

5.2.OBTENÇÃO DE G6PDH EM PROCESSO DESCONTÍNUO ALIMENTADO

Segundo YAMANE & SHIMIZU (1984), nutrientes podem inibir o crescimento celular de microrganismos mesmo diante de concentrações baixas. Temos, então, uma justificativa para o controle da concentração de nutrientes, especialmente da fonte de carbono, no meio visando uma maior produção de biomassa.

Tabela 5.57: Ensaio Descontínuos Alimentados de *S.cerevisiae* W303-181 mantendo-se fixos $N = 400 \text{ rpm}$, $T = 30^\circ \text{ C}$, $\phi_{ar} = 2,2 \text{ vvm}$, $\text{pH} 5,7$; $\text{C:N } 6,7$, Glicose: 5 g/L ; YNB: $1,85 \text{ g/L}$; Micronutriente: 20 mg/L

Ensaio	Parâmetros Variados
A-1	PULSO VAZÃO CONSTANTE / GLICOSE
A-2	PULSO VAZÃO CONSTANTE / MICRONUTRIENTES
A-3	PULSO VAZÃO LINEAR DECRESCENTE / GLICOSE
A-4	PULSO VAZÃO LINEAR DECRESCENTE / MICRONUTRIENTES
A-5	PULSO VAZÃO LINEAR CRESCENTE / GLICOSE
A-6	PULSO VAZÃO LINEAR CRESCENTE / MICRONUTRIENTES
A-7	PULSO VAZÃO EXPONENCIAL DECRESCENTE / GLICOSE
A-8	PULSO VAZÃO EXPONENCIAL DECRESCENTE / MICRONUTRIENTES
A-9	PULSO VAZÃO EXPONENCIAL CRESCENTE / GLICOSE
A-10	PULSO VAZÃO EXPONENCIAL CRESCENTE / MICRONUTRIENTES
A-11	PULSO VAZÃO LINEAR DECRESCENTE / MICRONUTRIENTES + YNB + GLICOSE
A-12	PULSO VAZÃO LINEAR DECRESCENTE / GLICOSE + YNB
A-13	PULSO VAZÃO LINEAR DECRESCENTE / GLICOSE + MICRONUTRIENTES

5.2.1. Discussão sobre a condição ótima de enchimento e nutriente alimentado:

Através dos dados apresentados pela Tabela A5.1. do APÊNDICE V podemos concluir que levando em conta a produção de G6PDH durante a fase de alimentação no cultivo, o melhor resultado foi o de alimentação exponencial crescente utilizando a Glicose como o nutriente alimentado.

Uma justificativa para esse melhor desempenho do cultivo exponencial crescente estaria em um melhor doseamento da quantidade de glicose necessária pelo microrganismo. Uma vez que o microrganismo cresce segundo uma curva exponencial, mostra-se coerente que a necessidade de glicose pelo mesmo também aumente de forma exponencial. Ao fornecermos a quantidade de glicose estritamente necessária pelo microrganismo naquele momento, estaremos diminuindo a concentração de glicose no meio e facilitando o desvio para a via metabólica de respiração celular, que disponibiliza uma maior quantidade de ATP a ser utilizada para a biossíntese de G6PDH.

POSTMA *et al.* (1988) estudaram o Efeito *Crabtree* em cultivos contínuos de *S.cerevisiae* utilizando concentrações limitadas de glicose e verificaram que quanto maior a taxa de diluição (conseqüentemente maior a concentração de substrato residual no meio de cultivo) maior será o desvio para o metabolismo fermentativo do microrganismo, uma vez que a capacidade respiratória da levedura fica limitada.

O segundo melhor resultado levando em conta a produtividade em G6PDH foi obtido para o ensaio linear decrescente e seu resultado durante a alimentação foi inferior ao exponencial crescente devido a grande concentração de substrato nos tempos iniciais de cultivo.

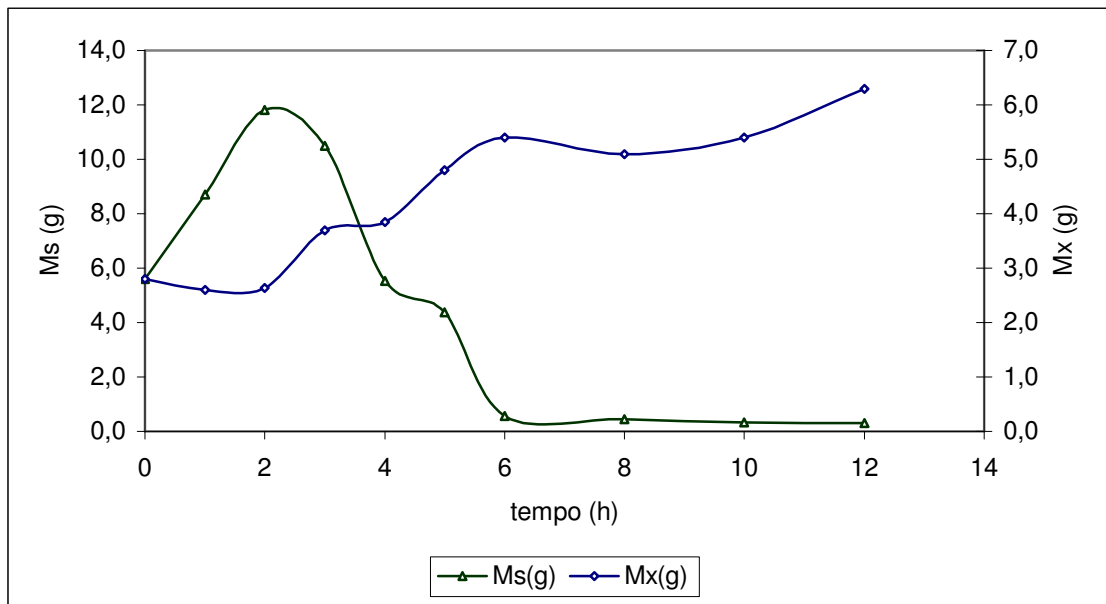


Figura 5.58: Variação da Massa Celular (Mx) e Massa de Glicose (Ms) em função do tempo (t) no Ensaio A-3

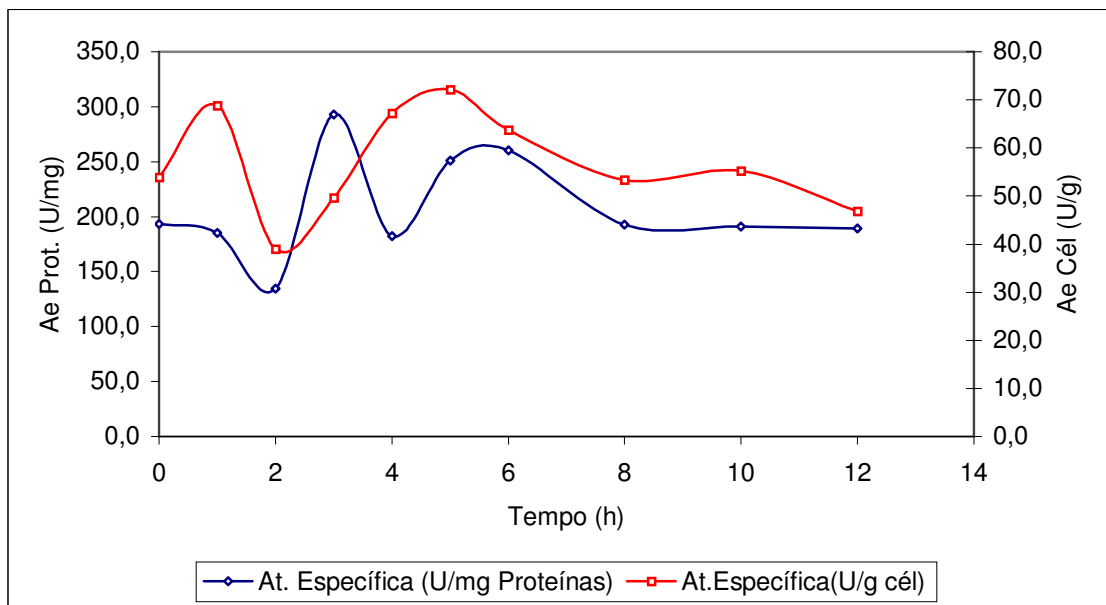


Figura 5.59: Variação da Atividade Específica Celular ($Ae_{cél}$) e da Atividade Específica Protéica (Ae_{Prot}) no Ensaio A-3

Ao analisarmos os resultados apresentados para o ensaio A-3 (linear decrescente alimentando com glicose) verificamos que ocorreu produção de

G6PDH após três horas de alimentação, período onde a massa de glicose disponível estava em torno de 5g/L. O consumo de glicose no início do cultivo esteve totalmente deslocado para o crescimento celular mas não resultou em aumento da produção de G6PDH, indicando que a biossíntese desta enzima não estava sendo priorizada e esta síntese estava inativa. Houve acúmulo de substrato durante as três primeiras horas de alimentação indicando que a quantidade fornecida era superior à necessária e este pode ser um dos fatores que determinaram a não produção de G6PDH neste período.

Segundo POSTMA *et al.* (1988), o aumento da taxa de diluição, conseqüentemente, da concentração de substrato no meio, implica numa diminuição da produção de G6PDH. Estes resultados comprovam que a formação de G6PDH é favorecida quando em meio com baixa concentração de Glicose (nos ensaios descontínuos foi verificada uma tendência a elevação na atividade enzimática da G6PDH quando o meio continha menos de 5g/L de glicose).

Em nenhum dos 13 ensaios descontínuo–alimentados conseguiu-se manter constante a concentração de substrato no meio indicando a necessidade de maiores estudos visando a otimização deste processo, que só seria alcançada quando for mantido em alimentação exponencial crescente a concentração de glicose de 5g/L durante toda a alimentação.

Segundo os dados apresentados a seguir verifica-se que no ensaio exponencial crescente alimentando com glicose (A-9) conseguiu-se uma maior manutenção nos níveis de glicose disponíveis durante a alimentação, o que garante a manutenção da ativação das mesmas vias metabólicas durante todo o período de alimentação através da manutenção dos níveis de glicose em torno de 5g/L.

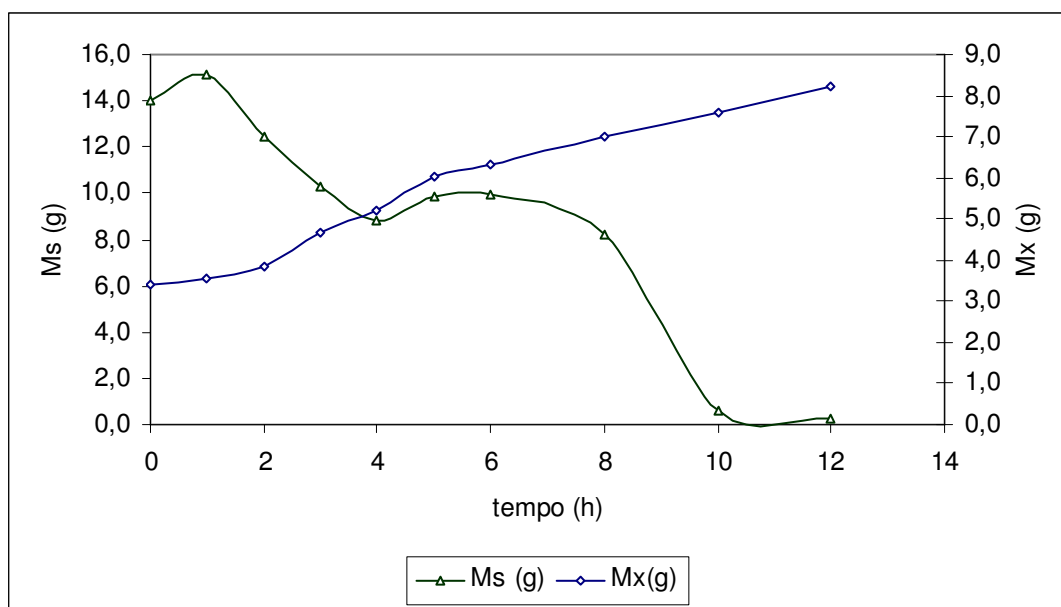


Figura 5.60: Variação da Massa Celular (Mx) e Massa de Glicose (Ms) em função do tempo (t) no Ensaio A-9

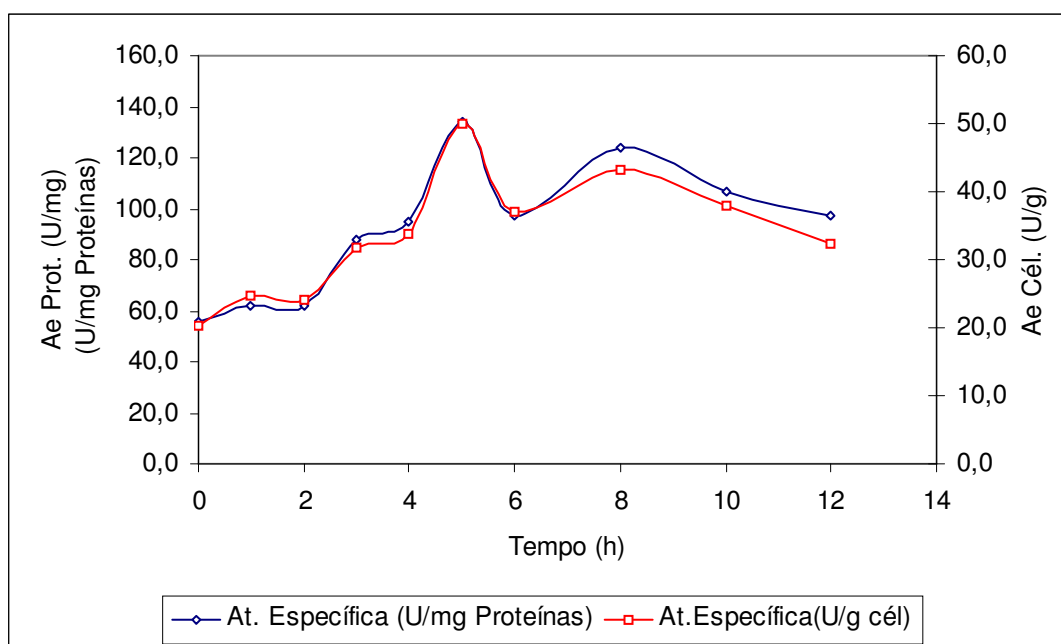


Figura 5.61: Variação da Atividade Específica Celular ($Ae_{cél}$) e da Atividade Específica Protéica (Ae_{Prot}) no Ensaio A-9

A manutenção dos níveis de glicose na concentração já tida como a mais indicada (diante dos resultados obtidos nos ensaios descontínuos) e a conseqüente manutenção das vias metabólicas que priorizam e beneficiam a

biossíntese de G6PDH plasmidial também podem ser considerados fatores que podem ter influenciado no melhor resultado obtido para este tipo de alimentação.

Os resultados apresentados na Tabela A5.2 do APÊNDICE V comprovam que o melhor ensaio ao se levar em conta o período de alimentação foi realmente o exponencial crescente alimentando com glicose (A-9), pois, se conseguiu um aumento de 16,3% na produção de G6PDH em relação ao segundo melhor resultado (linear decrescente alimentando com glicose, A3).

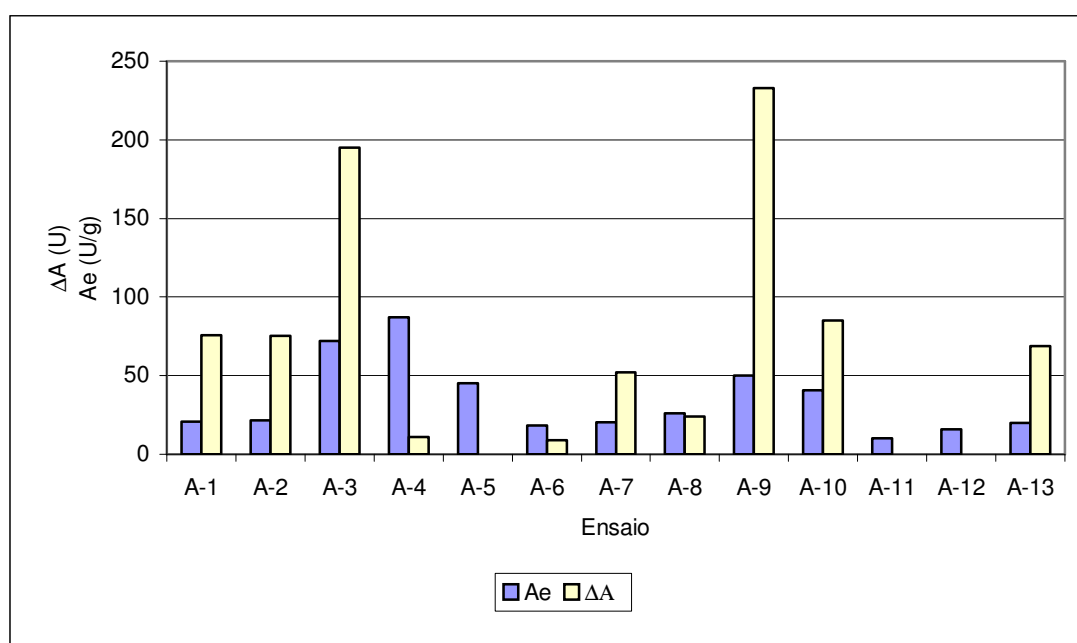


Figura 5.62: Resultados e parâmetros obtidos para os ensaios descontínuo-alimentados.

