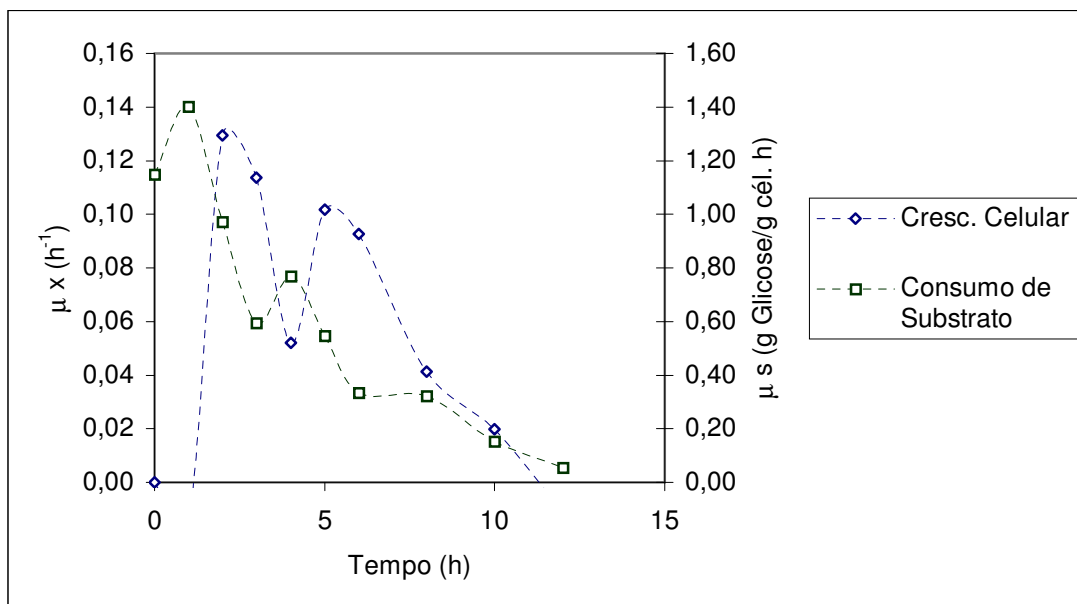


Figura 5.45: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Consumo de Substrato ( $\mu_s$ ) no tempo para o Ensaio D-8

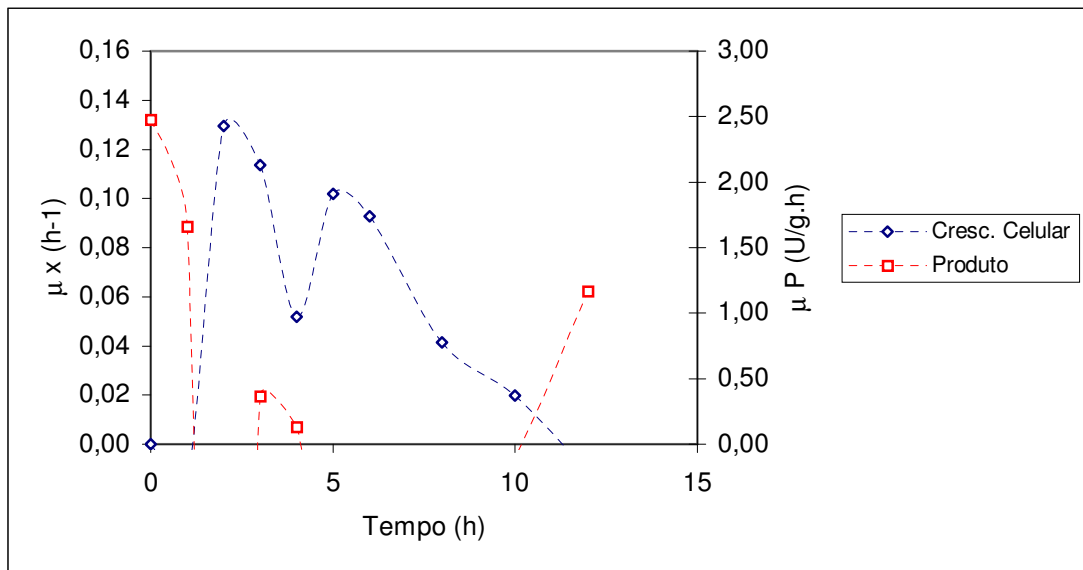


Figura 5.46: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Produção de G6PDH ( $\mu_P$ ) no tempo para o Ensaio D-8

