

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

Utilizou-se uma cepa da levedura *Saccharomices cerevisiae* geneticamente modificada, a qual contém o plasmídeo YEpPGK-G6PD, construído a partir do vetor Yeplac181 e que foi utilizado para a expressão da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase na levedura sob o controle do promotor PGK1 (fosfogliceratoquinase 1). A modificação genética desta cepa está descrita em LOJUDICE *et al.*, 2001. O plasmídeo YEpPGK-G6PD contém o marcador genético LEU2 e foi inserido nas células de levedura utilizando-se o método de acetato de lítio (SHERMAN *et al.*, 1986). Nesta cepa foi suprimido o gene que codifica a enzima ADE13 utilizada pelo microrganismo durante a via de síntese de Adenina. A ausência desta enzima promove um acúmulo de precursores durante a síntese deste nucleotídeo pelo microrganismo, conferindo à célula uma coloração rósea característica. A inserção do gene de expressão de Leucina teve como objetivo garantir a manutenção do plasmídeo no interior da célula em meios ausentes deste aminoácido. As cepas de levedura foram mantidas em placas de Petri contendo o seguinte meio de cultura :

Tabela 4.1: Meio de Cultura para manutenção das cepas de *S.cerevisiae* W303-181.

Componentes do Meio de Cultura	Concentração (g/L)
Glicose (SIGMA [®] - G7528)	20,0
Yeast Nitrogen Base (DIFCO [®] – 0392)	7,4
Agar Nutriente	15,0
L-Histidina (SIGMA [®] - H9511)	0,02
L-Triptofano (SIGMA [®] - T0254)	0,02
Uracila (SIGMA [®] - U0750)	0,02
Adenina (SIGMA [®] - A3159)	0,02

A escolha do meio de manutenção segue o descrito por SHERMAN *et al.* (1986). À placa de Petri contendo o meio de manutenção era aplicado um teste de esterilidade de 24h em estufa à 30° C para que se observasse a existência de eventual contaminação nas placas antes do repique. Foram efetuados repiques mensais para a manutenção da cepa e, em seguida ao repique, as cepas foram incubadas em estufa à 30° C por 48 horas. As placas repicadas foram conservadas em geladeira à 4° C para posterior utilização.

4.2. Esterilização

Todos os materiais e meios de cultivo utilizados nos ensaios foram autoclavados por 25 min, à 121° C.

4.3. Transferência da cepa para Tubos Inclinados

A cada ensaio em Fermentador foram utilizados 32 tubos de agar inclinado contendo *Saccharomyces cerevisiae* W303-181. Cada tubo continha cerca de 8mL do meio de manutenção descrito na Tabela 4.1. A transferência da cepa das placas de Petri para os tubos inclinados era efetuada na semana em que seria realizado o ensaio de forma que a cepa estivesse sempre em meio recém preparado. Esta transferência era feita em Fluxo Laminar através de repique utilizando alça de Platina adequada. Após o repique, os tubos inclinados eram mantidos em estufa, à 30° C, por 48h, tempo necessário para que ocorresse o crescimento adequado da cepa.

4.4. Cultivo do Pré-Inóculo

As escolhas do meio de cultura do pré-inóculo e inóculo foram definidas a partir do descrito por ROSSI (2002). Cada tubo contendo 5 mL de meio de cultura (Tabela 4.2) acondicionava a massa celular proveniente de dois tubos inclinados repicados. As células eram retiradas dos tubos de manutenção por lavagem superficial do Agar inclinado conforme método descrito por SILVA (2000). Os tubos de pré-inóculo eram, então, levados à estufa e mantidos à 30° C por 24h.

A cada ensaio em Fermentador foram utilizados 16 tubos contendo 10 mL de meio de cultura descrito na Tabela 4.2, a seguir:

Tabela 4.2: Meio de Cultura para cultivo do Pré-Inóculo das cepas de *S.cerevisiae* W303-181.

Componentes do Meio de Cultura	Concentração (g/L)
Glicose (SIGMA® - G7528)	20,0
Yeast Nitrogen Base (DIFCO® – 0392)	7,4
L-Histidina (SIGMA® - H9511)	0,02
L-Triptofano (SIGMA® - T0254)	0,02
Uracila (SIGMA® - U0750)	0,02
Adenina (SIGMA® - A3159)	0,02

4.5. Cultivo do Inóculo

A cada ensaio em Fermentador foram utilizados 16 erlenmeyers de 500 mL, cada um contendo 90 mL do meio de cultura já descrito anteriormente na Tabela 4.2. A cada erlenmeyer era adicionado o volume (10mL) correspondente a um tubo de pré-inóculo (item 4.4), perfazendo assim um volume total de 100mL de inóculo por erlenmeyer.

A relação ($V_{\text{Meio}} / V_{\text{Erlenmeyer}}$) utilizada no cultivo do inóculo foi definida, segundo SILVA (2000), como a mais adequada para o crescimento celular. Após a inoculação dos erlenmeyers, os mesmos eram colocados em um agitador rotativo e mantidos a 30° C, sob agitação de 150 rpm, por 18 horas. A temperatura utilizada no cultivo do inóculo foi descrita por ROSSI (2002), enquanto a agitação utilizada foi descrita por SILVA (2000), como os mais indicados para o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em agitador rotativo visando a obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase. O tempo de cultivo do inóculo utilizado foi definido através de estudo realizado durante este trabalho.