Ao analisarmos, porém, as atividades específicas, verificamos que a maior produção por grama de célula ou miligrama de proteína foi obtida no ensaio linear decrescente alimentando com glicose. Este resultado pode ser justificado pelo fato de ter ocorrido um salto na atividade enzimática após três horas de cultivo neste ensaio indicando que, a partir deste período, o microrganismo deixou de priorizar o crescimento celular (notado pela queda nos valores de velocidade específica de crescimento celular após 3h de

alimentação) e passou a priorizar vias que favoreciam a biossíntese de G6PDH (Figura 5.90 e 5.91) .

Através da Tabela A5.3 do APÊNDICE V, verificamos que o melhor resultado também foi alcançado para a alimentação do tipo exponencial crescente com glicose (A-9) sendo alimentada mesmo quando levamos em conta todo o tempo de ensaio, ou seja, a fase descontínuo-alimentada (0h - 5h) e a fase descontínua (6h – 12h).

Verificamos através da Tabela A5.4 do APÊNDICE V que em, praticamente, todos os ensaios o consumo de glicose atingiu sua totalidade até o final do ensaio (12h), exceção feita ao ensaio utilizando Glicose e Micronutrientes como nutrientes alimentados (A-13). Trata-se do Ensaio onde obteve-se o maior tempo de geração (14,7 h) e houve um acúmulo de glicose no meio, o que pode ser verificado nos resultados apresentados a seguir:

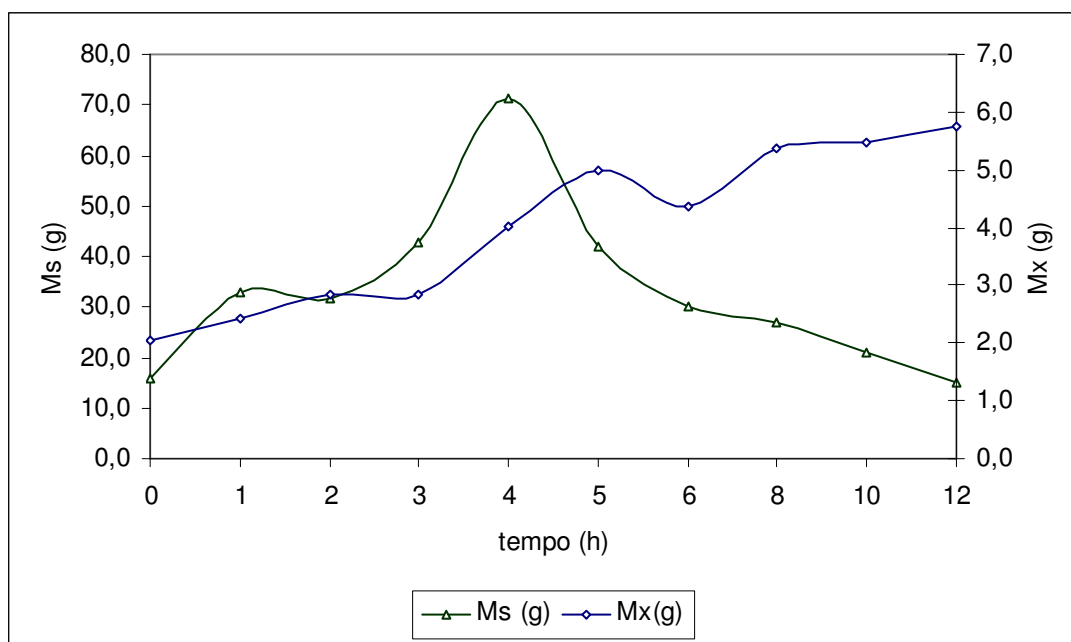


Figura 5.63: Variação da Massa Celular (Mx) e Massa de Glicose (Ms) em função do tempo (t) no Ensaio A-13

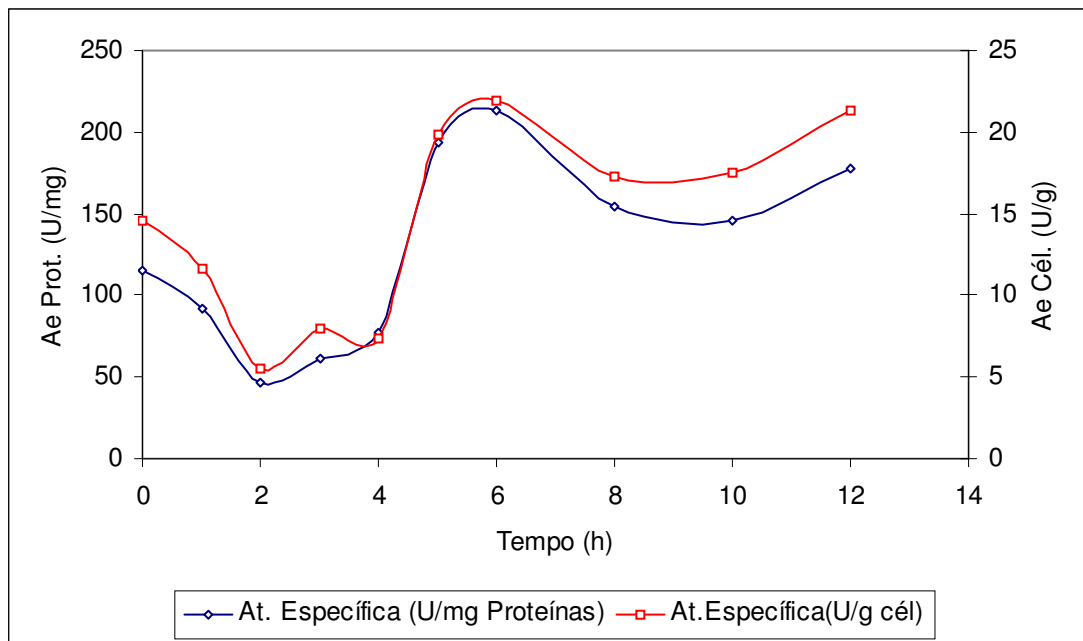


Figura 5.64: Variação da Atividade Específica Celular (Ae_{cel}) e da Atividade Específica Protéica (Ae_{prot}) no Ensaio A-13

O acúmulo indica que a glicose só começou a ser efetivamente metabolizada pela levedura após 5h de ensaio o que fez com que em 12h não se extinguisse a massa de glicose presente no meio.

Segundo BROWN *et al.* (1987), as maiores velocidades de crescimento celular ocorrem com valores de concentração de substrato no meio maiores que a necessária para que não ocorresse nenhum efeito de repressão catabólica e sugere que se conduza o processo fermentativo fornecendo, primeiramente, grande quantidade de substrato, favorecendo o crescimento celular e, em seguida, diminuir o fornecimento deste substrato de forma a limitar a concentração do mesmo e o crescimento celular para que assim ocorra desrepressão e a enzima e o produto desejado seja produzido. Esta seria uma justificativa para o bom resultado apresentado para a alimentação linear decrescente, uma vez que tínhamos grande concentração de Glicose nas primeiras horas de cultivo, seguido por baixas concentrações sendo adicionadas.

Observamos através das Tabelas A5.5 e A5.6 do APÊNDICE V e resumidas pela Figura 5.61 que as maiores atividades específicas foram obtidas para os ensaios utilizando adição linear decrescente.

Ao levarmos em conta o fator atividade específica (U/g), ou seja, a capacidade que cada célula tem de produzir G6PDH, considera-se o método de adição linear decrescente (A-3 e A-4) o mais adequado. A expressão de G6PDH é maior em ensaios sob este tipo de adição provavelmente devido às vias metabólicas que foram ativadas diante destas condições de cultivo e que possibilitaram um salto na atividade enzimática e, conseqüentemente, da biossíntese da G6PDH após 3h de ensaio.

O salto na produção de G6PDH ocorre simultaneamente com a queda na velocidade específica de crescimento celular diante da manutenção dos mesmos níveis de velocidade específica de consumo de substrato, o que reforça a idéia de mudança nas vias metabólicas da célula.

Através dos dados apresentados na Tabela A5.7 do APÊNDICE V verifica-se que o consumo de base foi sempre maior que o de ácido em todos os ensaios, o que mostra coerência com os resultados obtidos no mesmo valor de pH para os ensaios descontínuos.

Ao compararmos os dados da tabela A5.7 com os dados da tabela A4.7, verifica-se que o consumo de base foi maior nos ensaios descontínuo-alimentados, o que indica uma maior acidificação do meio extracelular. Esta maior acidificação pode ser resultado de um maior efluxo de prótons (H^+), o que favoreceria a geração de ATP.

Através da Tabela A5.8 do APÊNDICE V verifica-se que as taxas de crescimento celular obtidas foram semelhantes às obtidas nos ensaios descontínuos (Tabela A4.3, APÊNDICE IV), mas os valores de $\mu_{m\acute{a}x}$ obtidos para os ensaios descontínuos foram inferiores ao $\mu_{m\acute{a}x}$ obtido pelo ensaio D-6 (melhor resultado no descontínuo). A única exceção se faz ao Ensaio A-4, que atingiu um valor de $\mu_{m\acute{a}x}$ semelhante ao do Ensaio D-6.

Podemos dizer, portanto, que os ensaios descontínuo-alimentados não favoreceram o crescimento celular e em sua melhor condição mantiveram

níveis próximos ao obtido para a melhor condição de descontínuo em termos de atividade específica.

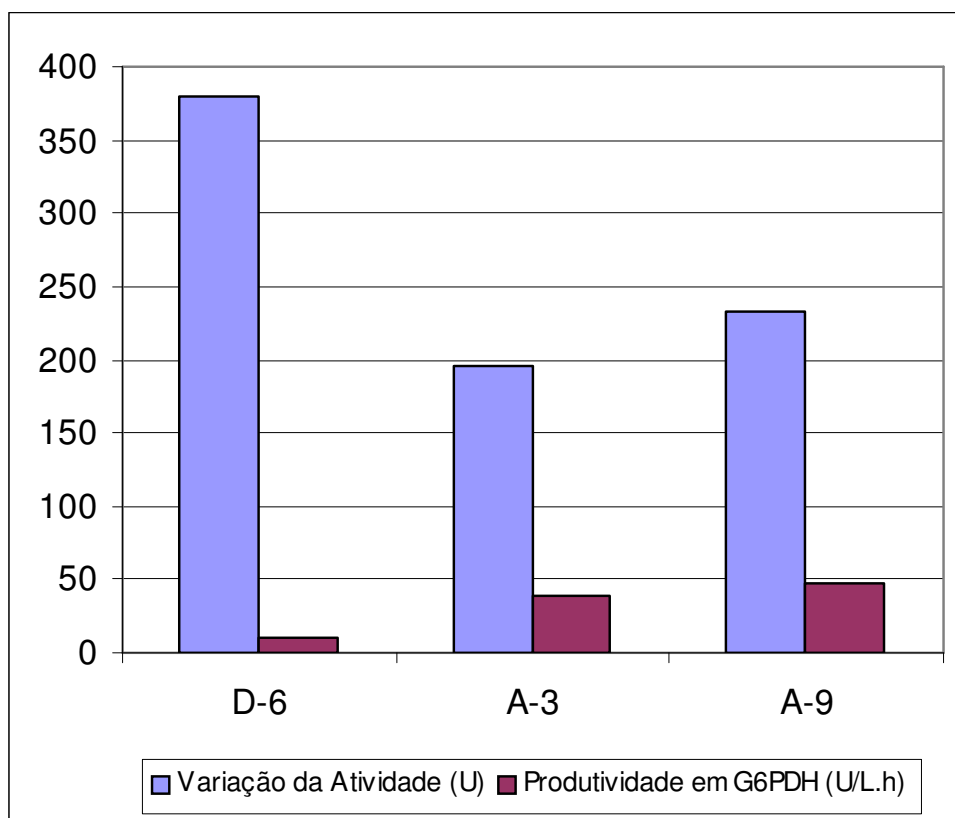


Figura 5.65: Produtividade em G6PDH para os melhores resultados obtidos nos ensaios descontínuos e descontínuo-alimentados

Se levarmos em conta, porém, os dados de produtividade enzimática e celular (Tabela A5.1 e A5.3, APÊNDICE V e resumidos na Figura 5.64) os resultados obtidos nos ensaios descontínuo-alimentados foram quatro vezes maiores que os valores obtidos nos ensaios descontínuos (Tabela A4.1 e A4.2, APÊNDICE IV) em suas respectivas melhores condições.

Levando-se em conta os resultados obtidos para a velocidade específica de biossíntese de G6PDH temos que a biossíntese de G6PDH durante toda a alimentação só ocorreu diante de alimentação com pulso constante de micronutrientes, linear crescente de micronutrientes, exponencial crescente de glicose e exponencial crescente de micronutrientes sendo, entre estes, a

maior produtividade alcançada na alimentação exponencial crescente de glicose.

Segundo LIEVENSE *et al.* (1982), a gemulação das células de *S.cerevisiae* diminui com o decréscimo nos valores de μ ., o que gera profundas mudanças no estado fisiológico das células, tanto na repressão-desrepressão gênica (ANDREWS *et al.*, 1990) quanto na ativação-desativação de determinadas enzimas metabólicas (FRANÇOIS, 1987). De acordo com os resultados obtidos para a velocidade de crescimento celular diante das diversas condições de alimentação temos que:

Para os ensaios com alimentação em pulso constante (A-1 e A-2), houve predominância das células individuais, tanto na alimentação com glicose, quanto na alimentação com micronutrientes.

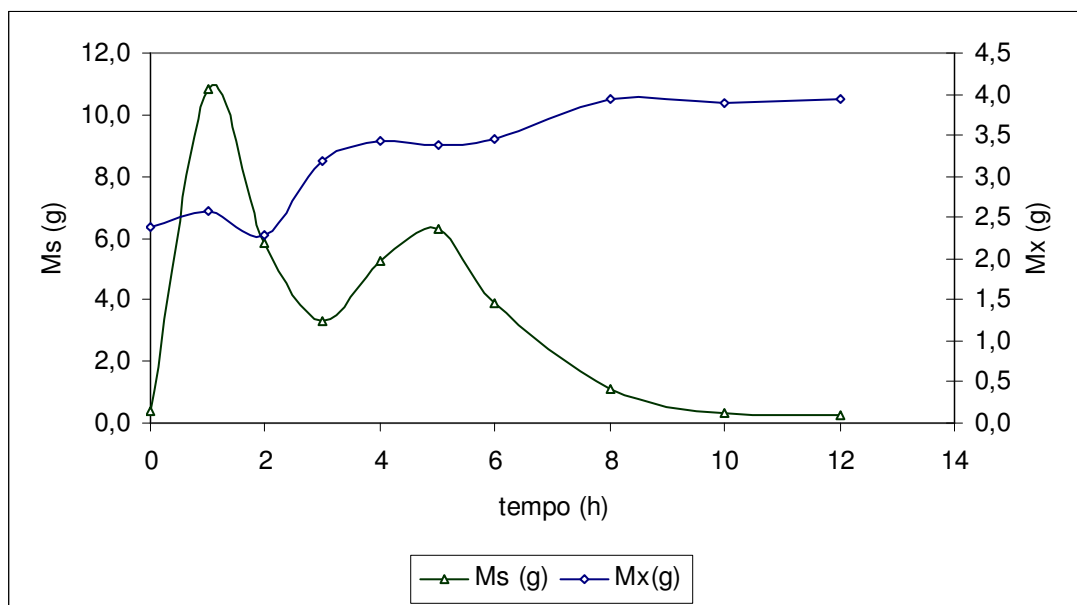


Figura 5.66: Variação da Massa Celular (Mx) e Massa de Glicose (Ms) em função do tempo (t) no Ensaio A-1