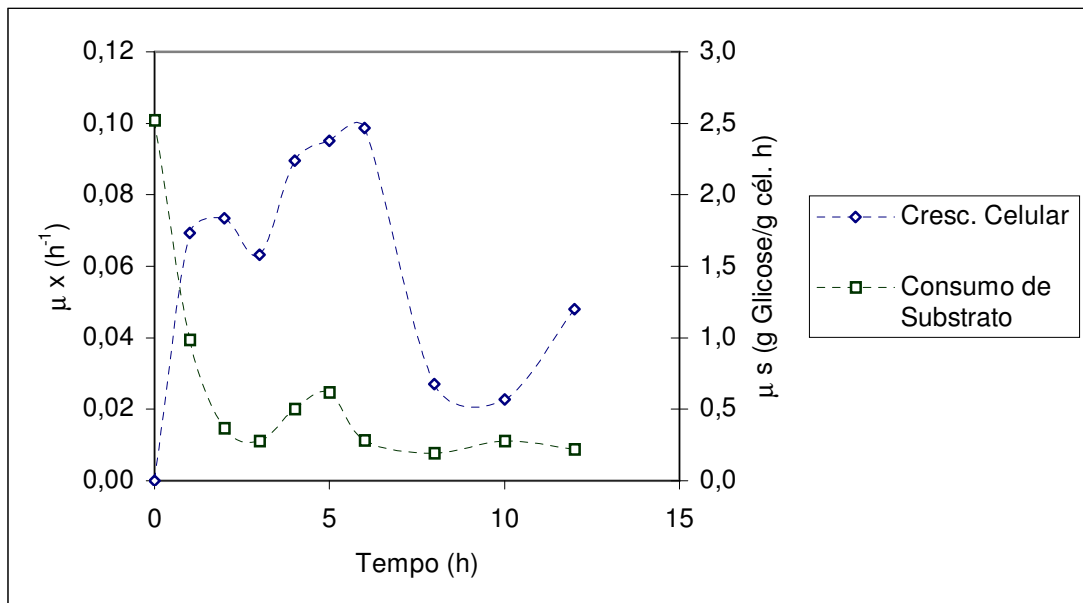


Figura 5.47: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Consumo de Substrato ( $\mu_s$ ) no tempo para o Ensaio D-9

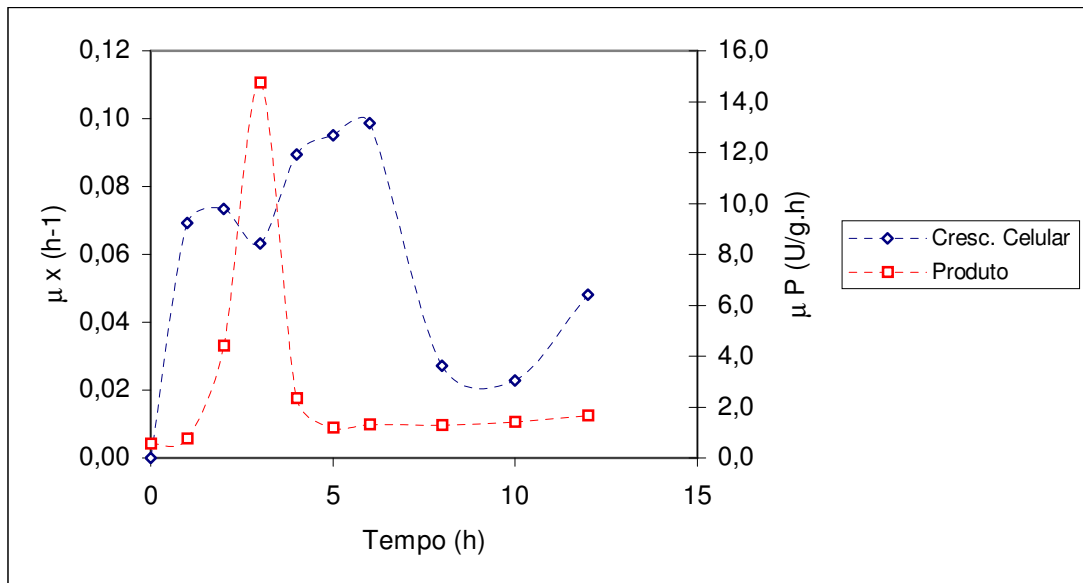


Figura 5.48: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Produção de G6PDH ( $\mu_P$ ) no tempo para o Ensaio D-9