4.6. Rompimento das Amostras da Fermentação

O rompimento celular das amostras obtidas foi realizado sob agitação em vórtice, utilizando esferas de vidro (0,5mm de diâmetro) como agente abrasivo, em suspensão celular contendo inibidores de proteases e constituída por: tampão Tris-HCl 50mM pH 7,5, MgCl₂ 5mM, β-Mercaptoetanol 10mM, ácido aminocapróico 2mM, PMSF 1mM e EDTA 0,2mM. As amostras coletadas foram centrifugadas à 4100 rpm por 20 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi separado da massa celular e descartado. A massa celular foi ressuspendida em 5mL de solução tampão contendo os inibidores de proteases. Em seguida, adicionou-se as esferas de vidro de forma que a proporção entre a massa da suspensão celular e a massa de pérolas de vidro utilizada ficasse em 1:300, conforme definido no estudo apresentado no texto ANEXO a esta dissertação. O tempo de rompimento utilizado foi de 12 minutos e a suspensão foi mantida em banho de gelo (4°C).

Após o rompimento, os fragmentos celulares e as esferas de vidro foram removidas por centrifugação a uma temperatura de 6° C em 4100 rpm por 20 minutos, e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da atividade da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase e Proteínas Totais.

4.7. Processo Fermentativo Descontínuo

4.7.1. Descrição de um Ensaio Descontínuo Típico

Os cultivos foram realizados em um fermentador New Brunswick (mod. MF 105), com dorna de 5L de capacidade nominal e com controles de temperatura, pH, frequência de agitação e vazão de ar. O fermentador foi acoplado a um controlador de oxigênio dissolvido NBS (mod. DO81).

A dorna foi, inicialmente, carregada com 1,4L de mosto e, a seguir, inoculada com 1,6L de inóculo. O elevado volume de inóculo caracterizado pelos ensaios vem de acordo com o interesse de aplicação de reciclo de células no processo descontínuo-alimentado para a produção de G6PDH por esta cepa.

Nos experimentos em aerobiose, borbulhou-se ar no mosto por cerca de 15 min antes de se proceder à inoculação.

A temperatura de cultivo foi controlada a 30° C (ROSSI, 2002) e a agitação foi fixada em 400 rpm (SILVA, 2000). O pH do meio, verificado através de um eletrodo (Mettler Toledo® mod. 405) acoplado à dorna, foi mantido durante todo o processo por adições controladas de NaOH (0,5M) ou H₂SO₄ (0,5M). Durante o cultivo, foi adicionado automaticamente o antiespumante polidimetilsiloxano.

Os ensaios em processo descontínuo visavam a otimização da produção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase através do aumento nos valores dos parâmetros relacionados à produtividade e da redução do tempo de fermentação. Para tanto, foram realizados ensaios onde as variáveis estudadas foram: Relação Carbono-Nitrogênio do meio de cultivo, Aeração, pH, Concentração de Micronutrientes e Concentração de Glicose.

FIGURA 4.3: Foto do Fermentador de bancada tipo New Brunswick (mod. MF 105 – New Brunswick Sc. Co.).



4.7.1.1. Preparo do Meio de Cultivo:

O volume total de meio utilizado para a realização do processo de fermentação foi de 3L, sendo 1,4L constituído de meio de cultivo e 1,6L constituído de inóculo previamente cultivado, em agitador rotativo por 18 horas.

O meio de cultivo (1,4L) foi constituído pelos componentes descritos na Tabela 4.4., a seguir:

Tabela 4.4: Meio de Cultivo utilizado nos Ensaio Descontínuos para cultivo de *S.cerevisiae* W303-181.

Componentes do Meio de Cultura	
Glicose (SIGMA [®] - G7528)	20 g/L ou 10 g/L
Yeast Nitrogen Base (DIFCO [®] – 0392)	7,4 g/L ou 3,35 g/L
L-Histidina (SIGMA [®] - H9511)	20 mg/L ou 10 mg/L
L-Triptofano (SIGMA [®] - T0254)	20 mg/L ou 10 mg/L
Uracila (SIGMA [®] - U0750)	20 mg/L ou 10 mg/L
Adenina (SIGMA [®] - A3159)	20 mg/L ou 10 mg/L

O meio de Yeast Nitrogen Base (DIFCO[®]), segundo descrito pelo catálogo da empresa, continha os componentes descritos na Tabela 4.5, a seguir:

Nos ensaios, considerou-se a Glicose como Fonte de Carbono e o Yeast Nitrogen Base, Triptofano, Histidina, Uracila e Adenina como as Fontes de Nitrogênio do meio.

Tabela 4.5: Componentes do Meio de Yeast Nitrogen Base utilizado no preparo do meio de cultivo de *S.cerevisiae* W303-181.

Componentes do Meio de Cultura Yeast Nitrogen Base	Concentração
Sulfato de Amônio	5,0 g/L
Biotina	2 µg/L
LD-Metionina	20 mg/L
LD-Triptofano	20 mg/L
Pantotenato de Cálcio	400 µg/L
Inositol	2000µg/L
Niacina	400µg/L
Ácido Aminobenzóico	200µg/L
Piridoxina Hidroclorídrica	400µg/L
Riboflavina	200µg/L
Tiamina Hidroclorídrica	400µg/L
Ácido Bórico	500µg/L
Sulfato Cúprico	40µg/L
Iodeto de Potássio	100µg/L
Cloreto de Ferro	200µg/L
Molibdato de Sódio	200µg/L
Sulfato de Zinco	400µg/L
Sulfato de Manganês	400µg/L
Fosfato Monobásico de Potássio	1g/L
Cloreto de Sódio	0,1g/L
Cloreto de Cálcio	0,1g/L
Sulfato de Magnésio	0,5g/L
Ácido Fólico	2 µg/L

4.7.1.2 Coleta de Amostras no decorrer do Ensaio:

No decorrer do processo fermentativo, alíquotas de 20mL de meio fermentado foram retiradas em diferentes intervalos de tempo para análises posteriores. Antes da retirada da amostra, eram coletados 15mL de meio fermentado, que corresponderia ao “Volume Morto” de meio, e que seria o volume de meio que estaria acondicionado no tubo coletor de amostra, o qual, não estaria em contato com as condições de aeração e agitação do restante do meio contido na dorna.