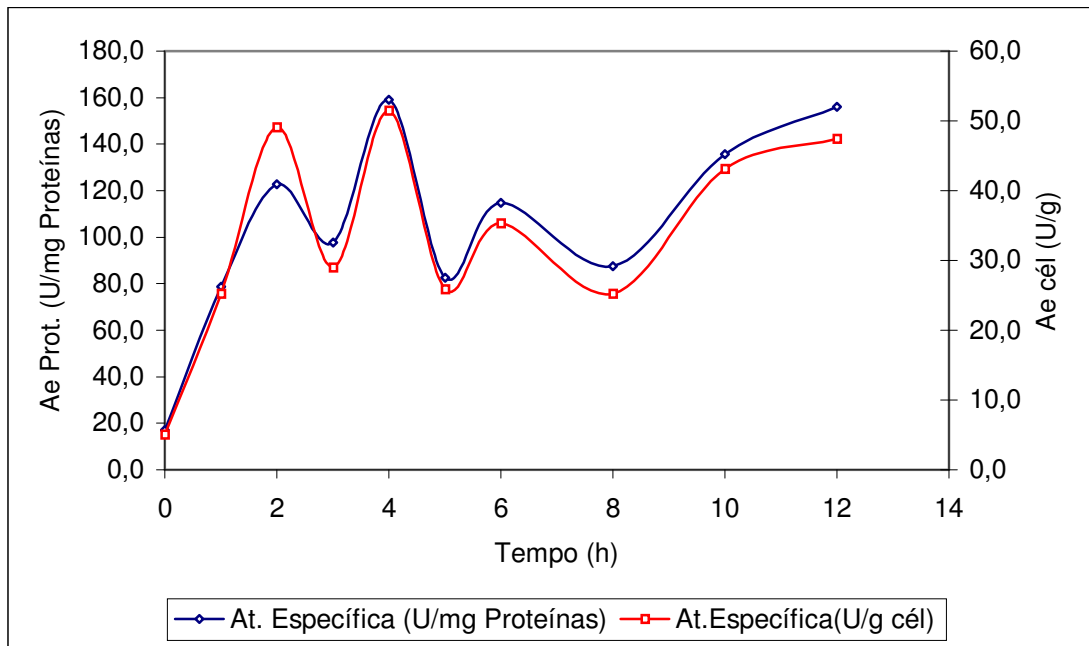


Figura 5.67: Variação da Atividade Específica Celular (Ae_{cel}) e da Atividade Específica Protéica (Ae_{Prot}) no Ensaio A-1

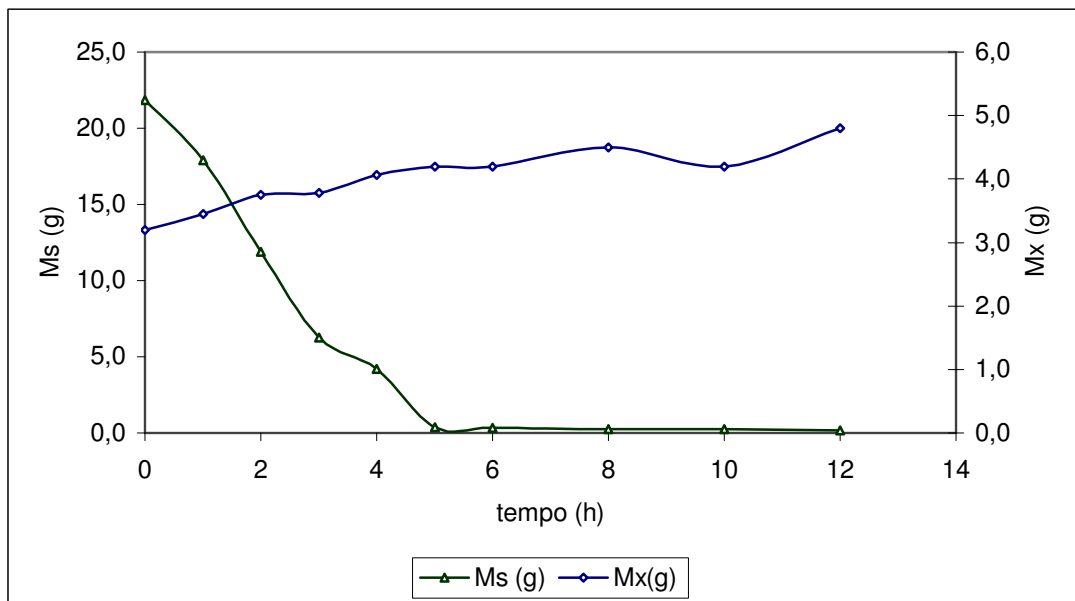


Figura 5.68: Variação da Massa Celular (Mx) e Massa de Glicose (Ms) em função do tempo (t) no Ensaio A-2

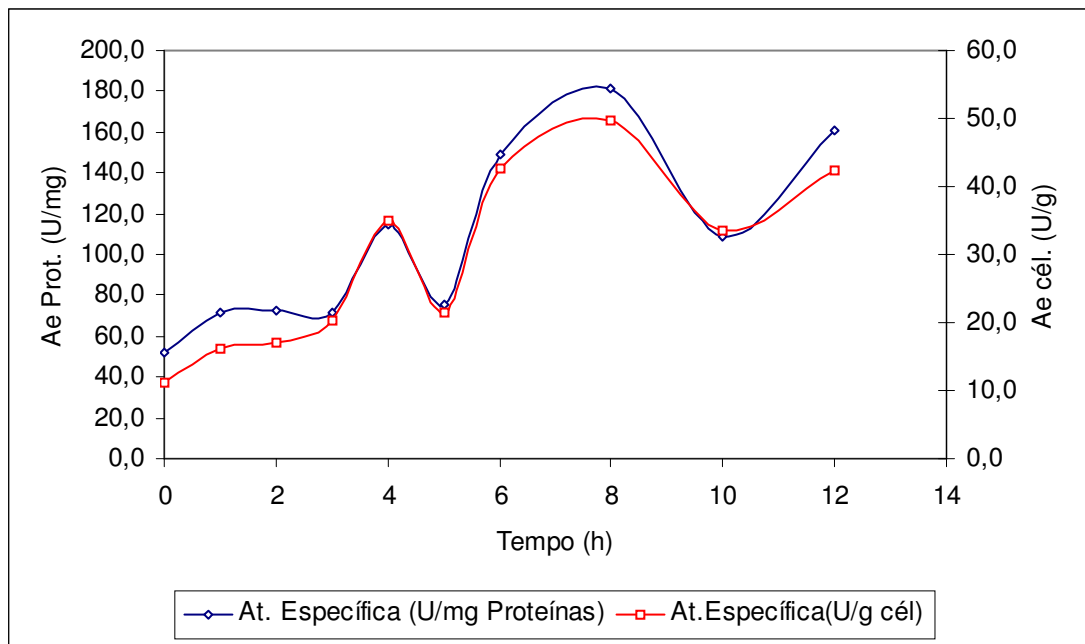


Figura 5.69 : Variação da Atividade Específica Celular (Ae_{cel}) e da Atividade Específica Protéica (Ae_{Prot}) no Ensaio A-2

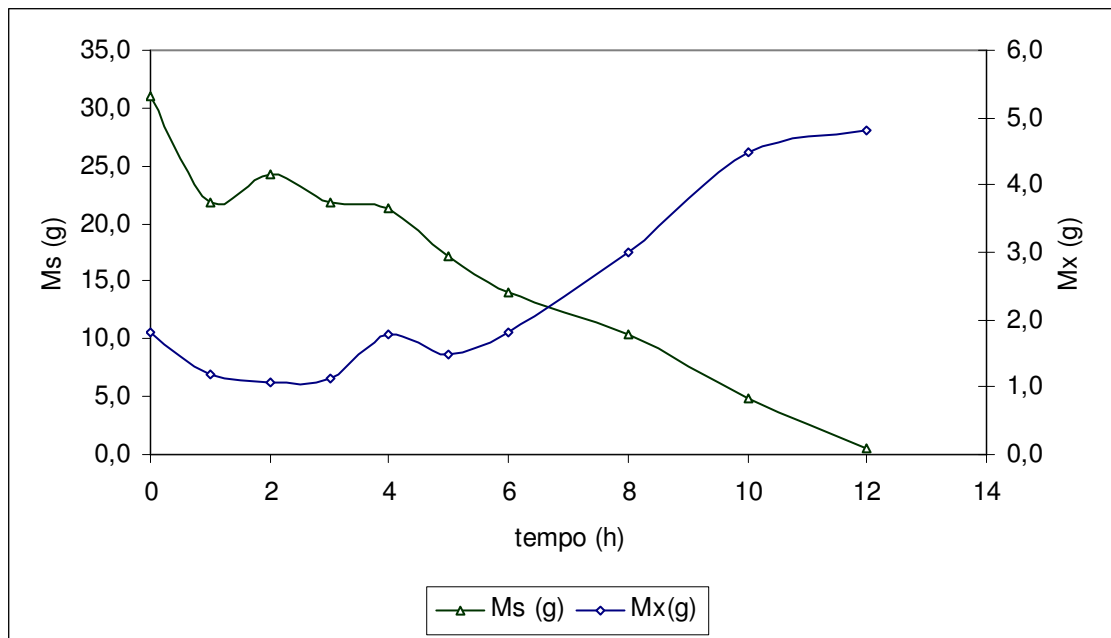


Figura 5.70: Variação da Massa Celular (Mx) e Massa de Glicose (Ms) em função do tempo (t) no Ensaio A-4

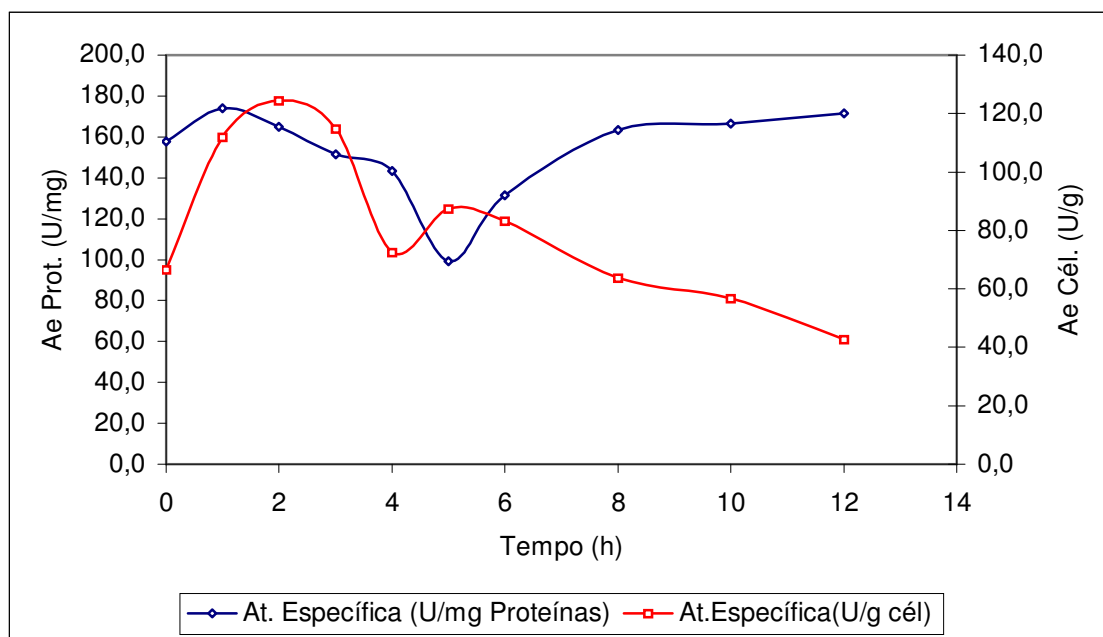


Figura 5.71: Variação da Atividade Específica Celular ($Ae_{cél}$) e da Atividade Específica Protéica (Ae_{prot}) no Ensaio A-4

Para os ensaios com alimentação linear decrescente (A-3 e A-4) houve períodos em que ocorreu predomínio de células individuais e períodos com predomínio de células gemuladas.

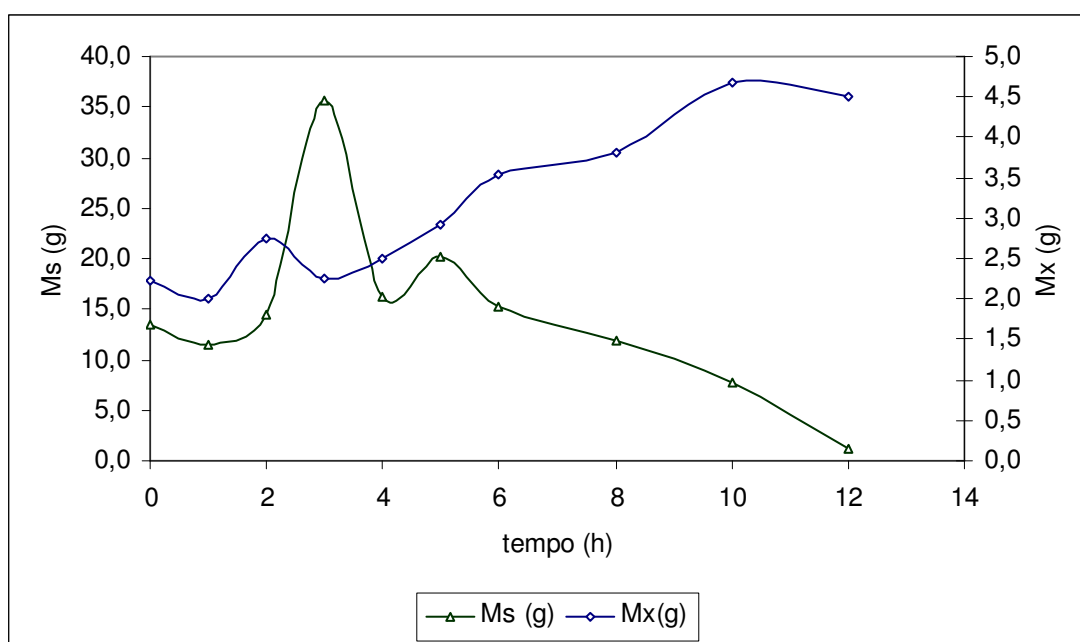


Figura 5.72: Variação da Massa Celular (Mx) e Massa de Glicose (Ms) em função do tempo (t) no Ensaio A-5

Para os ensaios com alimentação linear crescente (A-5 e A-6), houve um aumento do nível de gemulação das células, atingindo-se o máximo ao final da alimentação.

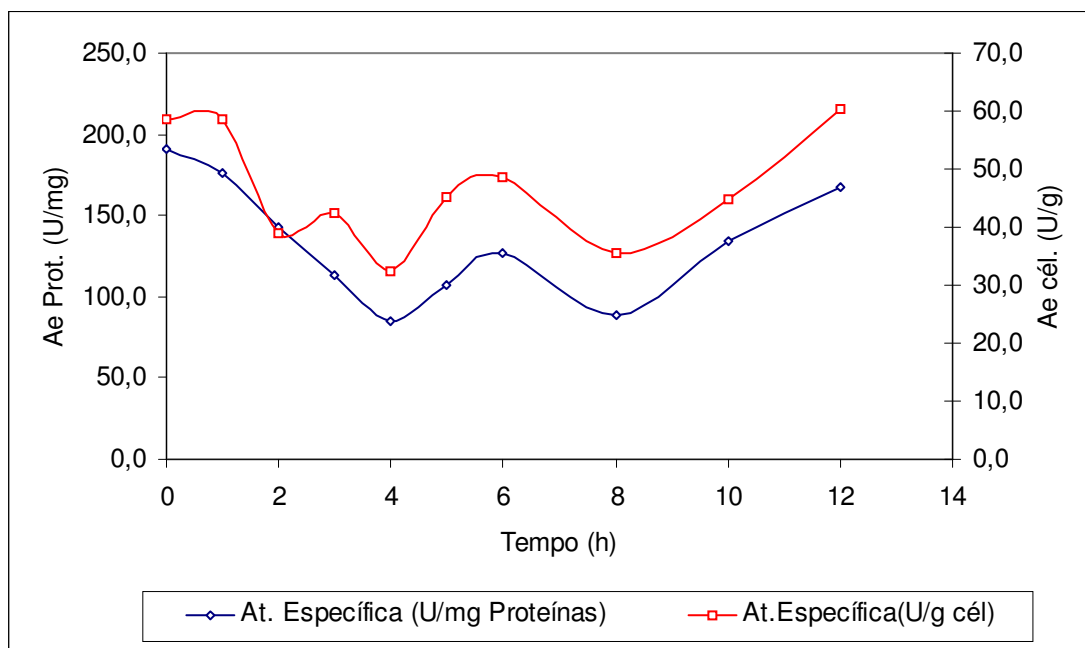


Figura 5.73: Variação da Atividade Específica Celular (Ae_{cel}) e da Atividade Específica Protéica (Ae_{Prot}) no Ensaio A-5