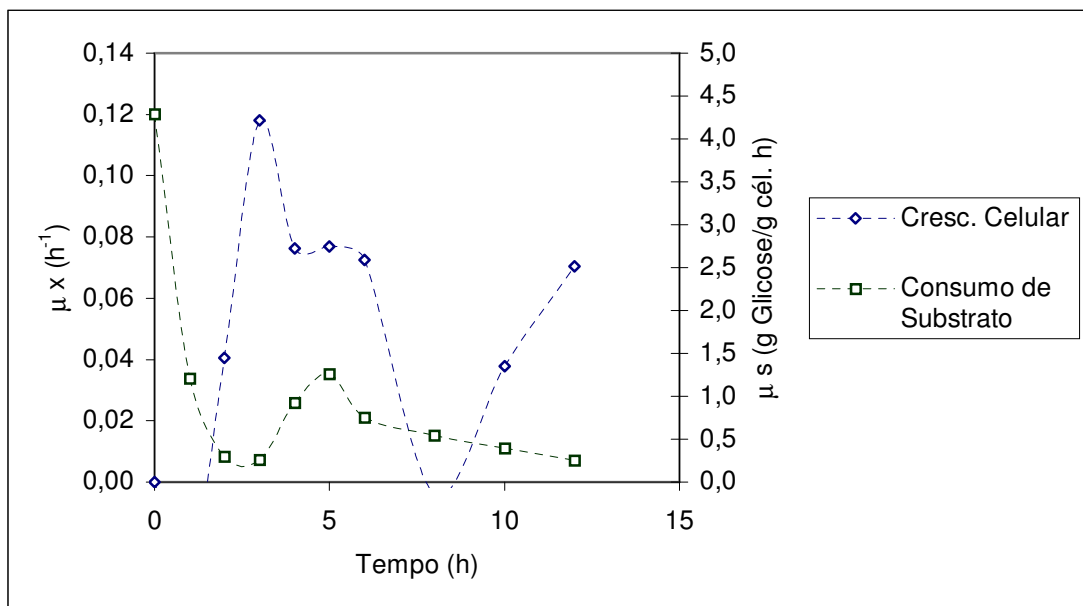


Figura 5.49: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Consumo de Substrato ( $\mu_s$ ) no tempo para o Ensaio D-10

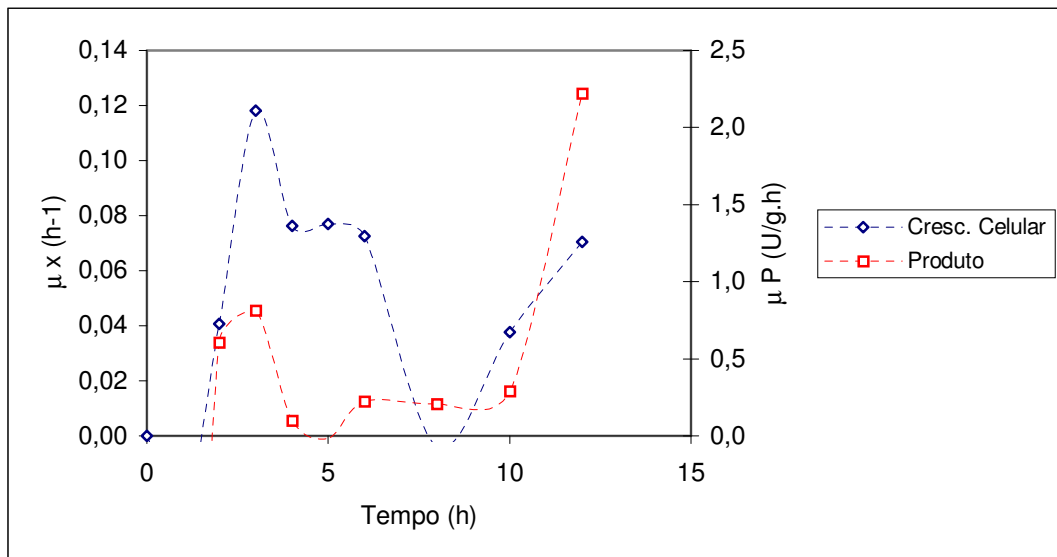


Figura 5.50: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Produção de G6PDH ( $\mu_P$ ) no tempo para o Ensaio D-10