Para cada amostra retirada do fermentador, uma alíquota de 10mL era filtrada através de membrana filtrante (Millipore ®, diâmetro de poro de 0.45 μ). O filtrado era utilizado para a determinação da concentração de Glicose enquanto o resíduo era utilizado para determinar a massa celular seca.

Uma outra alíquota, correspondente a 5mL, era centrifugada a 4100 rpm por 20 minutos. O sobrenadante desta alíquota era descartado e as células centrifugadas eram guardadas sob refrigeração (4°C) até o momento da determinação da atividade enzimática e dosagem de proteínas totais. A dosagem de proteínas totais tinha dois objetivos: acompanhar a atividade específica por miligrama de proteínas de forma complementar à tradicional atividade específica por grama de células e também indicar possíveis alterações metabólicas no microrganismo durante o ensaio e que seriam sentidas com um aumento na produção de proteínas não acompanhado por um aumento na atividade enzimática.

Por último, um volume de amostra de 5mL era mantido sob refrigeração (4°C) para posterior contagem e verificação de viabilidade celular.

4.7.2. Variáveis de Estudo para o Processo Descontínuo

A fim de otimizar a atividade celular do *Saccharomyces cerevisiae* W303-181, as condições de cultivo estudadas foram:

- pH.
- Aeração.

- Relação Carbono-Nitrogênio.
- Concentração de aminoácidos e bases nitrogenadas.
- Concentração de Glicose.

Estas variáveis foram estudadas em um arranjo de 13 ensaios conforme indicado na Tabela 5.1 (pg. 66).

4.7.2.1. Ensaios variando a Relação Carbono – Nitrogênio (C/N)

Foram efetuados dois ensaios em que a variável estudada foi a relação carbono-nitrogênio mantida no sistema. No primeiro ensaio a relação C/N foi igual a 6,7 (g de Carbono/ g de Nitrogênio). O meio de cultivo constituiu-se de 10g/L de Glicose, 3,7g/L de Yeast Nitrogen Base, 20mg/L de Histidina, 20mg/L de Triptofano, 20mg/L de Uracila e 20mg/L de Adenina.

No segundo ensaio realizado utilizou-se uma relação C/N de 3,35 (g de Carbono/ g de Nitrogênio) e foi obtida pela alteração na concentração da Fonte de Carbono do meio. O meio de cultivo constituiu-se de 10g/L de Glicose, 7,4g/L de Yeast Nitrogen Base, 20mg/L de Histidina, 20mg/L de Triptofano, 20mg/L de Uracila e 20mg/L de Adenina. A aeração aplicada nos dois ensaios foi de 1,7 vvm, agitação de 400 rpm, 30° C e pH 5,7.

4.7.2.2. Ensaios variando a Concentração de Micronutrientes

Foram efetuados dois ensaios em que a variável estudada foi a concentração dos micronutrientes no meio de cultivo. Chamaram-se de micronutrientes as bases nitrogenadas (Uracila e Adenina) e os aminoácidos (Triptofano e Histidina) utilizados como fonte complementar no meio de cultivo.

Os ensaios utilizaram um meio constituído de 10g/L de Glicose, 3,7g/L de Yeast Nitrogen Base além dos 4 micronutrientes já mencionados. A aeração aplicada no sistema foi de 1,7 vvm, agitação de 400 rpm, 30° C e pH 5,7.

O primeiro ensaio avaliou a seguinte concentração de micronutrientes: 20mg/L de Histidina, 20mg/L de Triptofano, 20mg/L de Uracila e 20mg/L de Adenina. Esta concentração de micronutrientes foi utilizada em trabalhos

anteriores por LOJUDICE *et al.*(2001) e ROSSI (2002). Ao se utilizar tal concentração de micronutrientes, obtiveram-se os seguintes valores de concentração total de nutrientes: 10g/L de Glicose, 2,74g/L de Sulfato de Amônio, 31mg/L de Histidina, 22mg/L de Metionina, 42mg/L de Triptofano, 20mg/L de Uracila e 20mg/L de Adenina.

O segundo ensaio utilizou a seguinte concentração de micronutrientes: 10mg/L de Histidina, 10mg/L de Triptofano, 10mg/L de Uracila e 10mg/L de Adenina. Tal ensaio visava reduzir à metade a concentração de nutrientes complementares (ou micronutrientes) e teve como resultado a seguinte concentração total de nutrientes: 10g/L de Glicose, 2,74g/L de Sulfato de Amônio, 15,5mg/L de Histidina, 21mg/L de Triptofano, 11mg/L de Metionina, 10mg/L de Uracila e 10mg/L de Adenina. As duas condições mantiveram, praticamente, igual a relação carbono-nitrogênio do meio de forma que a única variável fosse realmente a concentração de Micronutrientes. Sendo assim, foi possível avaliar a influência da concentração das bases nitrogenadas e aminoácidos sobre o tempo de fermentação e sobre a produtividade e rendimento do processo.