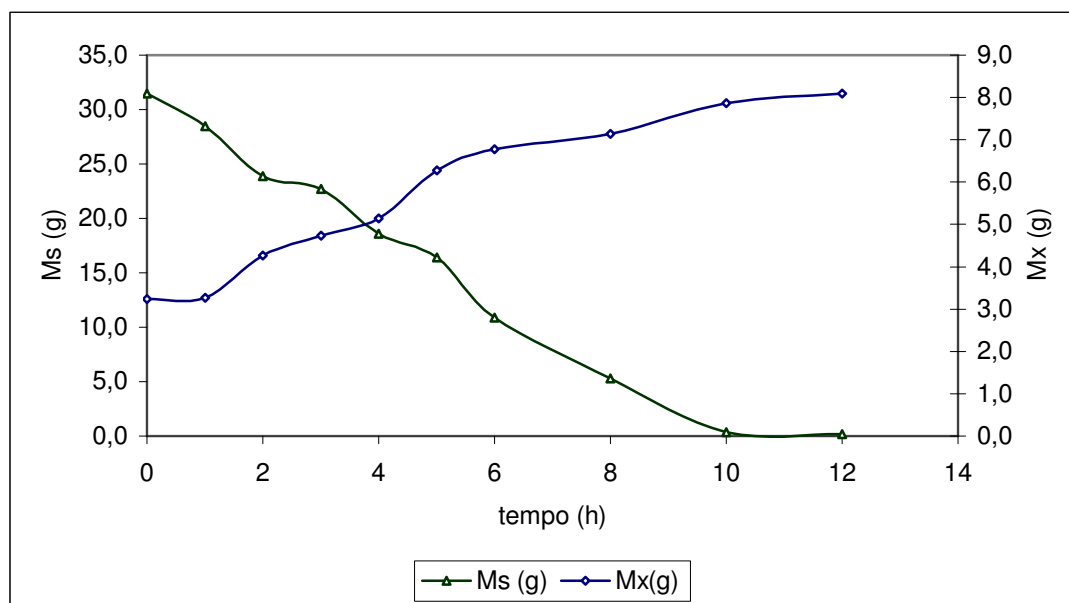


Figura 5.74: Variação da Massa Celular (Mx) e Massa de Glicose (Ms) em função do tempo (t) no Ensaio A-6

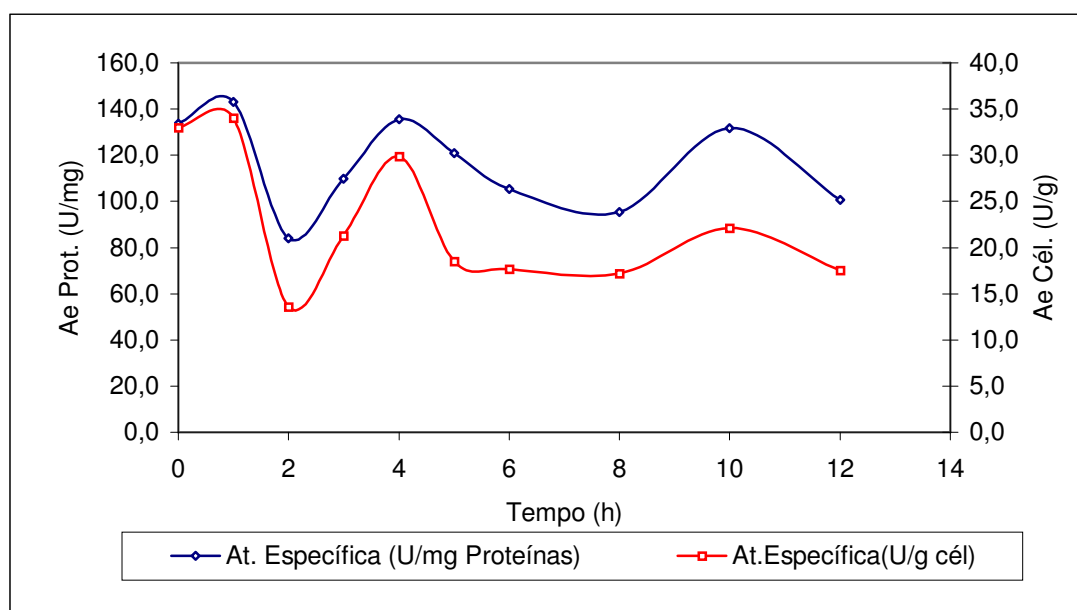


Figura 5.75: Variação da Atividade Específica Celular ($Ae_{cél}$) e da Atividade Específica Protéica (Ae_{Prot}) no Ensaio A-6

O ensaio com alimentação exponencial decrescente e com glicose conseguiu manter o mesmo nível de gemulação durante toda a fase de alimentação, o que garantiu uma maior manutenção do metabolismo e condições fisiológicas das células. Como resultado, tivemos uma excelente atividade específica em relação à concentração de proteínas, mas não tão boa atividade específica em relação à massa celular. Conclui-se que durante a fase de gemulação ocorre uma maior priorização na biossíntese de G6PDH do que na fase não gemulada e justifica que, em trabalhos posteriores, busque-se a manutenção das células gemuladas durante a alimentação.

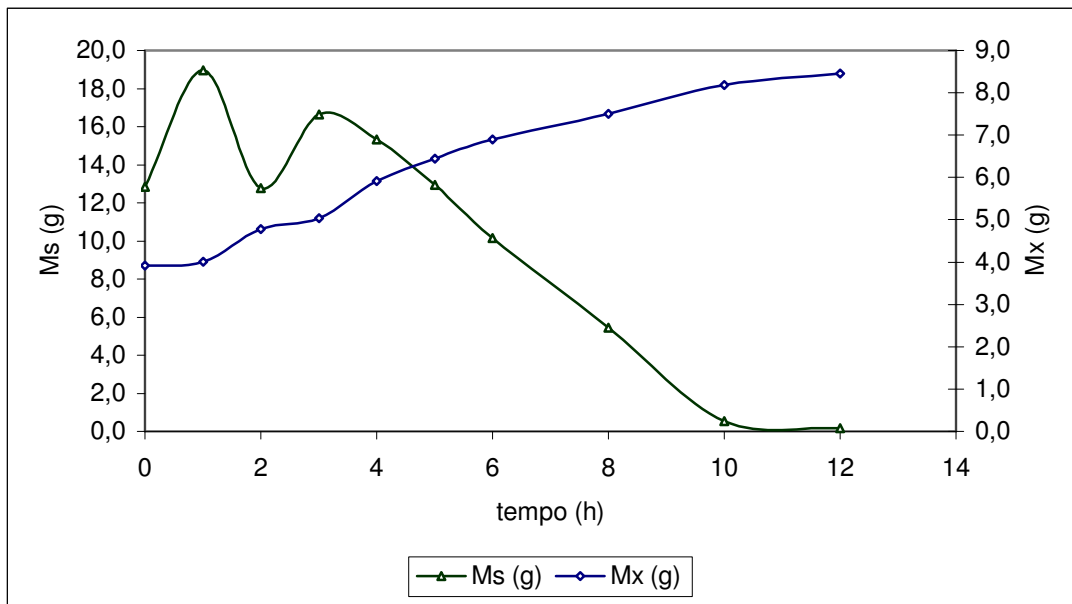


Figura 5.76: Variação da Massa Celular (Mx) e Massa de Glicose (Ms) em função do tempo (t) no Ensaio A-7

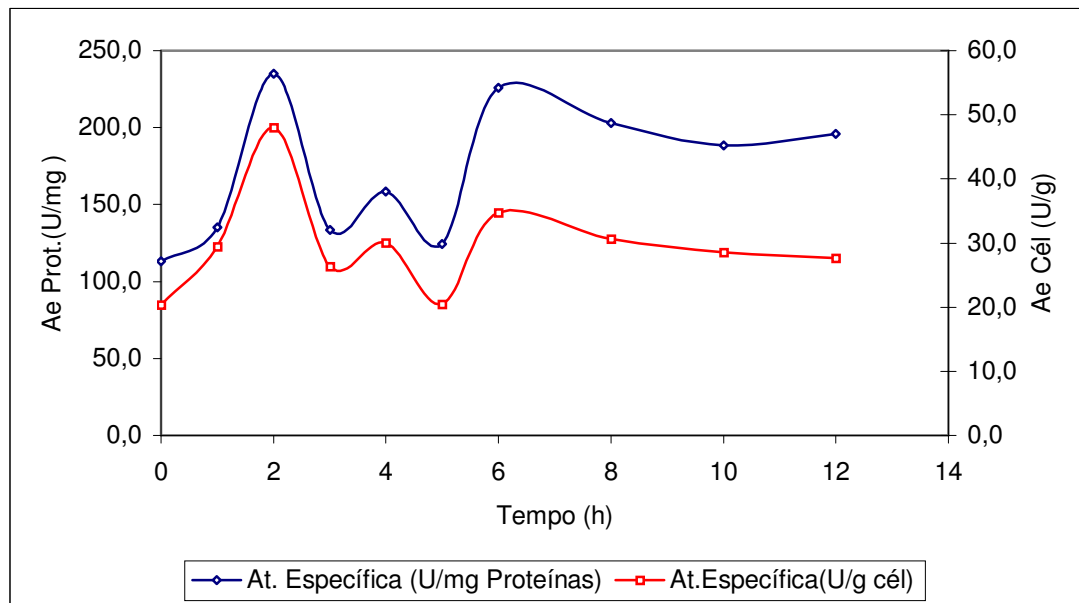


Figura 5.77: Variação da Atividade Específica Celular ($Ae_{cél}$) e da Atividade Específica Protéica (Ae_{Prot}) no Ensaio A-7

O ensaio com alimentação exponencial decrescente com micronutrientes não conseguiu manter o mesmo nível de gemulação durante toda a

alimentação, ocorrendo períodos em que havia o predomínio de células unitárias, seguidos por períodos com predomínio de células gemuladas.

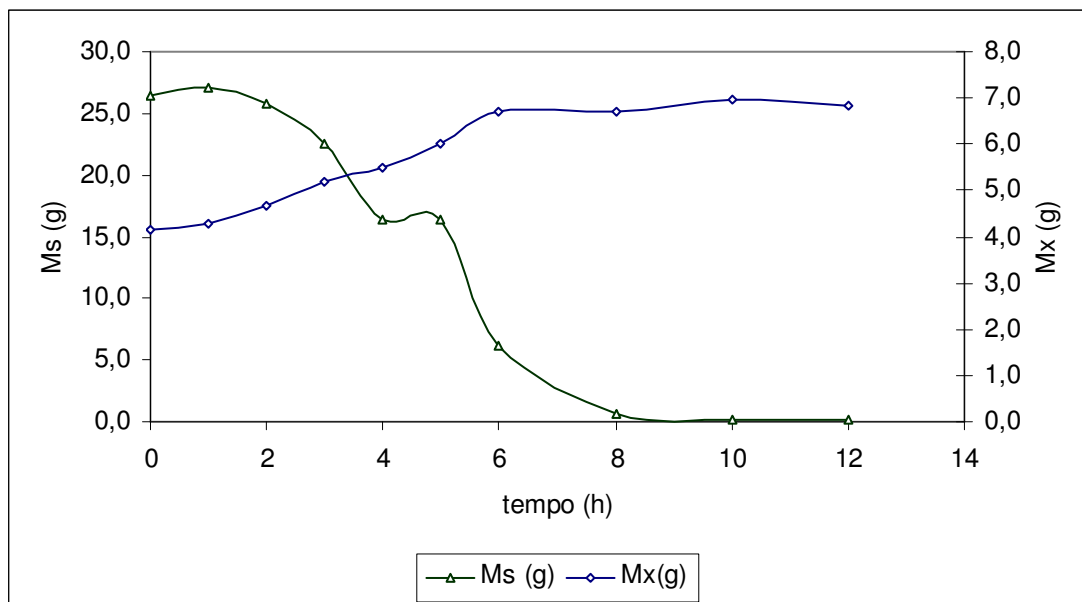


Figura 5.78: Variação da Massa Celular (Mx) e Massa de Glicose (Ms) em função do tempo (t) no Ensaio A-8

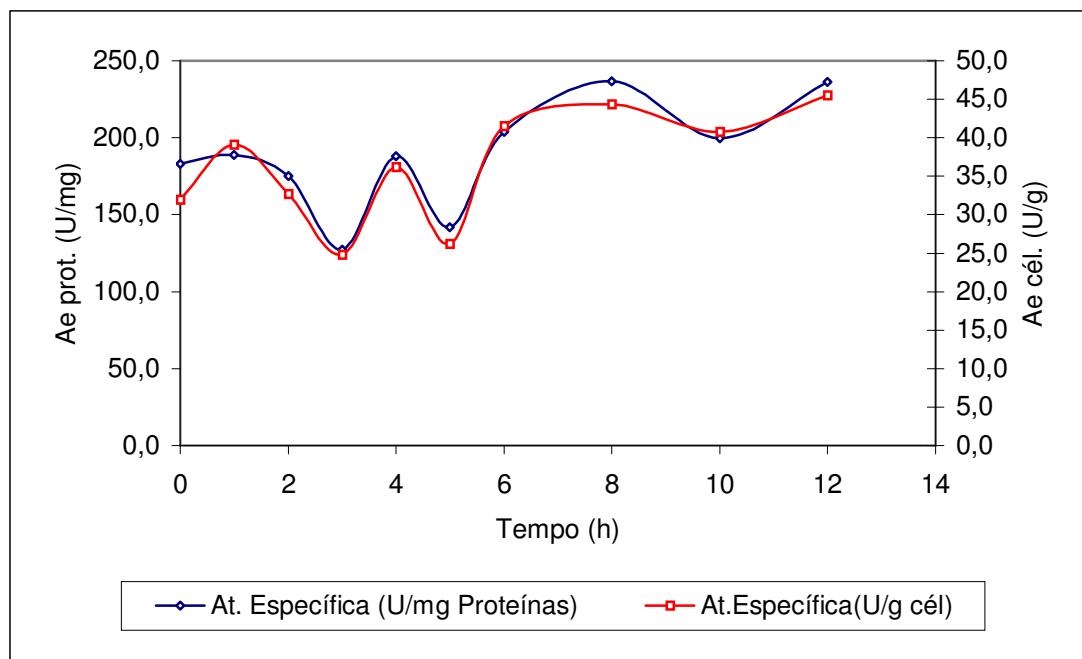


Figura 5.79: Variação da Atividade Específica Celular ($Ae_{cél}$) e da Atividade Específica Protéica (Ae_{Prot}) no Ensaio A-8

Os ensaios com alimentação exponencial crescente apresentaram um aumento no nível de gemulação da célula durante a alimentação, atingindo o valor máximo ao final da mesma.

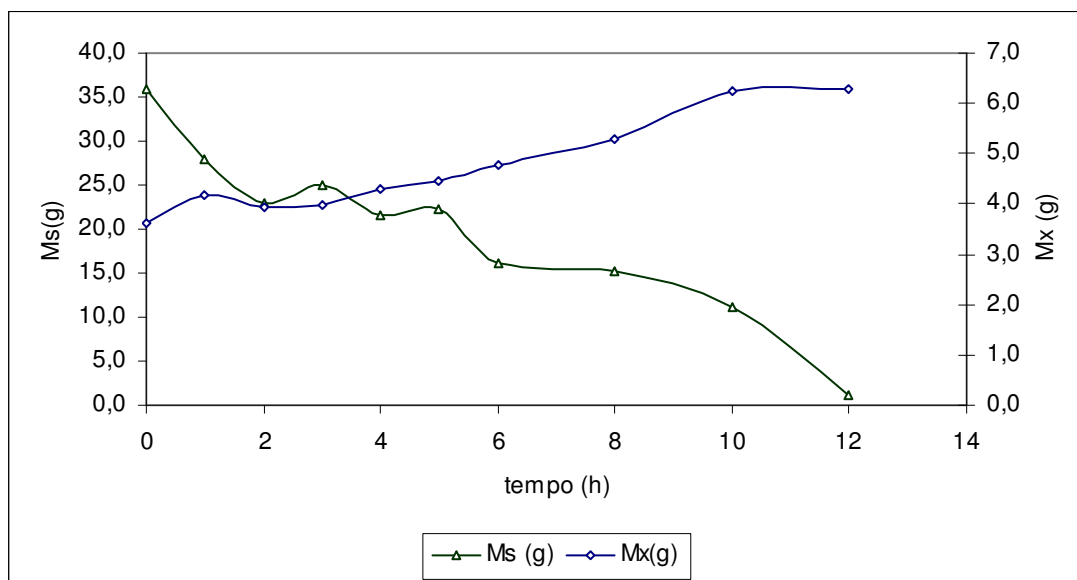


Figura 5.80: Variação da Massa Celular (M_x) e Massa de Glicose (M_s) em função do tempo (t) no Ensaio A-10