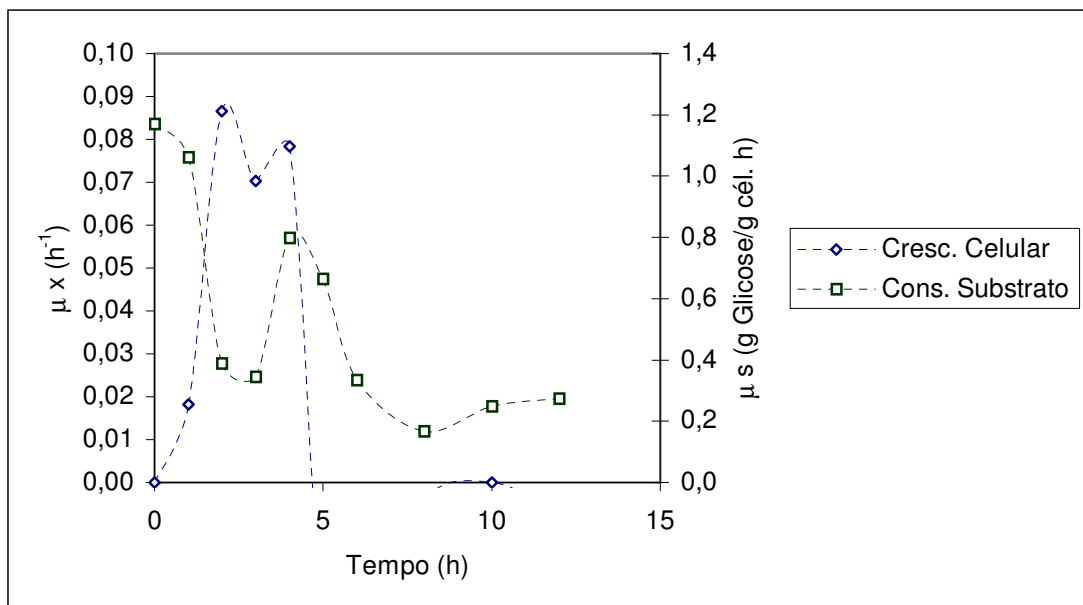


Figura 5.51: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Consumo de Substrato ( $\mu_s$ ) no tempo para o Ensaio D-11

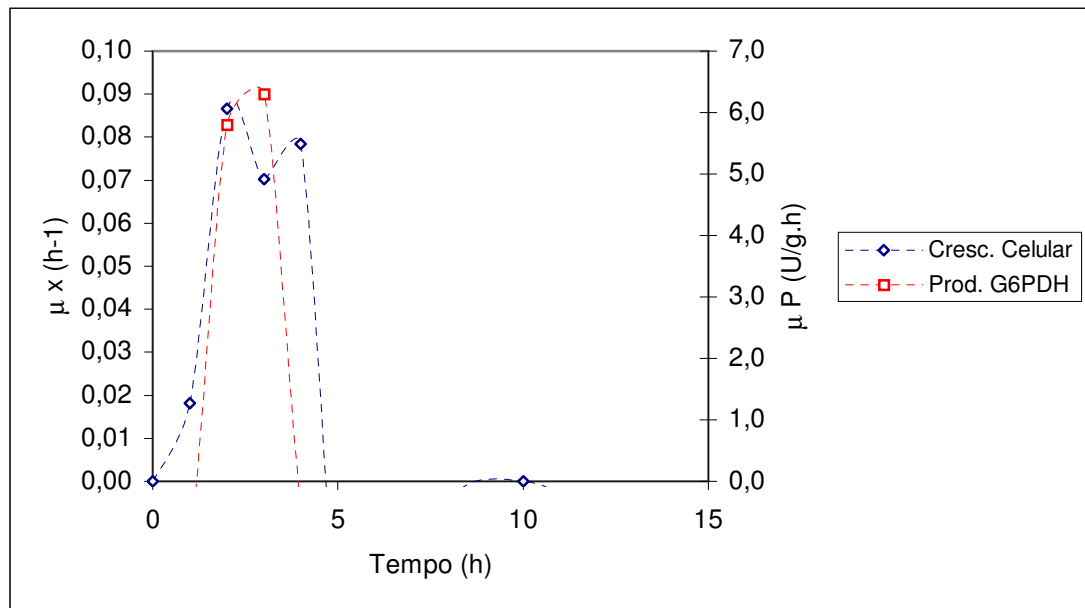


Figura 5.52: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Produção de G6PDH ( $\mu_P$ ) no tempo para o Ensaio D-11