4.7.2.3. Ensaio variando a Concentração de Glicose

Foram efetuados dois ensaios em que a variável estudada foi a concentração de Glicose no meio de cultivo. A aeração aplicada no sistema foi de 1,7 vvm, agitação de 400 rpm, 30° C e pH 5,7. A agitação e aeração aplicadas eram resultados do estudo realizado por SILVA (2000) e os valores fixados para temperatura e pH eram resultados do estudo realizado por ROSSI (2002).

O primeiro ensaio utilizou a seguinte concentração de nutrientes no meio de cultivo: 20g/L de Glicose, 7,4g/L de Yeast Nitrogen Base, 20mg/L de Histidina, 20mg/L de Triptofano, 20mg/L de Uracila e 20mg/L de Adenina. Esta condição de cultivo foi utilizada em trabalhos anteriores de LOJUDICE *et al.*(2001) e ROSSI (2002).

O segundo ensaio utilizou a seguinte concentração de nutrientes no meio de cultivo: 10g/L de Glicose, 3,7g/L de Yeast Nitrogen Base, 20mg/L de

Histidina, 20mg/L de Triptofano, 20mg/L de Adenina e 20mg/L de Uracila. As duas condições mantiveram, praticamente, igual a relação carbono-nitrogênio do meio de forma que a única variável fosse realmente a concentração da Fonte de Carbono. Sendo assim, foi possível avaliar a influência da concentração de Glicose sobre o tempo de fermentação e sobre a produtividade e rendimento do processo.

Outros dois ensaios foram efetuados variando-se a concentração de glicose utilizada no mosto, mantendo-se constante o pH (5,7), temperatura (30°C), relação carbono-nitrogênio (6,7g/g), concentração de micronutrientes (20mg/L), agitação (400 rpm) e aeração (0,8vvm). As concentrações de glicose utilizadas foram de 20g/L e 10g/L, de forma que se pudesse avaliar o comportamento do microrganismo diante de baixa aeração e diferentes concentrações de substrato disponível.

4.7.2.4. Ensaio variando Aeração e pH

Foram efetuados oito ensaios em que as variáveis estudadas foram a aeração (concentração de oxigênio) e o pH aplicados durante o cultivo. Este estudo visou a otimização do processo descontínuo e a definição da melhor aeração e pH a serem utilizados para o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 nos futuros ensaios em Processo Descontínuo-Alimentado.

As aerações fixadas para o estudo foram: 0, 0,8 vvm, 1,7 vvm e 2,2 vvm. A escolha dos valores teve como objetivo captar todo o trecho de variação da aeração possível de ser utilizado pelo equipamento, de forma a ter-se cultivos em ambiente microaerado, de baixa aeração, aeração moderada e aeração elevada. Este estudo possibilitou a análise do comportamento do microrganismo e das prováveis alterações em seu metabolismo e atividade celular e enzimática.

Para cada aeração estudada, foram efetuados ensaios em pH 4,6 e pH 5,7. A escolha destes dois valores de pH veio de encontro a dados fornecidos por estudos anteriores, conforme descrito a seguir. O pH 4,6 foi tido, segundo SILVA (2000), como o melhor pH a ser empregado em cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* para a obtenção de Glicose-6-Fosfato

Desidrogenase e Hexoquinase, enquanto que o pH 5,7, segundo ROSSI (2002), teria sido o melhor pH a ser empregado em cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* W303-181 para a obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.

Tendo como base os resultados anteriores obtidos por LOJUDICE *et al.* (2001), todos os ensaios mantiveram o seguinte meio de cultivo: 10g/L de Glicose, 3,7g/L de Yeast Nitrogen Base, 20mg/L de Histidina, 20mg/L de Triptofano, 20mg/L de Uracila e 20mg/L de Adenina. As seguintes condições de cultivo foram mantidas constantes em todos os ensaios: Temperatura (30° C), Agitação (400 rpm), relação carbono-nitrogênio (6,7g/g), também de acordo com resultados anteriores de LOJUDICE *et al.* (2001).

4.8. Processo Fermentativo Descontínuo-Alimentado

4.8.1. Descrição de um Ensaio Descontínuo-Alimentado Típico

Os cultivos foram realizados em um fermentador New Brunswick (mod. MF 105), com dorna de 5L de capacidade nominal e com controles de temperatura, pH, frequência de agitação e vazão de ar. O fermentador foi acoplado a um controlador de oxigênio dissolvido NBS (mod. DO81).

A dorna foi, inicialmente, carregada com 400 mL de mosto e, a seguir, inoculada com 1,6L de inóculo. Todos os experimentos foram efetuados em aerobiose, de forma que adotou-se, o procedimento de borbulhar ar no mosto por cerca de 15 min antes de se proceder à inoculação.

A temperatura de cultivo foi controlada a 30° C, conforme condições previamente definidas por ROSSI (2002) e a agitação foi fixada em 400 rpm, conforme o indicado por SILVA (2000). O pH do meio, verificado através de um eletrodo (Mettler Toledo® mod. 405) acoplado à dorna, foi mantido em 5,7 durante todo o processo por adições controladas de NaOH (0,5M) ou H₂SO₄ (0,5M). Durante o cultivo, foi adicionado automaticamente antiespumante (polidimetilsiloxano).