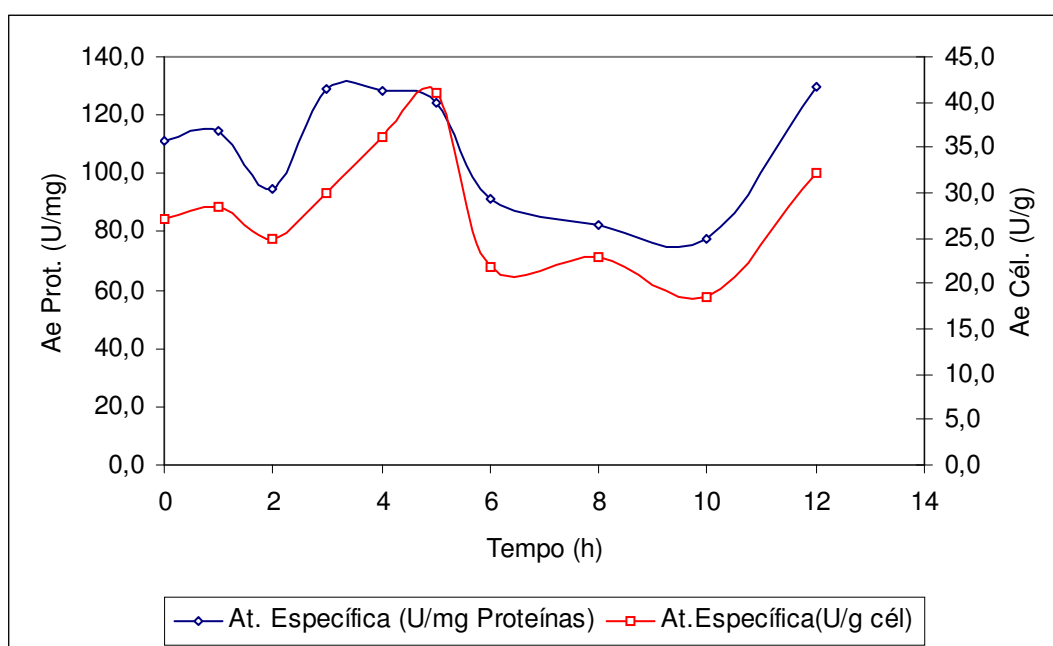


Figura 5.81: Variação da Atividade Específica Celular ($Ae_{cél}$) e da Atividade Específica Protéica (Ae_{Prot}) no Ensaio A-10

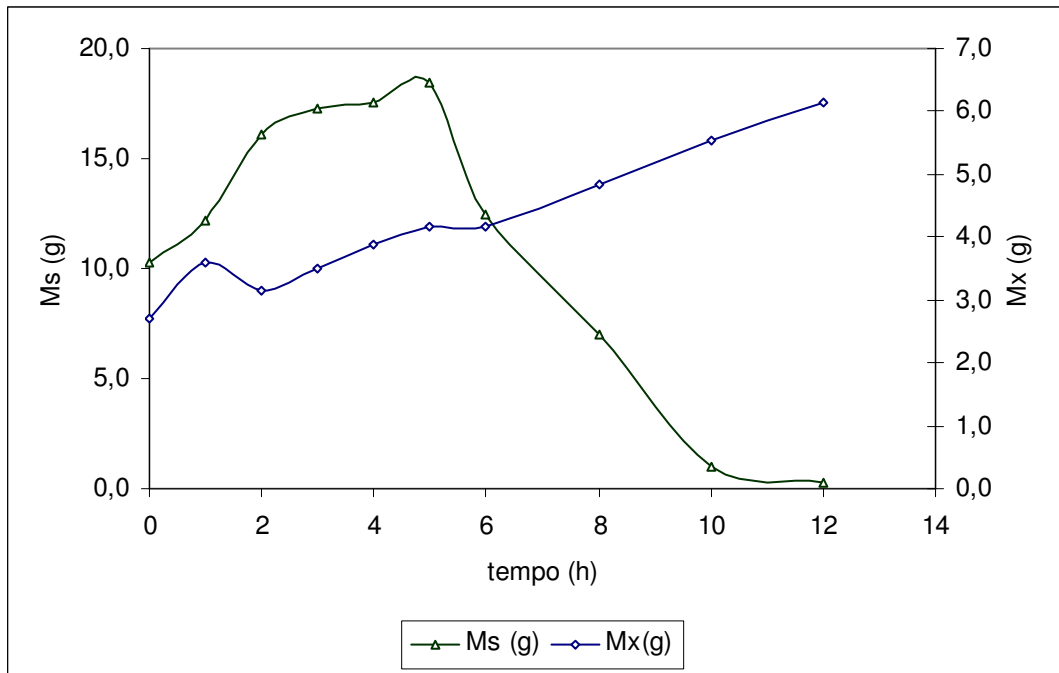


Figura 5.82: Variação da Massa Celular (Mx) e Massa de Glicose (Ms) em função do tempo (t) no Ensaio A-11

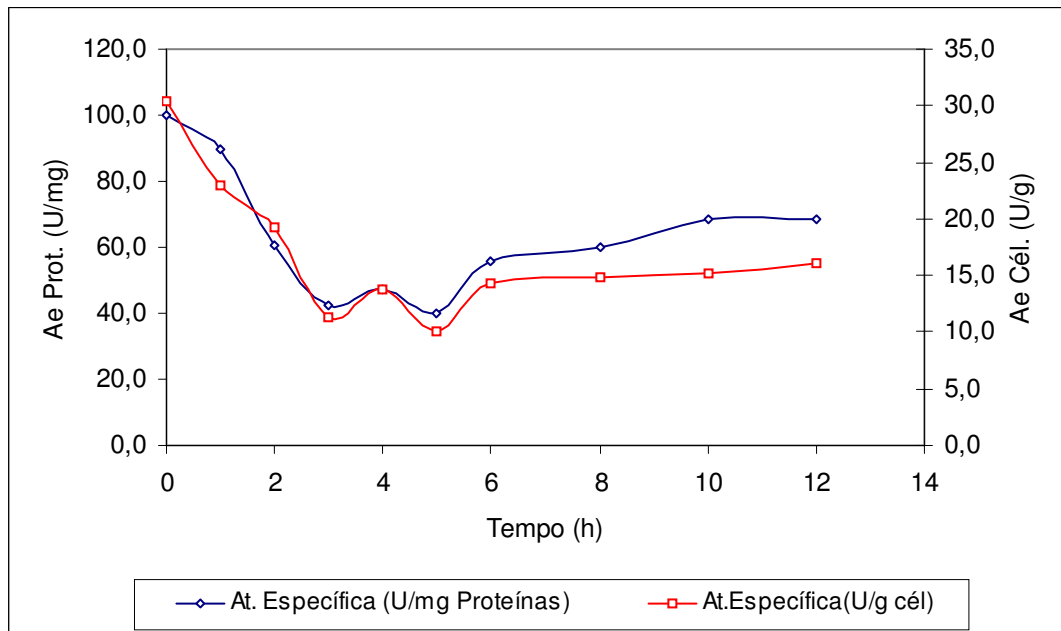


Figura 5.83: Variação da Atividade Específica Celular (Ae_{cel}) e da Atividade Específica Protéica (Ae_{Prot}) no Ensaio A-11

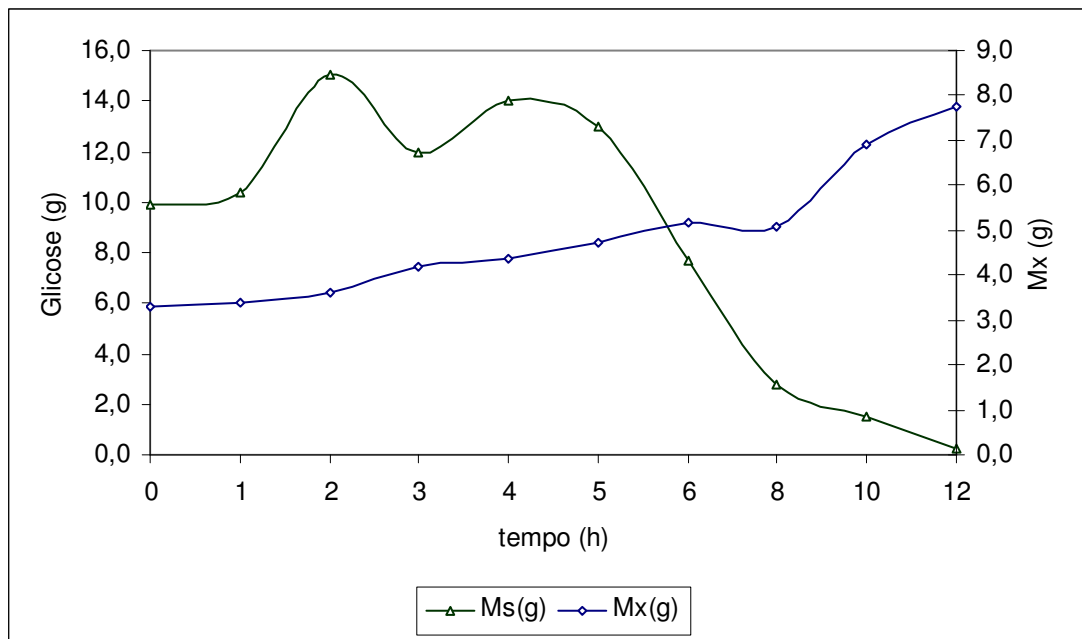


Figura 5.84: Variação da Massa Celular (Mx) e Massa de Glicose (Ms) em função do tempo (t) no Ensaio A-12

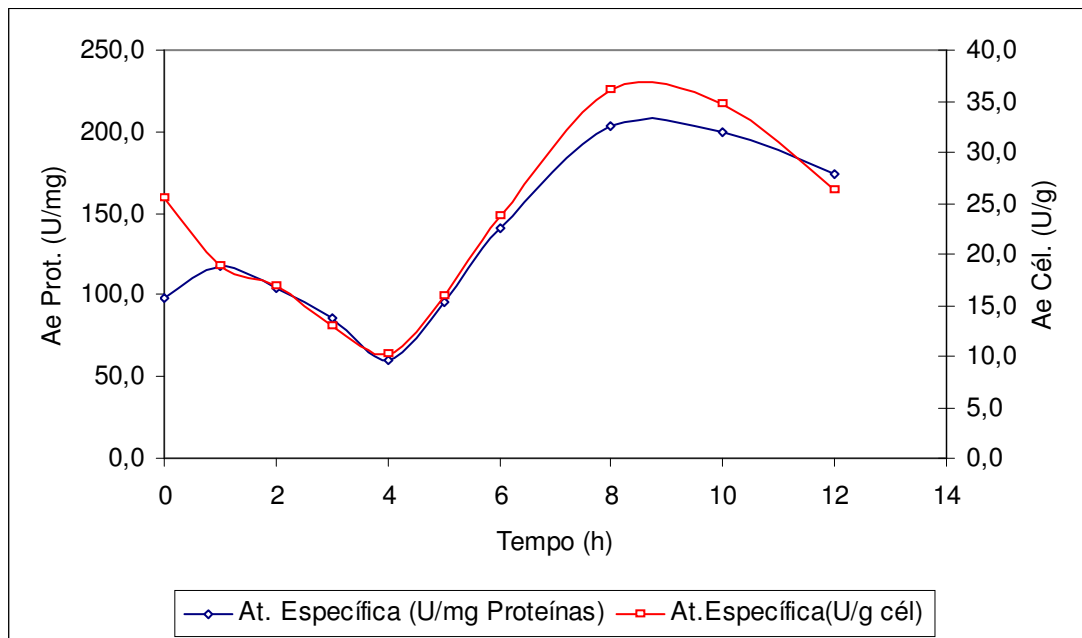


Figura 5.85: Variação da Atividade Específica Celular (Ae_{cel}) e da Atividade Específica Protéica (Ae_{Prot}) no Ensaio A-12

Conclui-se que é uma característica dos ensaios com alimentações de

volumes crescentes, o aumento no nível de gemulação das células durante a alimentação.

Segundo discussão feita anteriormente, a maior produção de G6PDH é alcançada na fase exponencial de crescimento celular. Tendo em vista este dado, conclui-se que uma maior produção de G6PDH seria alcançada com um prolongamento da fase exponencial de crescimento.

Uma das formas de se manter o microrganismo na fase exponencial de crescimento seria alimentar a Dorna com as quantidades de nutrientes necessários para a manutenção dos valores de μ e μ_S obtidos nesta fase em cultivo descontínuo.

Segundo trabalhos anteriores (ZANÃO, 2001; GARCIA, 1999), é possível se efetuar a alimentação após se atingir um determinado valor de μ e μ_S , alcançados em um cultivo preliminar descontínuo. A alimentação só ocorreria após um certo período de cultivo descontínuo de forma a prolongar o tempo de cultivo na fase exponencial. Levando-se em conta os resultados apresentados neste trabalho, justifica-se que, em trabalhos posteriores, utilize-se deste tipo de cultivo descontínuo-alimentado, onde a alimentação deixaria de ocorrer no início e passaria a ocorrer durante a fase exponencial de crescimento.

Com base nos dados apresentados nas tabelas do APÊNDICE VI de velocidade específica de crescimento celular, consumo de substrato e biossíntese de G6PDH concluiu-se que em cada tipo de alimentação e nutriente alimentado, o comportamento do microrganismo durante a alimentação foi característico para esta situação.

5.2.2. Discussão dos perfis das curvas de velocidades específicas de Crescimento Celular, Consumo de Substrato e Produção de G6PDH.

5.2.2.1. Ensaio utilizando vazão constante:

Os perfis de curva apresentados nos gráficos 5.85 e 5.86 indicaram que ao alimentarmos com glicose, tivemos acoplamento parcial entre

crescimento celular e biossíntese de G6PDH, acoplamento total entre crescimento celular e consumo de glicose e acoplamento total entre consumo de glicose e biossíntese de G6PDH.

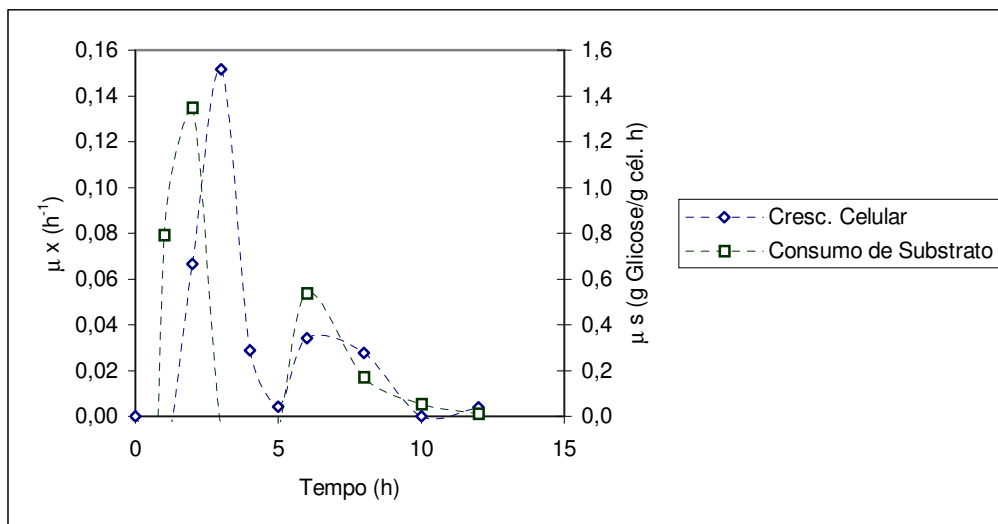


Figura 5.86: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Consumo de Substrato (μ_s) no tempo no Ensaio A-1

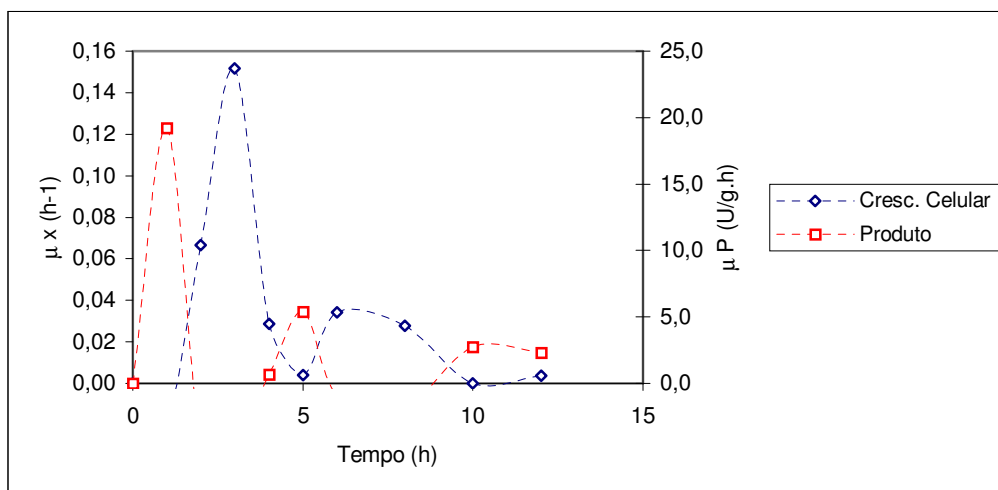


Figura 5.87: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Produção de G6PDH (μ_P) no tempo no Ensaio A-1

Para a alimentação com micronutrientes (A-2), verificou-se acoplamento total entre os três perfis de curva, indicando que a glicose metabolizada estava sendo utilizada parte para o crescimento celular e parte para a

biossíntese de G6PDH, o que pode ser observado pelos perfis de curvas dos gráficos 5.87 e 5.88.