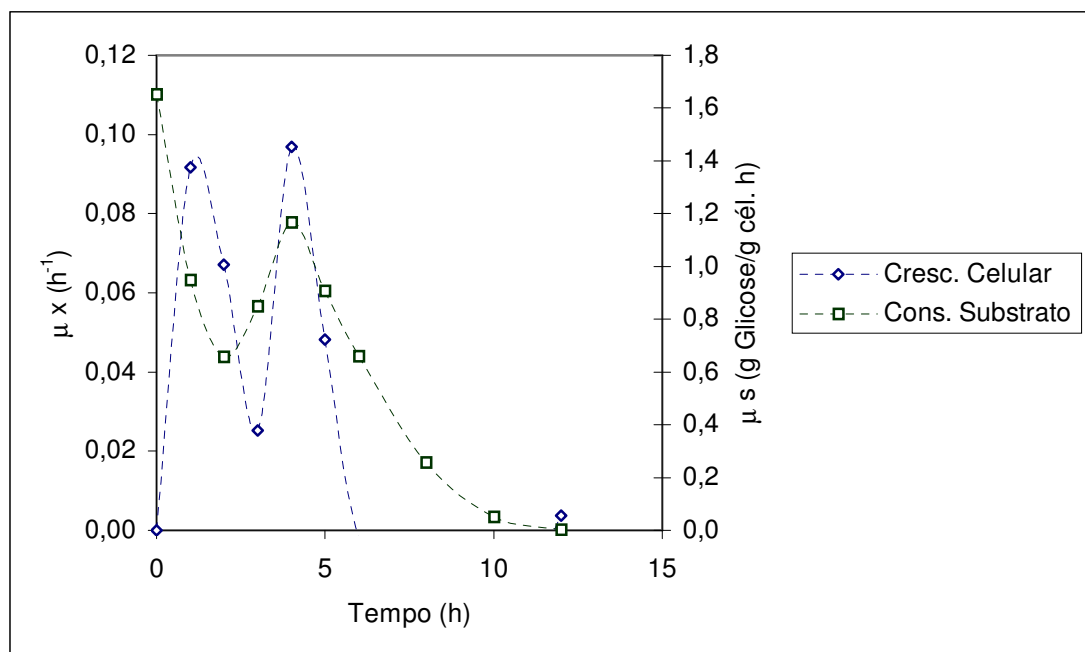


Figura 5.53: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Consumo de Substrato ( $\mu_s$ ) no tempo para o Ensaio D-12

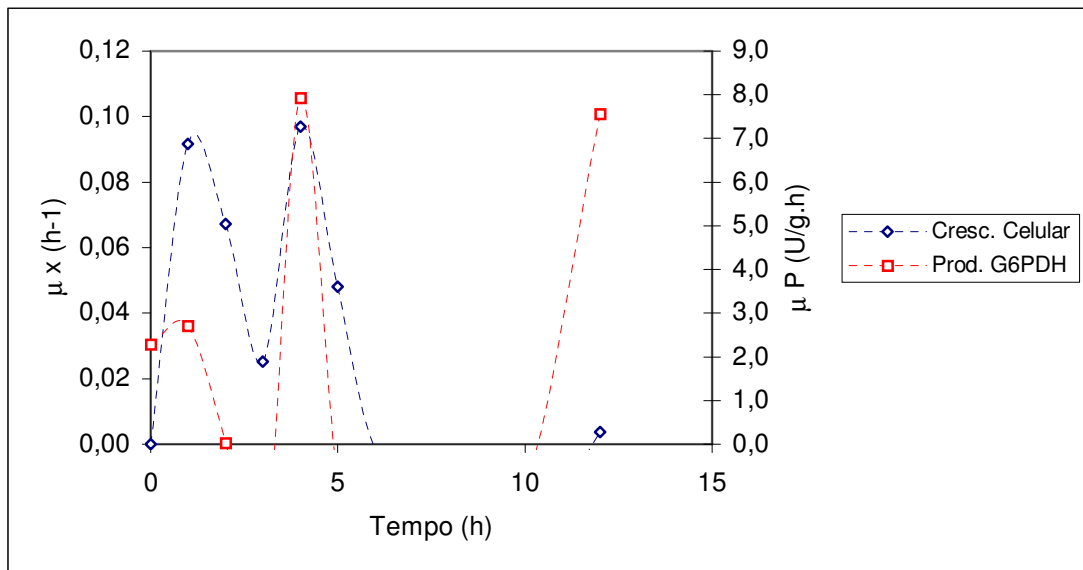


Figura 5.54: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Produção de G6PDH ( $\mu_P$ ) no tempo para o Ensaio D-12