As alimentações foram efetuadas em pulsos periódicos, em intervalos de 30min, e em vazões definidas segundo o método de adição estudado. De

acordo com a vazão e tipo de adição selecionado, tinha-se um volume de meio a ser alimentado na dorna, previamente esterilizado e acondicionado em *erlenmeyers* de 250mL. No caso de coincidirem os intervalos de adição de nutrientes com os de coleta de amostras, a adição só era efetuada após a coleta da amostra e adição dos volumes “morto” e de água deionizada.

O volume total alimentado de 1L era atingido após 5h de alimentação, de forma que o restante do cultivo passava a se caracterizar por um processo descontínuo tradicional. Para garantir um volume final de 3L, após o período de alimentação, volumes de 20mL de água deionizada previamente esterilizada eram adicionados ao meio antes da adição dos volumes de nutriente alimentado. A adição de água deionizada estéril nesse volume foi para garantir a reposição do volume de meio fermentado retirado da dorna durante a coleta de amostras.

Os ensaios em processo descontínuo-alimentado visaram a otimização da produção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase através do aumento nos valores dos parâmetros relacionados à produtividade e atividade (U/L). Para tanto, foram efetuados ensaios variando o tipo de alimentação adotado e o tipo de nutriente alimentado.

4.8.1.1. Preparo do Meio de Cultivo:

O volume total de meio utilizado para a realização do processo de fermentação foi de 3L, sendo 1,4L constituído de meio de cultivo e 1,6L constituído de inóculo previamente cultivado, em agitador metabólico por 18 horas, conforme citado no item 4.5. O meio de cultivo (1,4L) foi constituído de Glicose P.A (SIGMA®), Yeast Nitrogen Base (DIFCO®), L-Histidina (SIGMA®), L-Triptofano (SIGMA®), Uracila (SIGMA®) e Adenina (SIGMA®). O meio de Yeast Nitrogen Base (DIFCO®) continha os componentes descritos na Tabela 4.5. Nos ensaios, considerou-se a Glicose como fonte de carbono e o Yeast Nitrogen Base, Triptofano, Histidina, Uracila e Adenina como as fontes de nitrogênio do meio.

Dentro desse volume total de meio de cultivo de 1,4L, cerca de 400mL eram fornecidos no início do cultivo, sendo que, sua composição dependia

de quais nutrientes estariam sendo alimentados e quais mantidos desde o início do cultivo. Assim sendo, em ensaios onde a Glicose (Fonte de Carbono) era o nutriente alimentado, os demais nutrientes (Yeast Nitrogen Base, Histidina, Triptofano, Uracila e Adenina) eram dissolvidos no volume de 400mL, enquanto que a massa de Glicose era dissolvida no volume de 1L (volume total a ser alimentado).

4.8.1.2 Coleta de Amostras no decorrer do Ensaio:

A coleta de amostras foi efetuada conforme indicado no item 4.7.1.2.

4.8.2. Variáveis de Estudo para o Processo Descontínuo Alimentado

A fim de otimizar a obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase em processo descontínuo-alimentado, duas variáveis deste processo fermentativo foram avaliados:

- Tipo de Alimentação
- Nutrientes Alimentados

4.8.2.1. Ensaio variando o Tipo de Alimentação

Foram efetuados dez ensaios com o objetivo de avaliar qual o método de alimentação mais indicado para a obtenção de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase em cultivos de *S.cerevisiae* W303-181. Para tanto, foram avaliados os sistemas de adição constante, linear decrescente, linear crescente, exponencial decrescente e exponencial crescente. Para cada sistema de adição estudado foram efetuados dois ensaios, sendo um alimentando com Glicose e outro com Micronutrientes. Os intervalos e os volumes correspondentes adicionados estão indicados no APÊNDICE I, bem como, os cálculos utilizados para obtenção destes volumes adicionados.

4.8.2.2. *Ensaio variando os Nutrientes Alimentados*

Foram efetuados três ensaios variando as composições do meio alimentado de forma a estudar uma combinação entre os componentes do mosto.

O objetivo destes ensaios foi o de verificar de forma preliminar a dependência do microrganismo em relação aos componentes do meio (Glicose, Yeast Nitrogen Base, Histidina, Triptofano, Uracila e Adenina). Para tanto foram efetuados ensaios com as seguintes combinações na alimentação:

- Glicose + *Yeast Nitrogen Base* + Micronutrientes (Uracila, Adenina, Triptofano e Histidina).
- Glicose + *Yeast Nitrogen Base*.
- Glicose + Micronutrientes (Uracila, Adenina, Triptofano e Histidina).

Os ensaios combinando os componentes do meio de cultivo foram efetuados após a definição do melhor tipo de alimentação entre os estudados no item 4.8.2.1 e, posteriormente, comparados com os resultados obtidos para esse mesmo tipo de alimentação no ensaio utilizando a Glicose e no ensaio utilizando apenas os micronutrientes (Histidina, Triptofano, Uracila e Adenina) como nutriente alimentado.

4.9. Técnicas Analíticas

4.9.1. Determinação da Concentração Celular

A concentração celular foi obtida através da utilização do método descrito por VITOLLO (1985). Esta técnica envolveu a filtração de um volume conhecido (10mL) da suspensão celular através de uma membrana previamente tarada, seguida da introdução do sistema (membrana + células) em estufa à 105° C. Após 2 horas de secagem, a membrana era acondicionada em um dessecador com sílica gel até resfriar e, só então, a

membrana com a massa celular seca era pesada. A diferença de peso correspondeu à massa de células presente no volume de suspensão celular.

As membranas utilizadas para a execução dessa análise foram as membranas de ultrafiltração de diâmetro de poro de 0,45µm e marca MILLIPORE®.