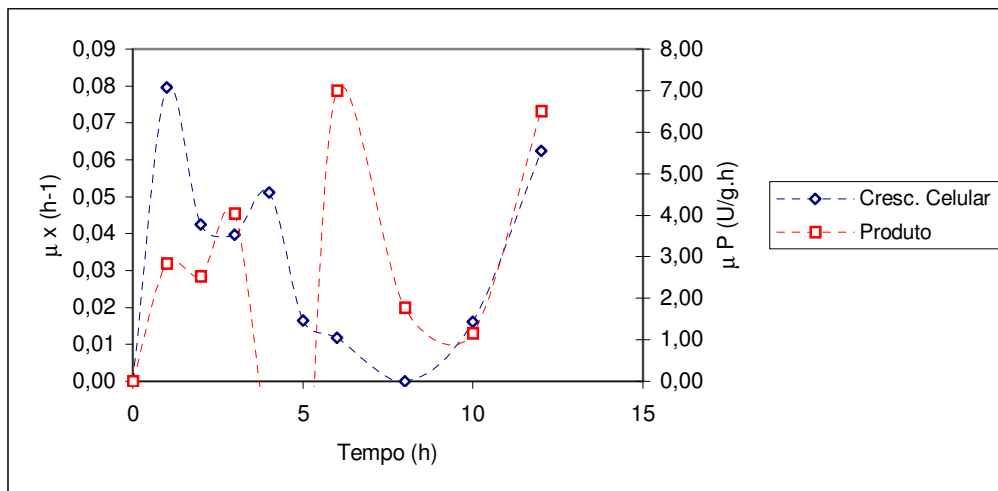


Figura 5.88: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Produção de G6PDH (μ_P) no tempo no Ensaio A-2

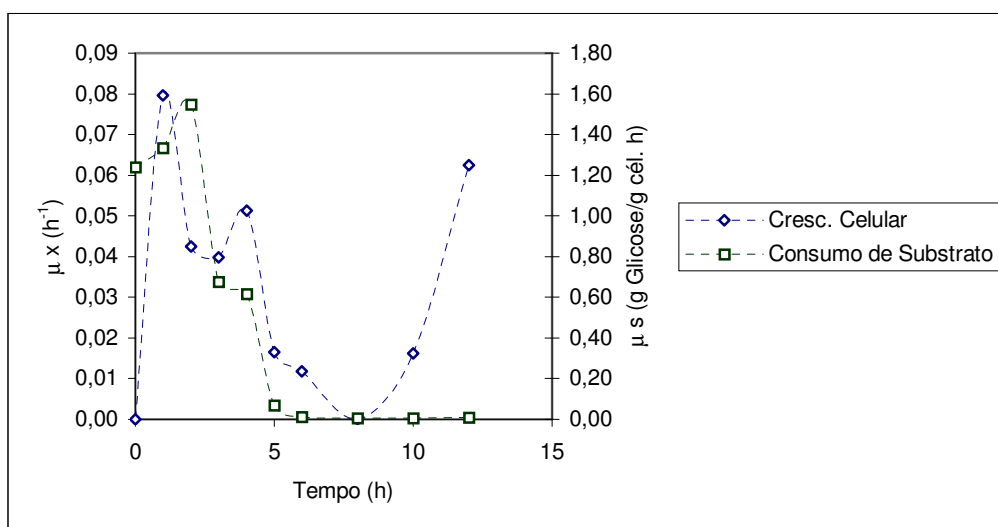


Figura 5.89: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Consumo de Substrato (μ_s) no tempo no Ensaio A-2

5.2.2.2. Ensaios utilizando vazão linear decrescente:

Para os cultivos em pulso linear decrescente alimentando com Glicose (A-3) verificou-se existência de acoplamento parcial entre crescimento celular, consumo de glicose e biossíntese de G6PDH.

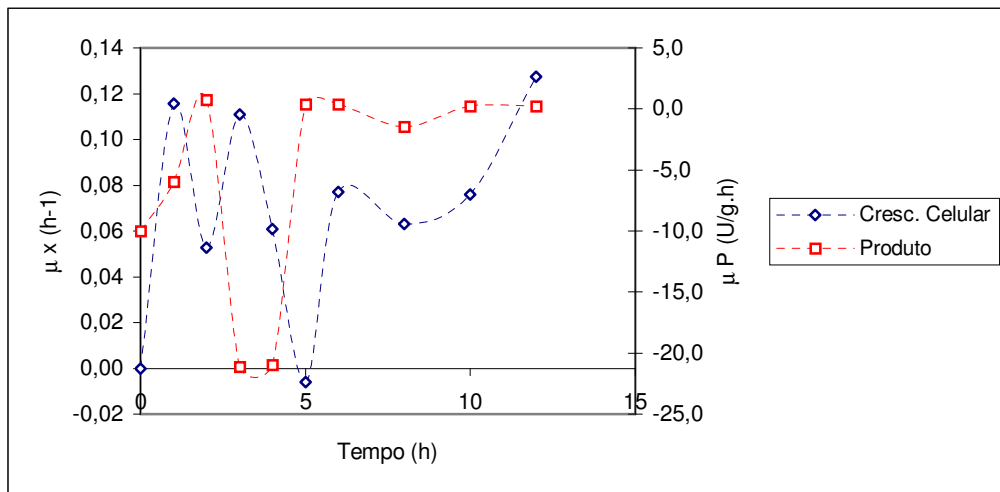


Figura 5.90: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Produção de G6PDH (μ_P) no tempo no Ensaio A-3

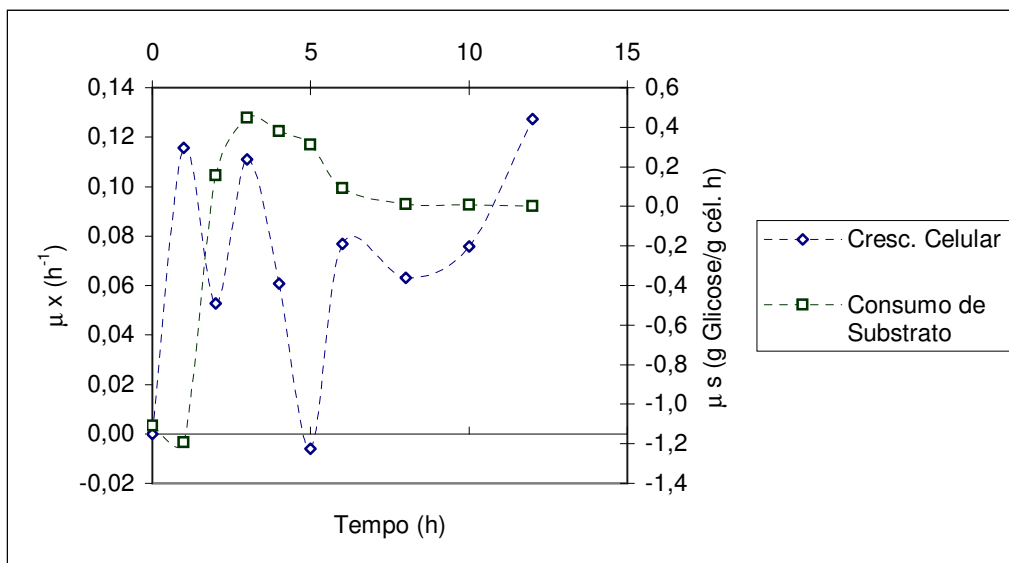


Figura 5.91: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Consumo de Substrato (μ_s) no tempo no Ensaio A-3

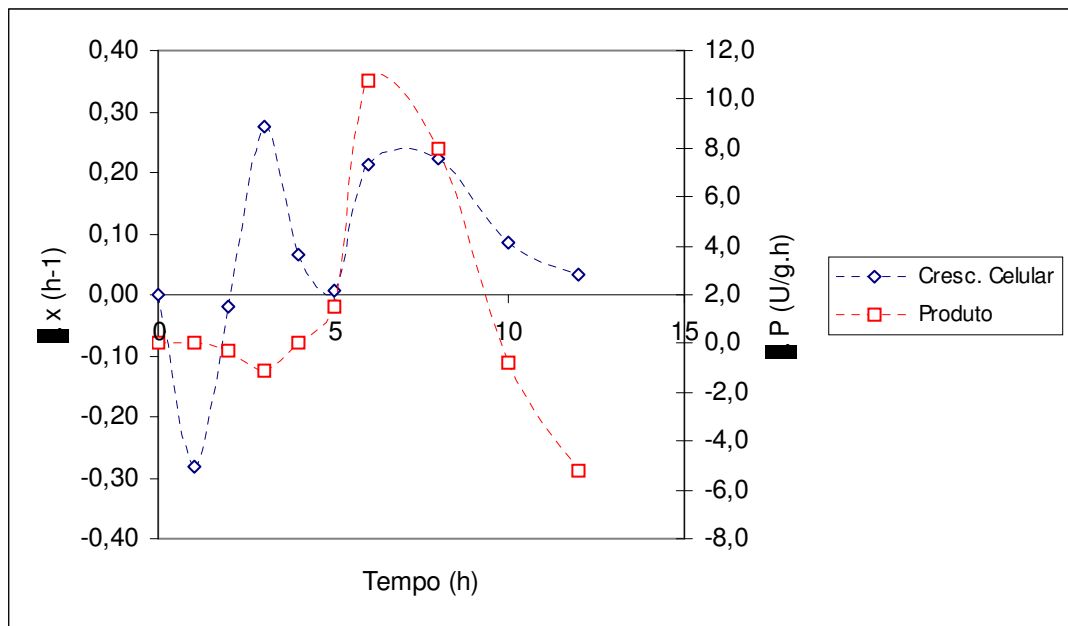


Figura 5.92: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Produção de G6PDH (μ_P) no tempo no Ensaio A-4

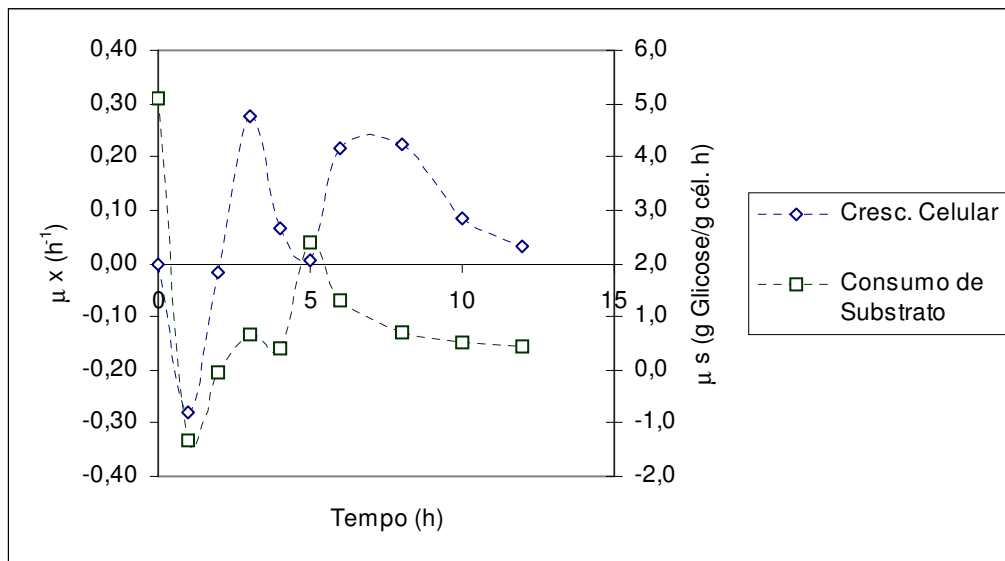


Figura 5.93: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Consumo de Substrato (μ_s) no tempo no Ensaio A-4

Quando alimentamos com micronutrientes (A-4) ocorreu desacoplamento entre crescimento celular e biossíntese de G6PDH, acoplamento entre consumo de glicose e crescimento celular e desacoplamento entre consumo de glicose e biossíntese de G6PDH. Observou-se, também, que no ensaio

linear decrescente alimentado com micronutrientes e o alimentado com glicose, a velocidade específica de biossíntese de G6PDH foi praticamente nula durante todo o período de enchimento.

5.2.2.3. Ensaios utilizando vazão linear crescente:

Para os cultivos em pulso linear crescente, verificou-se que quando da alimentação com glicose (A-5) ocorre acoplamento entre crescimento celular e biossíntese de G6PDH, mas ocorre desacoplamento entre crescimento celular e consumo de substrato e consumo de substrato e biossíntese de G6PDH. Porém, a velocidade específica de biossíntese de G6PDH neste cultivo apresentou valores bem maiores que nas demais alimentações indicando que houve formação de G6PDH durante a alimentação.

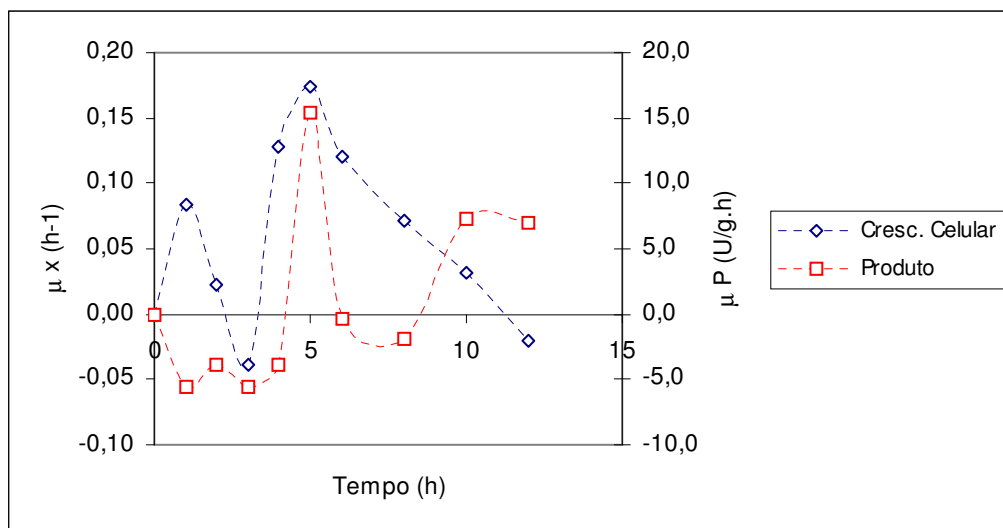


Figura 5.94: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Produção de G6PDH (μ_P) no tempo no Ensaio A-5

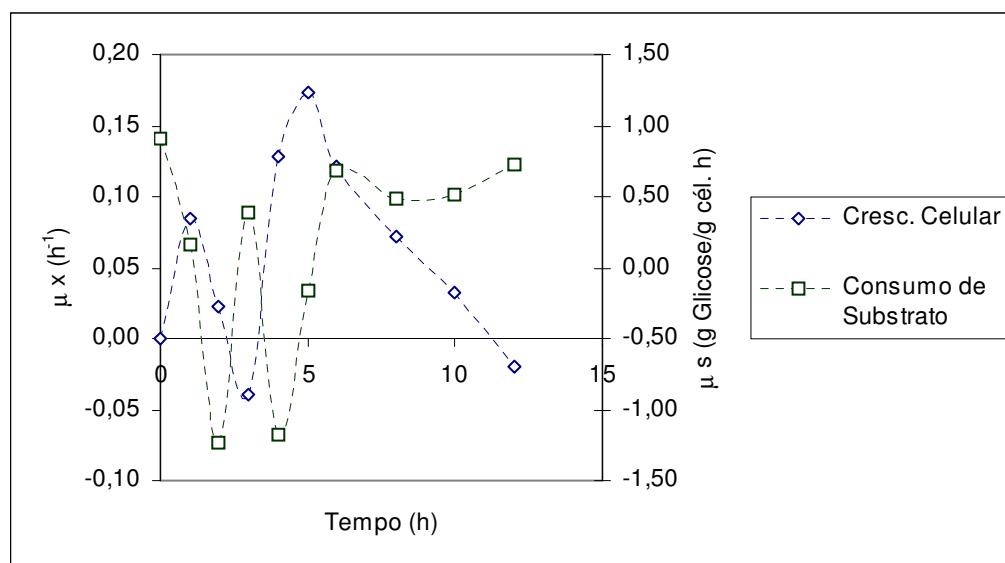


Figura 5.95: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Consumo de Substrato (μ_s) no tempo no Ensaio A-5

Quando se utilizaram micronutrientes para a alimentação (A-6), verificou-se acoplamento parcial entre os três perfis de curva e formação de G6PDH durante o período de alimentação.