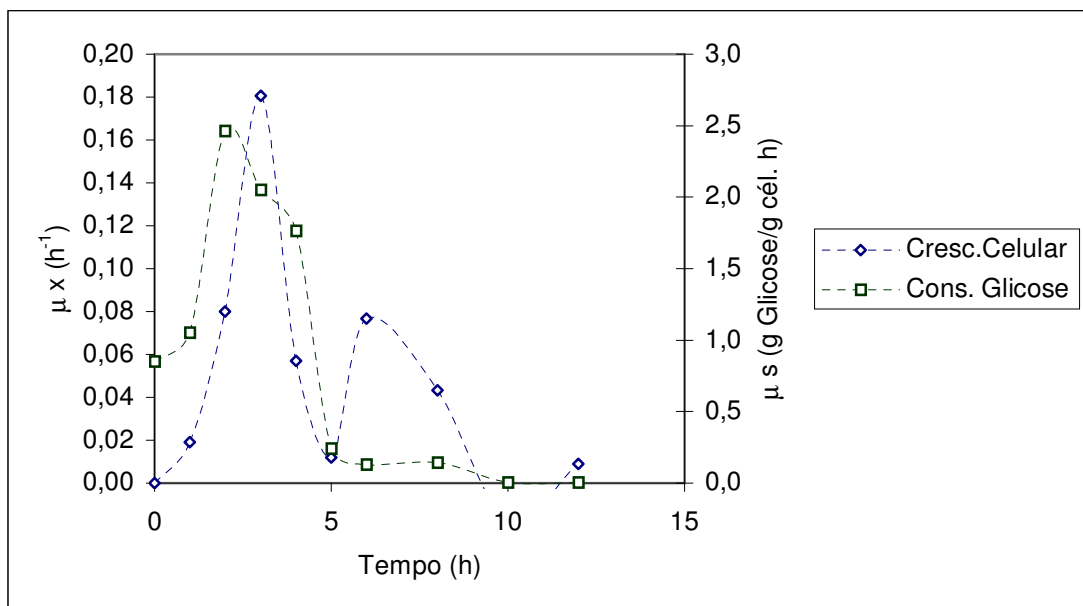


Figura 5.55: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Consumo de Substrato ( $\mu_s$ ) no tempo para o Ensaio D-13

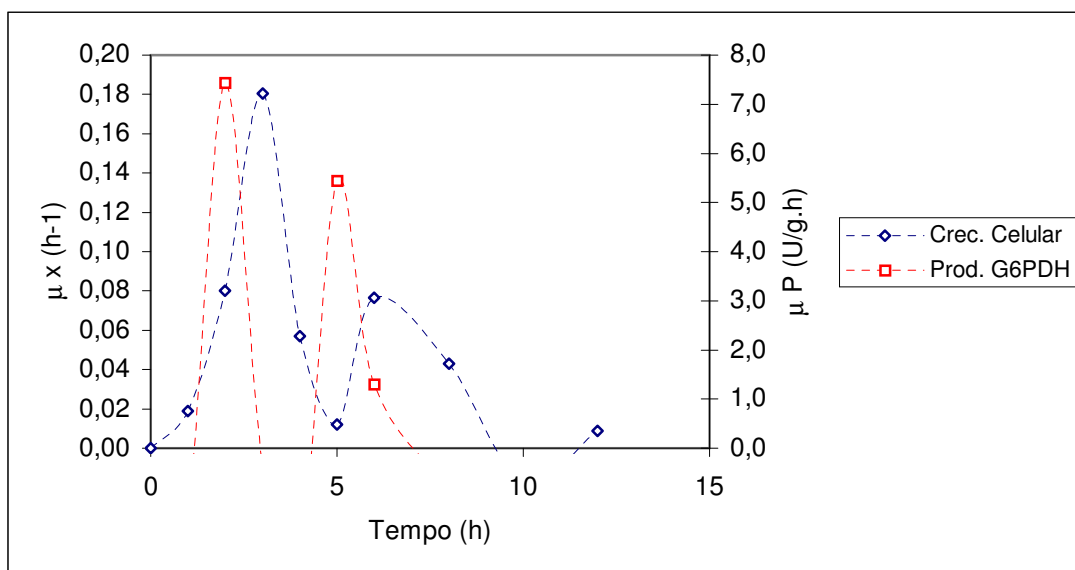


Figura 5.56: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular ( $\mu$ ) e de Produção de G6PDH ( $\mu_P$ ) no tempo para o Ensaio D-13