A concentração celular na amostra, após o procedimento ter sido efetuado, é então obtida pela expressão apresentada na Equação 4.6 a seguir:

$$X \text{ (g/L)} = (M_{\text{Final}} - M_{\text{Inicial}}) \times 100 \quad \text{(Equação 4.6)}$$

4.9.2. Dosagem de Proteínas Totais

A concentração de Proteínas Totais foi obtida através da utilização do método descrito por LOWRY *et al.* (1964).

4.9.2.1. Estabelecimento da Curva de Calibração

Para o estabelecimento da curva de calibração padrão, utilizou-se a Albumina Bovina SIGMA® (BSA) na concentração 0,4 mg/mL. A solução de estoque de albumina bovina (0,4mg/mL) foi obtida através da diluição em balão volumétrico de 100mL, de 40 mg de BSA, em água deionizada. Em seguida, foi adicionado cerca de 0,2mL de NaOH 1M de forma a se obter melhor dissolução da espuma formada quando se agitou o balão.

Para a obtenção da curva, leram-se as absorbâncias obtidas utilizando as massas de albumina de 0,04, 0,08, 0,12, 0,16 e 0,20 mg em comprimento de onda de 660 nm. Estas concentrações de albumina foram obtidas por diluição em tubo da solução de albumina de 0,4 mg/mL conforme a tabela 4.7 a seguir:

TABELA 4.7: Diluições para a Curva de Calibração de proteína,

TUBO	SOLUÇÃO PROTEÍNA (mL)	ÁGUA (mL)	PROTEÍNA (mg)
1/1'	0,1	0,4	0,04
2/2'	0,2	0,3	0,08
3/3'	0,3	0,2	0,12
4/4'	0,4	0,1	0,16
5/5'	0,5	----	0,20
B	----	0,5	---

4.9.2.2. Procedimento Analítico

Nos tubos correspondentes, adicionou-se 1mL da amostra. Em seguida, adicionou-se 5mL da Mistura Reativa, preparado conforme descrito no Apêndice I. Homogenizou-se a solução e, em seguida, manteve-se em repouso, à temperatura ambiente, por 10 minutos exatos.

Após os 10 minutos de repouso, adicionou-se 0,5mL do Reativo de Folin-Cocalteau diluído e preparado conforme descrito no Apêndice I. Homogenizou-se o sistema, que, em seguida, foi mantido em repouso por 30 minutos. Após o repouso, efetuou-se a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro em $\lambda = 660 \text{ nm}$.

4.9.3. Contagem Celular em Câmara de Neubauer

A contagem de células foi efetuada em microscópio óptico comum através de uma adaptação do método de contagem de plaquetas em Câmara de Neubauer já conhecido e também baseado no método desenvolvido por LEE *et al.* (1981) para a contagem e análise de viabilidade em leveduras utilizando câmara de Neubauer.

A câmara de Neubauer empregada foi o modelo $1/400 \text{ mm}^2 \times 0,100 \text{ mm}$ espelhada e o método de análise de viabilidade empregado foi o de coloração com Azul de Metileno a ser descrito a seguir.

4.9.3.1. Procedimento Analítico

4.9.3.1.1. Diluição da Amostra e Carregamento da Câmara de Neubauer

Coletou-se 1mL da amostra de suspensão celular e transferiu-se esta alíquota para balão volumétrico de 10mL. O balão contendo a amostra foi avolumado com água destilada de forma a termos uma diluição de 10x. Homogenizou-se a solução no balão volumétrico. Em frasco, com tampa rosqueada apropriada, foram adicionados 0,9mL de solução de Azul de Metileno (0,025%) e 0,1mL da suspensão de células diluídas no balão volumétrico. Este procedimento garante uma diluição final de 100x.

4.9.3.1.2. Preparo da Câmara de Neubauer

Fixou-se a lamínula à Câmara de Neubauer umedecendo os 2 canais laterais existentes entre a área de contagem na Câmara (Quadrilátero). Com auxílio de capilar, coletou-se uma alíquota dessa nova solução (amostra diluída em Azul de Metileno) e carregou-se, então a Câmara de Neubauer com esta alíquota coletada pelo capilar (encostou-se o capilar próximo ao espaço existente entre a Câmara de Neubauer e a lamínula de forma, que por diferença de capilaridade, a alíquota se transferisse para a câmara e preenchesse toda a área correspondente ao quadrilátero). Em seguida, levou-se a Câmara de Neubauer ao microscópio e iniciou-se a contagem conforme descrito no item 4.9.3.1.3.

4.9.3.1.3. Contagem de Células

Após levar a Câmara de Neubauer ao microscópio, a contagem foi efetuada nos 4 quadriláteros maiores localizados nas laterais da Câmara. Cada quadrado tinha área de 1mm^2 e era subdividido em 16 quadrados menores, cada um com uma área de $1/16\text{mm}^2$. A contagem foi efetuada no sentido horário, tomando-se o cuidado de se observar a existência de células localizadas na linha que divide os quadrados menores.

O número total de células era a soma do número de células contadas nos 4 quadrados maiores. Para localizar os 4 quadrados maiores utilizou-se o

aumento de 100x e para efetuar a contagem utilizou-se o aumento de 400x no microscópio. As células viáveis da amostra eram as pouco ou nada coradas enquanto que as células inviáveis eram as coradas de azul intenso.

4.9.3.1.4. Cálculo do Número de Células

Para o cálculo do número de células na amostra, levou-se em conta as dimensões da Câmara de Neubauer utilizada. Neste caso, a área total da câmara correspondia a 64/16 mm² e a distância entre a lamínula e a Câmara de Neubauer era de 1/100 mm. Estas dimensões geraram um volume de Câmara de 64/160 mm³.