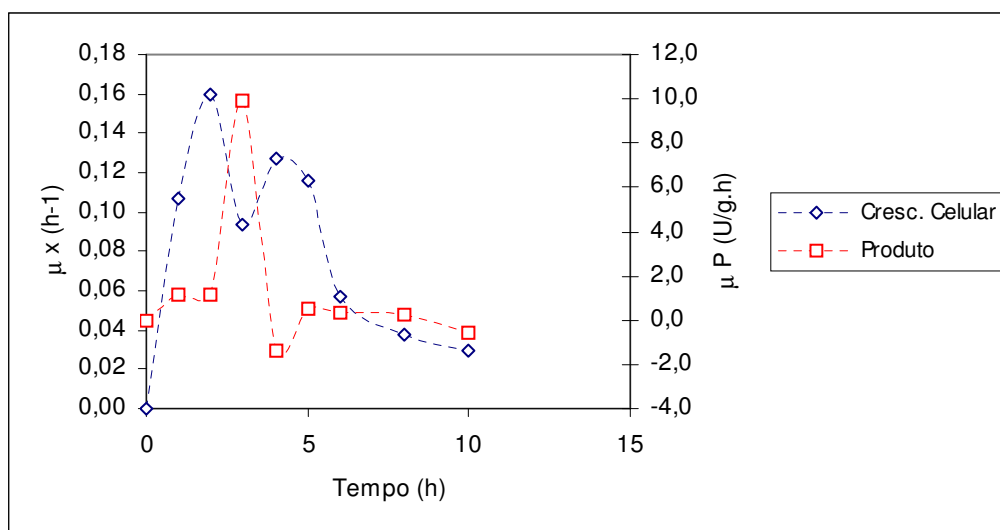


Figura 5.96: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Produção de G6PDH (μ_P) no tempo no Ensaio A-6

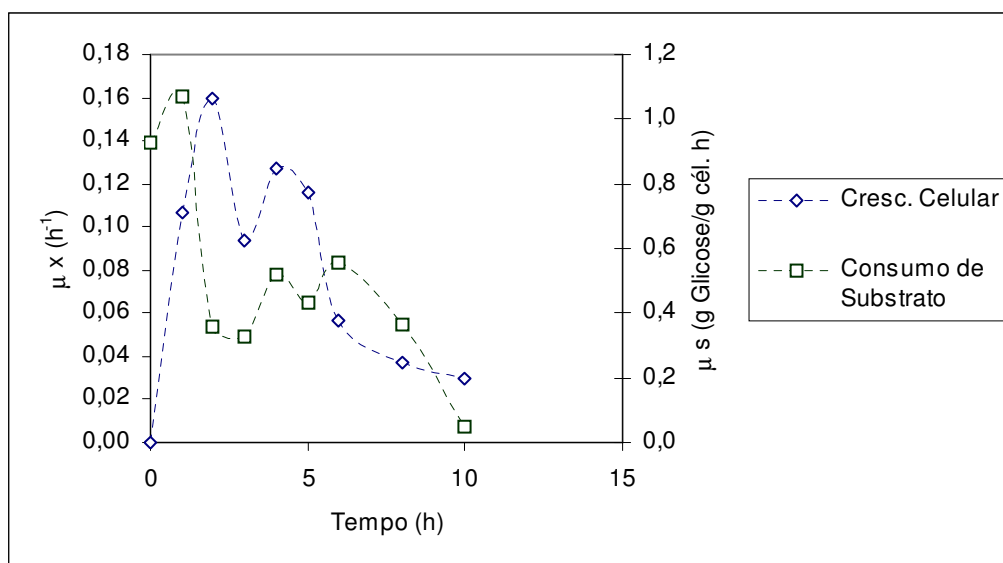


Figura 5.97: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Consumo de Substrato (μ_s) no tempo no Ensaio A-6

5.2.2.4. Ensaios utilizando vazão exponencial decrescente:

Para os cultivos em pulso exponencial decrescente, verificou-se que quando da alimentação com glicose (A-7) ocorreu desacoplamento entre crescimento celular e biossíntese de G6PDH, acoplamento entre crescimento celular e consumo de glicose e desacoplamento entre consumo de glicose e biossíntese de G6PDH. O resultado indica que houve elevado crescimento celular e consumo de substrato, porém, durante o tempo de alimentação, a velocidade específica de biossíntese de G6PDH não se manteve constante durante este período. Houve formação de G6PDH durante a alimentação, porém, não de forma constante.

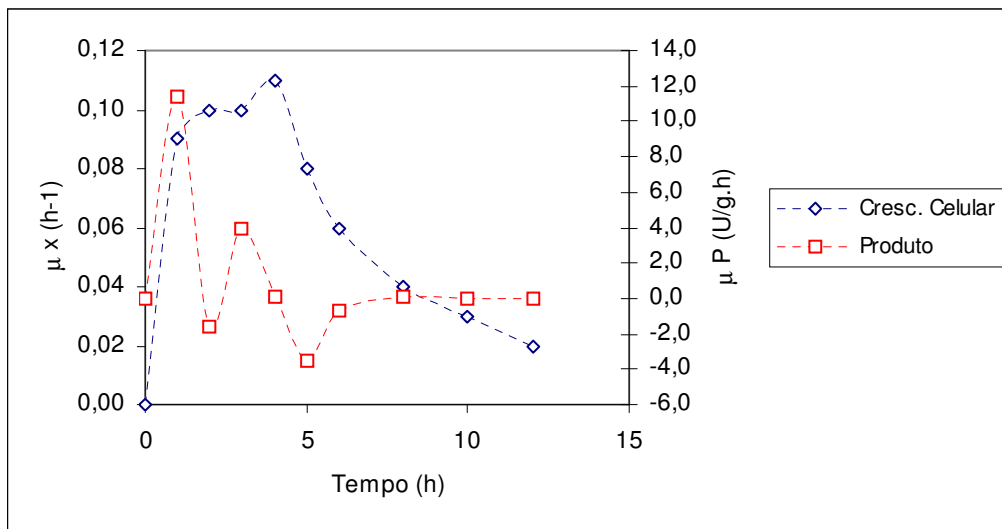


Figura 5.98: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Produção de G6PDH (μ_P) no tempo no Ensaio A-7

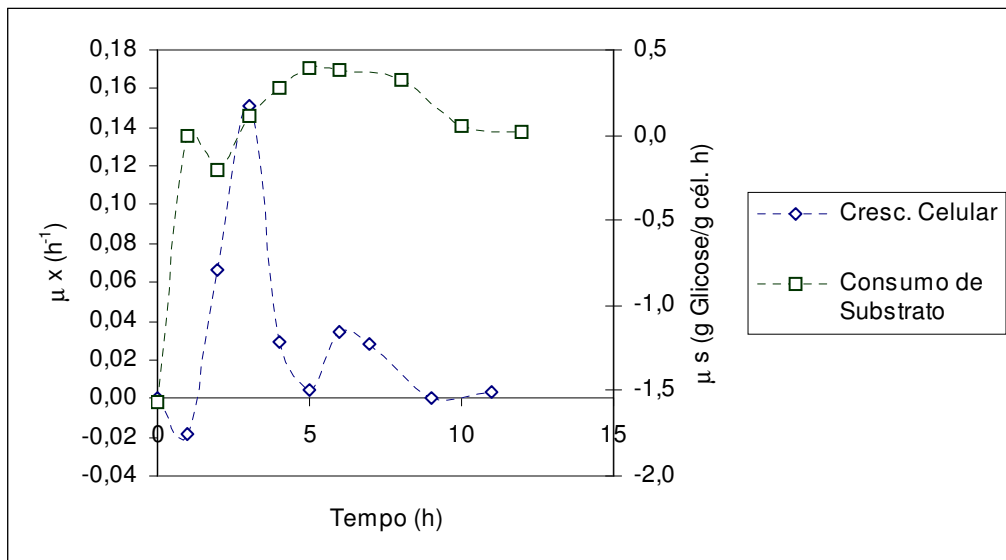


Figura 5.99: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Consumo de Substrato (μ_s) no tempo no Ensaio A-7

Quando da alimentação com micronutrientes (A-8), verificou-se acoplamento parcial entre crescimento celular e biossíntese de G6PDH, acoplamento entre crescimento celular e consumo de substrato e acoplamento entre consumo de substrato e biossíntese de G6PDH. Durante

o período de alimentação as velocidades específicas de biossínteses de G6PDH foram nulas, indicando que durante a alimentação não houve formação de G6PDH.

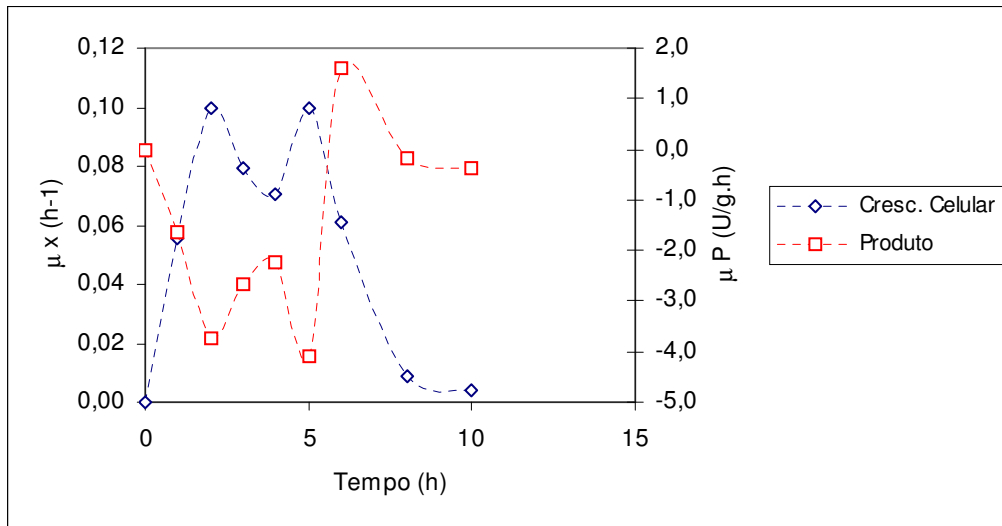


Figura 5.100: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Produção de G6PDH (μ_P) no tempo no Ensaio A-8

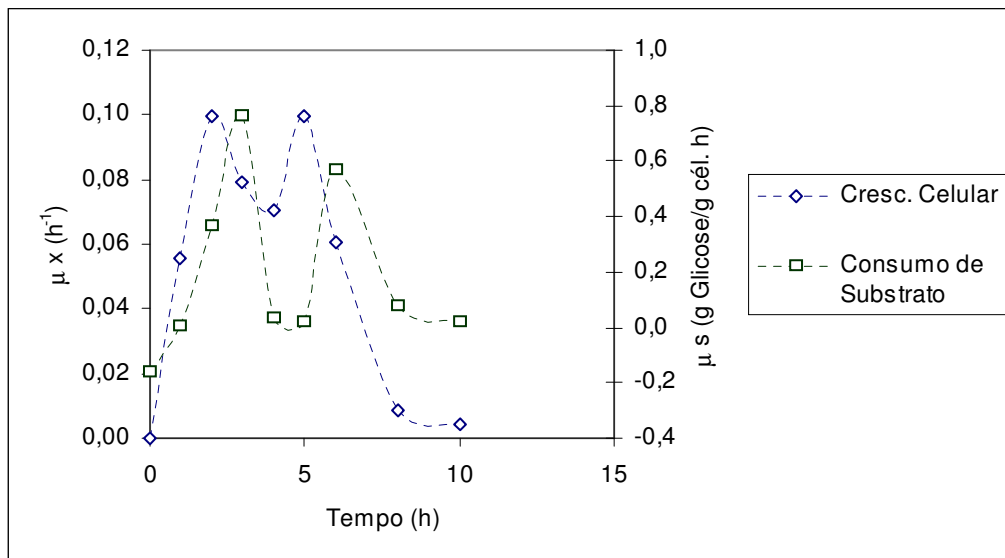


Figura 5.101: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Consumo de Substrato (μ_s) no tempo no Ensaio A-8

5.2.2.5. Ensaio utilizando vazão exponencial crescente:

Para os cultivos em pulso exponencial crescente, verificou-se que quando da alimentação com Glicose (A-9) ocorreu desacoplamento entre crescimento celular e a biossíntese de G6PDH até 2h de ensaio e, posteriormente, as curvas passaram a adquirir perfis semelhantes, indicando acoplamento entre crescimento celular e biossíntese de G6PDH. Verificou-se acoplamento parcial entre consumo de Glicose e crescimento celular e entre consumo de substrato e biossíntese de G6PDH. Durante as duas primeiras horas de cultivo, a velocidade específica de crescimento celular e consumo de glicose foi praticamente nula indicando que estávamos diante de uma adaptação do microrganismo à nova condição de meio a que estava sendo exposto, tratando-se de uma fase Lag.

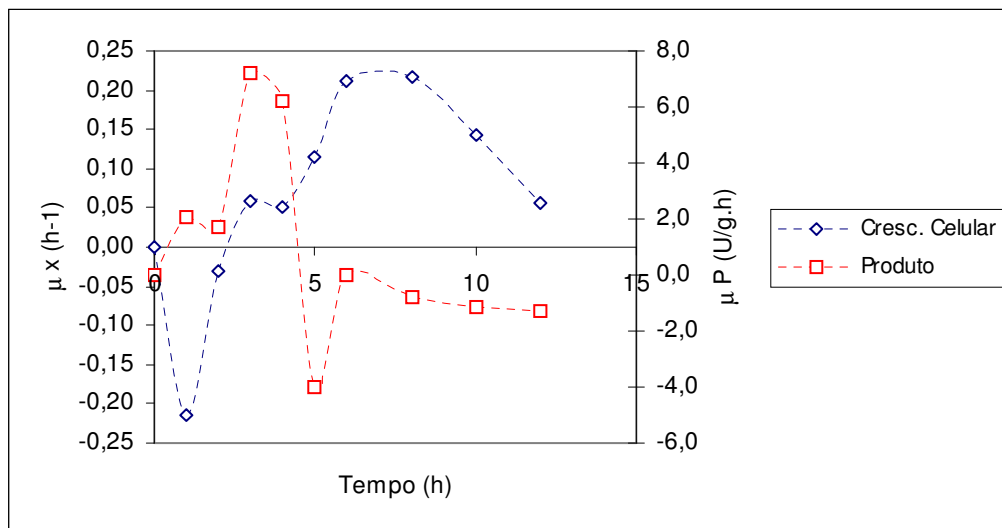


Figura 5.102: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Produção de G6PDH (μ_P) no tempo no Ensaio A-9

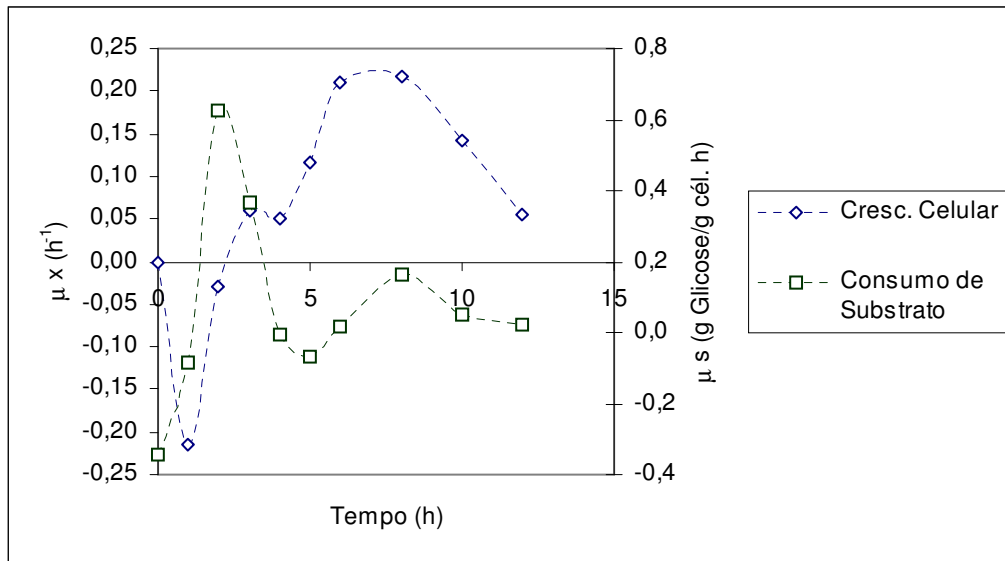


Figura 5.103: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Consumo de Substrato (μ_s) no tempo no Ensaio A-9

Quando da alimentação com micronutrientes, verificou-se acoplamento entre crescimento celular e biossíntese de G6PDH, mas desacoplamento entre crescimento celular e consumo de substrato e entre consumo de substrato e biossíntese de G6PDH. O desacoplamento provavelmente ocorreu devido à presença de grande concentração de Glicose no início do cultivo, podendo ser fator limitante ao crescimento celular. Houve formação de G6PDH após as três primeiras horas de alimentação, ocorrendo o mesmo com o crescimento celular.