Através das figuras apresentadas anteriormente e que indicavam os perfis das curvas de velocidades específicas (crescimento, consumo de substrato e produção de G6PDH) concluiu-se que as mesmas dependeram das condições de cultivo. A correlação entre os três parâmetros de velocidade específica (crescimento, consumo de substrato e produção de G6PDH) também dependeu das condições de ensaio, de forma que alguns cultivos apresentavam eventos acoplados e outro evento parcial ou totalmente desacoplados.

Nos ensaios utilizando pH 4,6, verificamos que no ensaio utilizando aeração moderada (D-7), manteve-se acoplamento parcial entre crescimento celular e consumo de substrato (Figura 5.42) e crescimento celular e biossíntese de G6PDH (Figura 5.43) até 8h de ensaio, ocorrendo desacoplamento após este momento. Nota-se a ocorrência de acoplamento total entre consumo de substrato e biossíntese de G6PDH também até 8h de cultivo, ocorrendo posterior desacoplamento. Ao analisarmos o cultivo com elevada aeração (D-8), observamos o acoplamento parcial entre crescimento celular e consumo de substrato (Figura 5.44) e os desacoplamentos entre

crescimento celular e biossíntese de G6PDH e consumo de substrato e biossíntese de G6PDH (Figura 5.45), o que indica que o metabolismo utilizado pelo microrganismo nestas condições não foi favorável ou não priorizou a biossíntese de G6PDH.

Para os ensaios sobre baixa aeração (D-9), nota-se desacoplamento total entre os três perfis de curvas (crescimento celular, consumo de substrato e biossíntese de G6PDH) conforme pode ser observado nas Figuras 5.46 e 5.47, enquanto que, para o cultivo em ambiente microaerado (D-13), notamos acoplamento parcial entre crescimento celular e biossíntese de G6PDH (Figura 5.56) e acoplamento total entre consumo de substrato e crescimento celular até 5h de ensaio, ocorrendo posterior desacoplamento (Figura 5.55). Também houve acoplamento entre consumo de glicose e biossíntese de G6PDH até 5h de ensaio, ocorrendo desacoplamento após esse período. O acoplamento total entre os três perfis de curvas durante as primeiras 5h de cultivo, justificam o melhor resultado em produtividade do que o apresentado para cultivo em baixa aeração e confirma a necessidade de acoplamento entre os três perfis para uma otimização da produção de G6PDH.

SILVA *et al.* (2002) sugerem acoplamento entre produção de G6PDH e crescimento celular, uma vez que os resultados de produtividade da enzima foram maiores para as condições onde a produtividade em célula também foi maior. Além de acoplados, os dois eventos dependem do oxigênio dissolvido no meio.

As tabelas apresentadas no APÊNDICE VI mostram as relações entre a atividade enzimática da G6PDH ( $A_e$ , expressa em U/g cél.) e as velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu$ ) e de consumo de Glicose ( $\mu_S$ ).

Através destes resultados nota-se claramente que em todos os ensaios efetuados, a  $A_e$  sempre foi maior que  $\mu$  e  $\mu_S$ , mesmo nos instantes em que o valor de  $A_e$  era mínimo ou decaía durante o ensaio. Em diversos ensaios, porém, essa relação pode ser considerada zero e ocorreu em pontos onde não houve crescimento celular ou consumo de glicose. Diante destes



resultados, concluiu-se que a enzima G6PDH não foi um fator limitante da disponibilidade de Glicose para o metabolismo celular. DURANTI (1991) e VITOLLO *et al.* (1985) já haviam verificado o mesmo tipo de situação para a obtenção da enzima invertase.

Observa-se, também, a partir das referidas tabelas que na maior parte dos ensaios realizados  $\mu_S$  sempre foi maior que  $\mu$ , indicando que a quantidade de Glicose presente no meio de cultivo não foi um fator limitante do crescimento celular. Foi verificado que durante os cultivos nos ensaios que apresentaram os melhores resultados, tanto para o pH 4,6 (Tabela A6.7) quanto para o pH 5,7 (A6.6), ocorreu uma limitação por Glicose do crescimento celular por um intervalo do tempo de cultivo. Concluiu-se que este fato ocorreu devido à maior utilização da Glicose no meio para a biossíntese de G6PDH, ou seja, ocorreram desvios metabólicos que priorizaram mais a obtenção da enzima o que tornou menor a quantidade disponível de Glicose.