Sendo assim, o cálculo do número de células seguia a seguinte equação:

$$N' \text{ (células/mm}^3\text{)} = \frac{A}{V \times D} \quad \text{(Equação 4.8)}$$

Onde:

A = Número de células intactas

V = Volume da Câmara de Neubauer = 64/160 mm³

D = Fator de Diluição (inverso da diluição utilizada)

N' = Concentração Celular (células/mm³)

4.9.3.1.5. Cálculo da taxa de Inviabilidade

Durante a contagem de células, contou-se, paralelamente, o número de células inviáveis (coradas de azul) presentes na amostra. A diferença entre o número de células totais e o número de células inviáveis nos deu o número de células viáveis.

A taxa de inviabilidade foi obtida pela seguinte equação:

$$\%I = \frac{N_1}{N_2} \times 100 \quad \text{(Equação 4.9)}$$

Onde:

N_1 = Número de Células inviáveis

N_2 = Número de Células Totais

%I = Taxa de Inviáveis

4.9.4. Dosagem de Glicose

A medida da concentração de Glicose nas amostras coletadas do fermentador foi obtida a partir do método descrito por SOMOGYI & NELSON (1954), modificada por VITOLO (1983).

4.9.4.1. Estabelecimento da Curva de Calibração

Para o estabelecimento da curva de calibração padrão, utilizou-se a Glicose PA SIGMA[®] na concentração 0,2 mg/mL. A solução de estoque de glicose PA (0,2mg/mL) foi obtida através da diluição em balão volumétrico de 100mL, de 100 mg de Glicose PA, em água deionizada. Em seguida, tomou-se 20mL e transferiu-se a mesma para outro balão volumétrico de 100mL, completado com água destilada. Para a obtenção da curva, leram-se as absorbâncias obtidas utilizando as concentrações de Glicose de 0,04, 0,08, 0,12, 0,16 e 0,20 mg/mL. Estas concentrações de Glicose foram obtidas por diluição em tubo da solução de albumina de 0,2 mg/mL conforme a tabela 4.10 a seguir:

TABELA 4.10: Diluições para a curva de calibração de glicose

TUBO	SOLUÇÃO GLICOSE (mL)	ÁGUA (mL)	GLICOSE (mg/mL)
1/1'	0,2	0,8	0,04
2/2'	0,4	0,6	0,08
3/3'	0,6	0,4	0,12
4/4'	0,8	0,2	0,16
5/5'	1,0	----	0,20
B	----	1,0	---

4.9.4.2 Procedimento Analítico

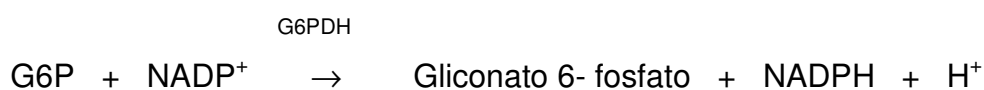
Nos tubos de Folin-Wu correspondentes, adicionou-se 1mL da amostra. Em seguida, adicionou-se 1mL da Mistura Reativa, preparada conforme o descrito em Apêndice II. Homogenizou-se a solução e, em seguida, levou-se a banho de água fervente, por 10 minutos exatos.

Após os 10 minutos de fervura, levou-se as amostras a banho de gelo por alguns instantes e, então, adicionou-se 2,0mL de Solução Arseno-Molíbica preparado conforme descrito no APÊNDICE II. Agitou-se o sistema para remover os gases formados. A seguir, completou-se com água destilada até a marca de 25mL. Homogenizou-se o sistema, que, em seguida, foi mantido em repouso por 20 minutos. Após o repouso, efetuou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro em $\lambda = 540 \text{ nm}$.

4.9.5. Atividade Enzimática da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

A atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase foi determinada por análise espectrofotométrica de NADP^+ reduzido a uma temperatura de 30°C a 340 nm de acordo com o método descrito por BERGMAYER (1983). Esta medida foi realizada em um sistema enzimático contendo glicose 6-fosfato (G6P) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP^+) de acordo com o seguinte princípio: a G6P foi oxidada pela presença da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e de NADP^+ formando gliconato 6-fosfato e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH), conforme Figura 4.11.

FIGURA 4.11: Reação envolvida na determinação da atividade da enzima G6PDH.



A atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase foi então determinada pela medida da velocidade de formação de NADPH, verificada por espectrofotômetro.

Esta determinação foi realizada em cubeta de quartzo contendo 1 mL da amostra de células rompidas, centrifugadas e ressuspendidas em solução tampão Tris-HCl (100 mM, pH 7,5) contendo 10 mM de cloreto de magnésio. A esta solução eram adicionados 5 μ L de NADP⁺ (1 mM), e 10 μ L de G6P (10 mM). Uma unidade (U) de G6PDH foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a redução de 1 μ mol de NADP⁺/min nas condições do experimento.

As análises foram realizadas em duplicata, sendo a atividade da G6PDH obtida desta análise expressa em U/mL e a atividade específica expressa em U/mg_{Prot. Totais} e U/ g cel.

4.10. Metodologia de Análise dos Resultados

Para estudo e avaliação dos resultados obtidos neste trabalho foram analisadas diversas variáveis como apresentadas a seguir.