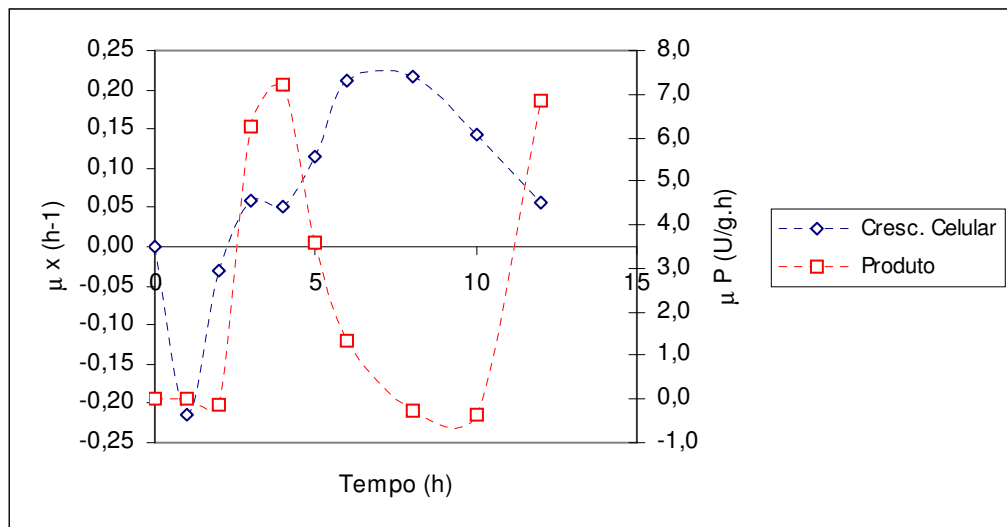


Figura 5.104: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Produção de G6PDH (μ_P) no tempo no Ensaio A-10

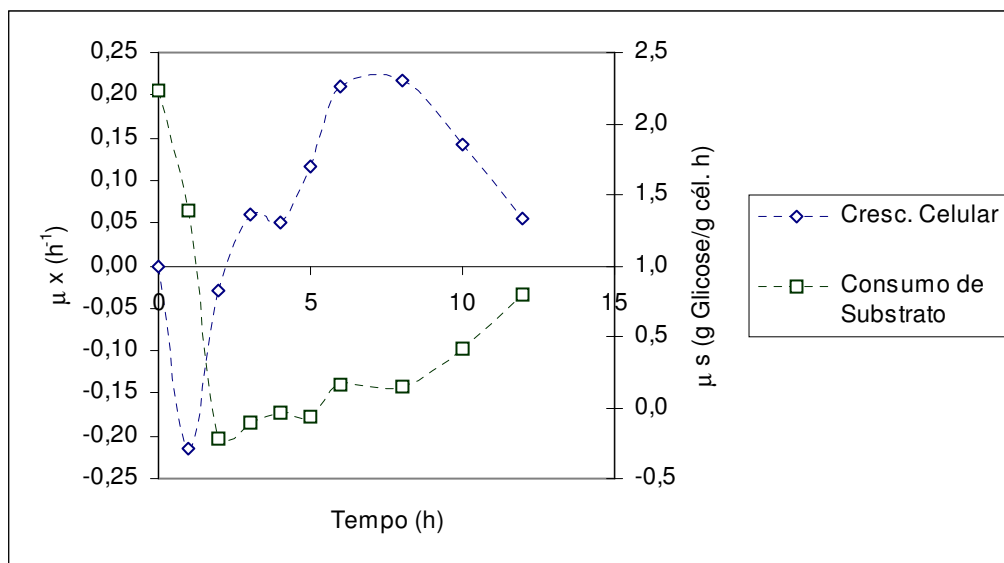


Figura 5.105: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Consumo de Substrato (μ_s) no tempo no Ensaio A-10

Para os ensaios com alimentação com glicose houve formação de G6PDH durante o enchimento nos ensaios com alimentação exponencial crescente, exponencial decrescente e durante as três primeiras horas da alimentação constante.

Para os ensaios com alimentação com micronutrientes houve formação de G6PDH durante o enchimento nos ensaios com alimentação constante, após 3h de alimentação linear crescente e após 3h de alimentação exponencial crescente.

Esse período de 3h para o início da formação de G6PDH nas alimentações exponencial e linear crescente pode ser devido à concentração de micronutrientes no meio. Através do estudo da concentração de micronutrientes efetuada em ensaios descontínuos (item 5.1) , foi verificado que concentrações de 10mg/L de micronutrientes já resulta em baixo crescimento celular e na não formação de G6PDH pela célula. Sendo assim, a única forma de se utilizar a alimentação com micronutrientes é garantindo a concentração mínima necessária de micronutrientes (20mg/L) no meio desde o início da alimentação. Tanto no ensaio linear crescente, quando no ensaio exponencial crescente, o mais provável é que esta concentração tenha sido atingida somente após três horas de cultivo.

Conclui-se que a alimentação com pulso linear parece ser a menos indicada quando se tem interesse na obtenção de G6PDH durante a fase de alimentação do cultivo e que a alimentação com pulso exponencial seria o mais indicado para esta situação pois resulta em perfis de curvas mais acoplados entre si fazendo com que a glicose esteja sendo consumida para o crescimento celular e para a biossíntese de G6PDH.

5.2.2.6. Ensaio variando o nutriente alimentado:

Ao analisarmos os ensaios quanto ao tipo de nutriente alimentado, quando da utilização de alimentação com todos os componentes do meio de cultivo (A-11), houve acoplamento entre os três perfis de curva, porém, durante a alimentação, as velocidades de consumo de substrato foram negativas e as de crescimento celular só passaram a ser positivas após três horas de cultivo.

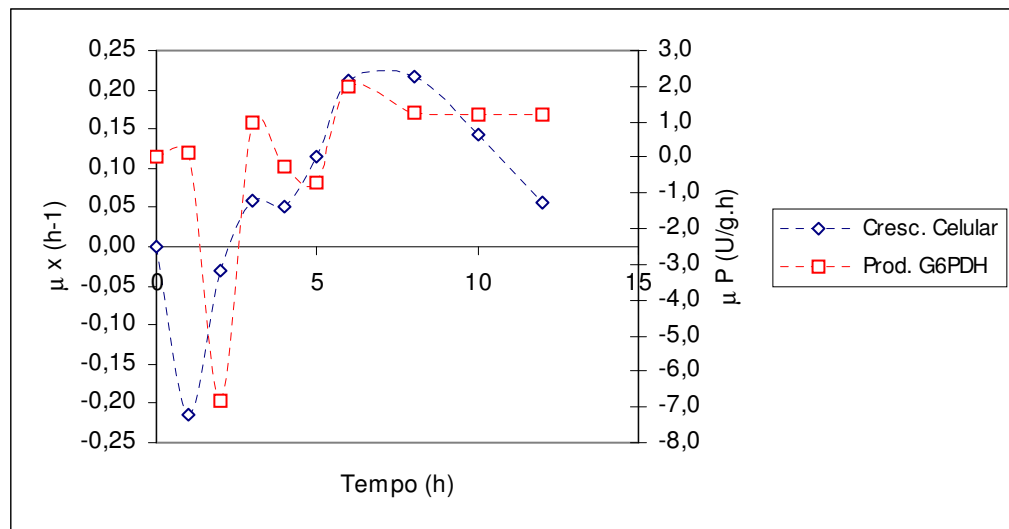


Figura 5.106: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Produção de G6PDH (μ_P) no tempo no Ensaio A-11

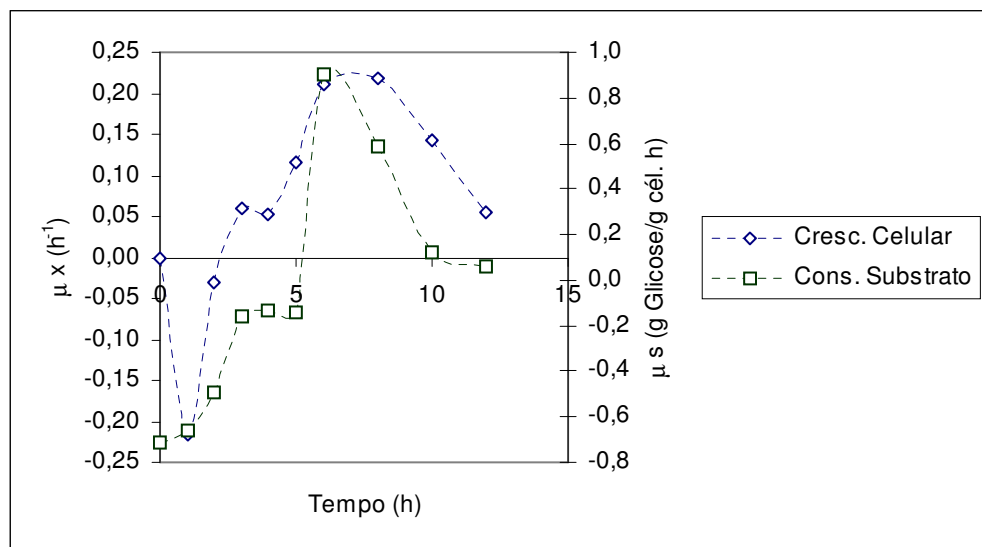


Figura 5.107: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Consumo de Substrato (μ_s) no tempo no Ensaio A-11

No ensaio utilizando apenas a Glicose e o YNB (A-12) observou-se desacoplamento entre os três perfis de curva, onde as velocidades específicas para os três parâmetros só passaram a ser positiva após o término do período de enchimento.

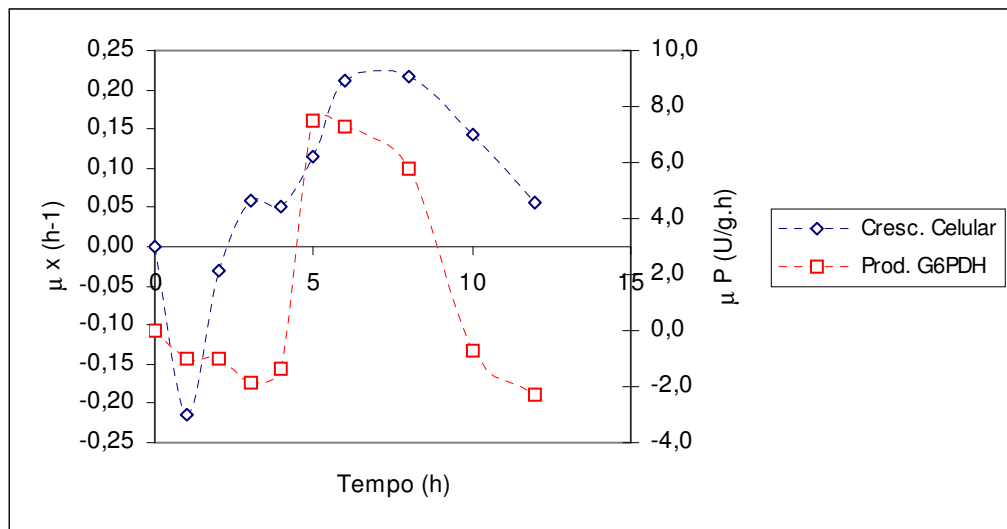


Figura 5.108: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Produção de G6PDH (μ_P) no tempo no Ensaio A-12

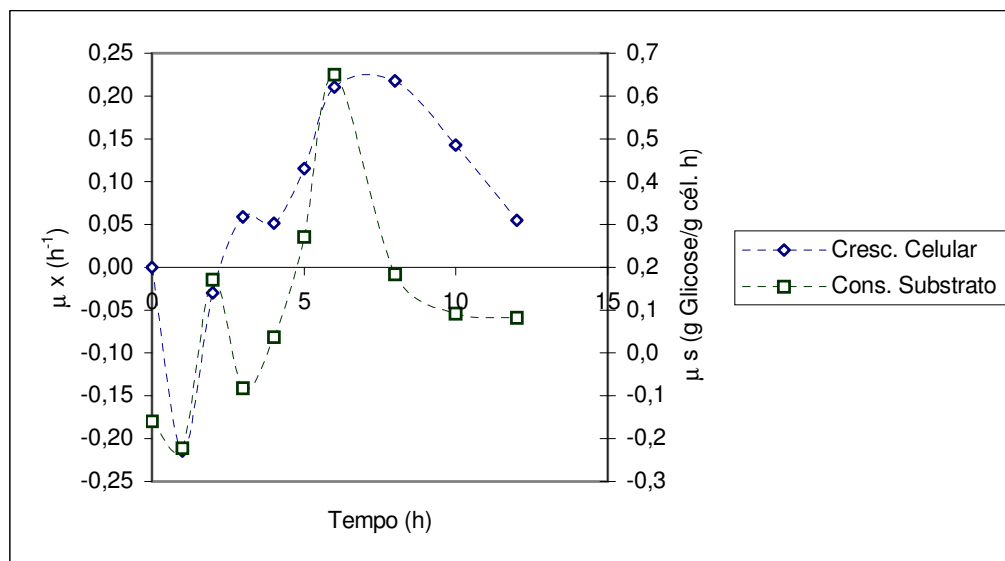


Figura 5.109: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Consumo de Substrato (μ_s) no tempo no Ensaio A-12

No ensaio utilizando Glicose e Micronutrientes (A-13) observou-se acoplamento entre crescimento celular e biossíntese de G6PDH após 2h de alimentação, período em que começaram a surgir velocidades específicas positivas para o crescimento celular e para a biossíntese de G6PDH. Houve desacoplamento entre crescimento celular e consumo de glicose até três

horas de alimentação, seguido por um acoplamento que se seguiu após o término da fase de alimentação da dorna. Nota-se acoplamento parcial entre consumo de glicose e biossíntese de G6PDH após três horas de alimentação.

Os resultados obtidos nos ensaios onde se acoplou a alimentação com micronutrientes com a alimentação de outros componentes do meio reforçaram a idéia de que o microrganismo necessita de uma concentração mínima de micronutrientes disponível para que ele possa iniciar a biossíntese da G6PDH, uma vez que na maior parte dos ensaios utilizando micronutrientes sendo alimentados, foi necessário um período de três horas para que a produção de G6PDH tivesse início

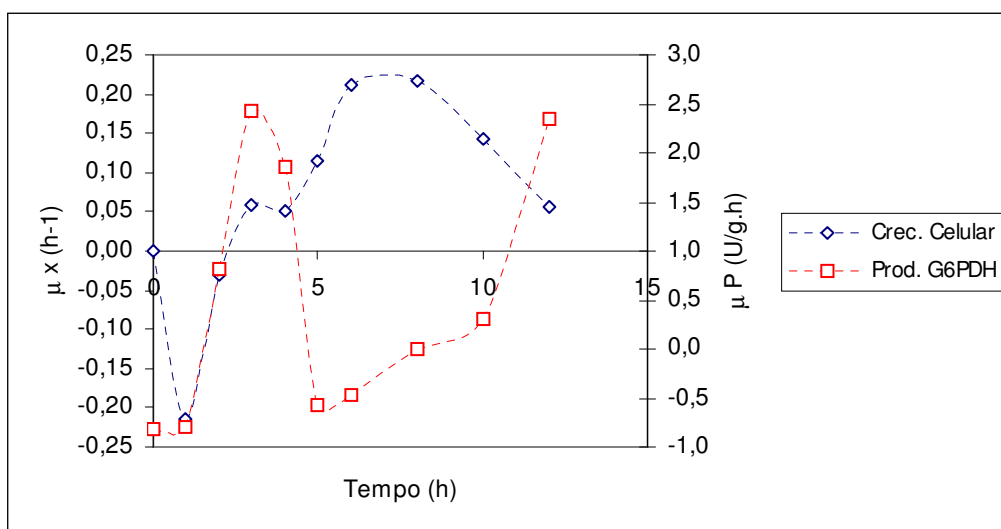


Figura 5.110: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Produção de G6PDH (μ_P) no tempo no Ensaio A-13

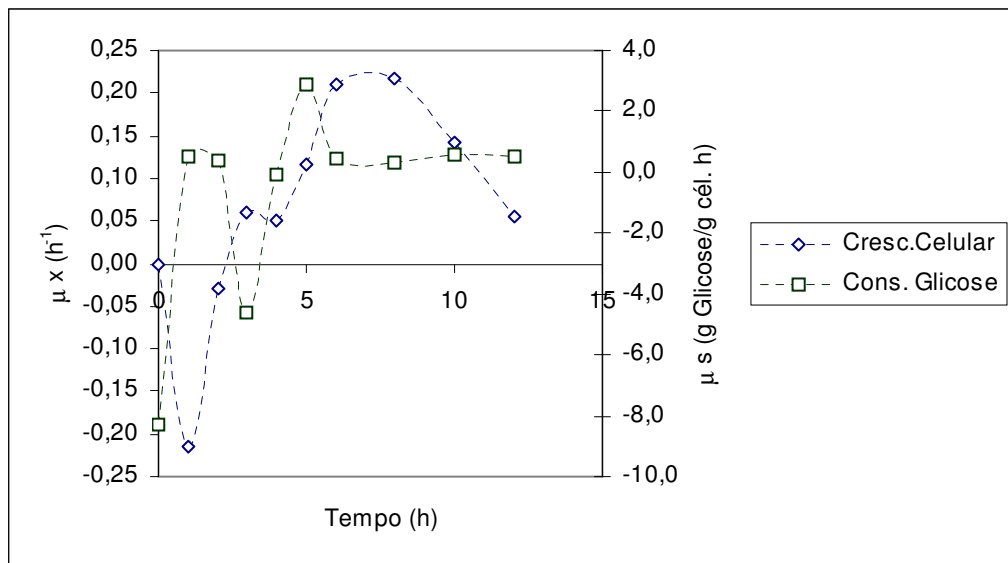


Figura 5.111: Variação da Velocidade Específica de Crescimento Celular (μ) e de Consumo de Substrato (μ_s) no tempo no Ensaio A-13