Nos demais ensaios, verificaram-se uma razão  $\mu_S / \mu$  sempre bem maior que a unidade o que sugere que apenas uma parte da Glicose presente no meio de cultivo estava sendo utilizada para o crescimento celular e o restante estaria sendo utilizado para gerar:

- Substâncias de reserva (Trealose, glicogênio), bem documentados por VITOLLO *et al.* (1985), VAN DORN *et al.* (1988) e FRANÇOIS & PARROU (2000).
- Produção de ATP (energia química potencial), que tem a função de alimentar as vias metabólicas consumidoras de energia (geração de aminoácidos, por exemplo). A geração de ATP está bem documentada em CAUBET *et al.* (1988), POSTMA (1988), DE MORAIS (1985) e confirmado em estudos de fluxos metabólicos mais recentes como JIN *et al.* (1997) e FLORES (2000).
- Metabolizar produtos secundários, como Etanol, o que pode ser confirmado em estudos feitos por PRONK *et al.* (1996), POSTMA (1988) e PAALME *et al.* (1997).

A razão  $\mu / \mu_P$  foi maior para os ensaios em baixa aeração (Tabelas A6.9, A6.10 e A6.11) e em ambiente microaerado (Tabelas A6.12 e A6.13) indicando que a concentração de oxigênio dissolvido também influencia na quantidade de Glicose utilizada no crescimento celular. O inverso dessa razão, ou seja,  $\mu_P/\mu$  foi menor para estes ensaios indicando que uma maior parcela da Glicose do meio estava sendo utilizada no crescimento celular quando comparada com ensaios em alta (Tabelas A6.6 e A6.8) e moderada aeração (Tabelas A6.5 e A6.7). Para o cultivo onde se obtiveram os melhores resultados, verificaram-se alterações expressivas destas razões entre velocidades específicas, com a alternância de picos seguidos por valores pontuais no intervalo de apenas uma hora de cultivo. Este fato pode ser devido à ocorrência de mudanças nas vias metabólicas nos tempos 1h, 4h e 8h, resultantes de uma possível ativação ou desativação do plasmídeo inserido na célula e sua conseqüente alteração na distribuição da energia intracelular disponível.

Segundo LIEVENSE (1982), o grau de gemulação das células de levedura varia ao longo do cultivo de forma que diante de velocidades específicas de crescimento baixas estaremos com uma predominância de células individuais, enquanto que, diante de elevadas velocidades específicas de crescimento teremos uma predominância de células germuladas. Através da análise microscópica efetuada durante a contagem celular e posterior análise de viabilidade celular, verificou-se que durante as primeiras horas de cultivo predominaram as células individuais, seguidas por uma maior predominância de células germuladas durante a fase exponencial e, em ensaios onde se atingiu a fase estacionária, verificou-se um maior predomínio das células individuais.

Ao compararmos a análise em microscópio com os valores de  $\mu$ , apresentados nas tabelas do APÊNDICE VI, verificamos uma confirmação do estudo apresentado por LIEVENSE (1982).

Em cultivos descontínuos, sabe-se que durante a fase lag, ocorre uma adaptação do microrganismo ao novo meio e condição de ensaio e, segundo

LILLIE (1980) ocorre um acúmulo de substâncias de reserva, que serão rapidamente metabolizadas durante a fase exponencial de crescimento. VAN DORN (1988) cita que o intenso consumo das substâncias de reserva no início da fase exponencial ativa e intensifica a demanda do microrganismo pela fonte de carbono disponível no meio, o que é justificado aqui pelos resultados obtidos para  $\mu_S$ , onde seus valores aumentam no início da fase exponencial. No caso específico do cultivo de *S. cerevisiae* W303-181, o mesmo não pôde ser verificado, ocorrendo na maior parte dos cultivos um valor de  $\mu_S$  já elevado desde o início do cultivo, mesmo diante de uma fase inicial de adaptação (lag). Nos ensaios, ocorreu uma diminuição no valor de  $\mu_S$ , seguido por uma manutenção destes valores em níveis próximos só vindo a cair ao final do cultivo.