4.10.1.Obtenção da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase no Decorrer do Processo (U/L_{meio})

Para melhor interpretação dos resultados referentes à obtenção das enzimas G6PDH, as atividades enzimáticas obtidas nas amostras após rompimento celular foram calculadas proporcionalmente à quantidade de células existente no meio de cultivo, possibilitando, deste modo, a expressão U/L_{meio}, conforme mostrado na Equação 4.12.

$$\boxed{\text{G6PDH (U/L}_{\text{meio}}) = (A / X_{\text{romp}}) \cdot X} \quad (\text{Equação 4.12})$$

Onde:

A atividade enzimática no homogenato de levedura após rompimento

X_{romp}	concentração celular na amostra destinado ao rompimento celular
X	concentração celular no meio de cultivo

4.10.2. Fator de Conversão de Substrato em Células (g/g)

O fator de conversão de substrato em células ($Y_{X/S}$) foi definido através das relações apresentadas na Equação 4.13, definida como "Método Convencional".

$$Y_{X/S} = \Delta X / -(\Delta S) = (X_f - X_i) / (S_i - S_f) \quad (\text{Equação 4.13})$$

Onde:

$Y_{X/S}$	fator de conversão de substrato em células (g/g)
ΔX	variação da concentração celular (g/L)
ΔS	variação da concentração de substrato (g/L)
X_i e X_f	concentração inicial e final de células (g/L)
S_i e S_f	concentração inicial e final de substrato (g/L)

4.10.3. Fator de Conversão de Substrato em G6PDH (U/g)

O fator de conversão de substrato em produto, ou seja, enzima G6PDH ($Y_{G6PDH/S}$), do mesmo modo como descrito em $Y_{X/S}$, foi definido também através da relação apresentada na Equação 4.14, definida como "Método Convencional".

$$Y_{G6PDH/S} = \Delta P / -(\Delta S) = (P_f - P_i) / (S_i - S_f) \quad (\text{Equação 4.14})$$

Onde:

$Y_{G6PDH/S}$	fator de conversão de substrato em G6PDH (U/g)
ΔP	variação da atividade obtida de G6PDH (U/L _{meio})
ΔS	variação de concentração de substrato (g/L)
P_i e P_f	atividade inicial e final da G6PDH (U/L _{meio})
S_i e S_f	concentração inicial e final de substrato (g/L)

4.10.4. Máxima Produtividade em Enzimas (Pr^*_{G6PDH})

A máxima produtividade em enzimas (Pr^*_{G6PDH}) foi definida como sendo a maior razão entre a variação da atividade da G6PDH (ΔP) e o respectivo intervalo de tempo de cultivo (Δt).

4.10.5. Máxima Produtividade em Células (Pr^*_X)

A máxima produtividade em células (Pr^*_X) foi definida como sendo a maior razão entre a variação da concentração celular (ΔX) e o respectivo intervalo de tempo de cultivo (Δt).

4.10.6. Produtividade Média em Enzima (Pr_{G6PDH})

A produtividade média em enzima (Pr_{G6PDH}) foi definida como sendo a razão média entre a variação da atividade da G6PDH total (ΔP) e o intervalo de tempo total de cultivo (Δt). No caso de Ensaio Descontínuo-Alimentados, a produtividade média foi calculada para o tempo total de alimentação (5h).

4.10.7. Produtividade Média em Células (Pr_X)

A produtividade média em células (Pr_X) foi definida como sendo a razão média entre a variação da concentração celular total (ΔX) e o intervalo de tempo total de cultivo (Δt). No caso de Ensaio Descontínuo-Alimentados, a produtividade média foi calculada para o tempo total de alimentação (5h).

4.10.8. Velocidade Específica Máxima de Crescimento (μ_{Xmax})

A existência de uma provável fase exponencial de crescimento celular foi avaliada através de uma representação gráfica $\ln X = f(t)$. Deste modo assumiu-se μ_{Xmax} igual ao maior coeficiente angular da equação da reta, $\ln X = f(t)$, encontrado entre os pontos experimentais, considerando para isto no mínimo quatro pontos experimentais e consecutivos.

4.10.9. Velocidades Instantâneas e Específicas

As velocidades instantâneas de crescimento (dX/dt), consumo de substrato (dS/dt) e de obtenção de produto (dP/dt), ou seja, atividade de

G6PDH, foram calculados pelo método proposto por LE DUY & ZAJIC (1973). As velocidades específicas de crescimento (μ_X), consumo de substrato (μ_S) e de obtenção de produto (μ_P) foram obtidas pela divisão das velocidades instantâneas pela concentração celular nos pontos da curva média onde foram calculadas as derivadas, como definidas nas Equações abaixo:

$$\mu_X = 1/X \cdot dX/dt \quad (\text{Equação 4.15})$$

$$\mu_S = 1/X \cdot dS/dt \quad (\text{Equação 4.16})$$

$$\mu_P = 1/X \cdot dP/dt \quad (\text{Equação 4.17})$$

Onde:

μ_X	velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})
μ_S	velocidade específica de consumo de substrato ($g/g_{cel} \cdot h$)
μ_P	velocidade específica de formação de produto, G6PDH ($U/g_{cel} \cdot h$)
X	concentração celular (g/L)
S	concentração de substrato (g/L)
P	concentração de produto, G6PDH (U/L_{meio})

4.10.10. Tempo de Geração (tg)

O cálculo do tempo de geração (tg) foi baseado na metodologia proposto por BORZANI (1975) e calculado durante a fase exponencial de crescimento, conforme apresentado na Equação 4.18.

$$tg = \ln 2 / \mu_{Xmax} \quad (\text{Equação 4.18})$$