

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Processos Fermentativos

Em termos gerais, a fermentação implica na utilização de microrganismos na transformação da matéria orgânica catalisada por enzimas.

A humanidade convive com processos fermentativos desde 5.000 a.C na sua utilização para a obtenção de vinho, queijos e outros derivados do leite. Os egípcios já utilizavam a fermentação da cevada para a obtenção de uma espécie de cerveja e, em 4000 a .C, a levedura da cerveja já estava sendo utilizada para a panificação. No México, os astecas costumavam cultivar algas do gênero *Spirulina* para consumo próprio (WARD,1991).

Hoje em dia, diversos produtos utilizados nas indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos são obtidos por processos fermentativos. Estes produtos podem ser gerados pelo metabolismo primário (ex: Etanol) ou secundário (Ex: Antibióticos) do microrganismo cultivado e ao lado da produção de biomassa, enzimas e proteínas em geral, eles são os responsáveis pela evolução tecnológica e desenvolvimento das pesquisas na área (WARD,1991).

As fermentações podem ser conduzidas por processos descontínuos, descontínuo-alimentados ou contínuos, bem como, por variações destes processos. (WARD, 1991; BORZANI, 2001).

Independente do modo de operação utilizado, o desenvolvimento de processos fermentativos para a produção de enzimas por microrganismos tornou viável a obtenção de novos sistemas enzimáticos (PARK, 1975).

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

Diversos são os estudos com a finalidade de aprimorar e otimizar os processos fermentativos, objetivando a produção de enzimas (PESSOA-

JÚNIOR *et al.*, 1996; ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1996). No entanto, segundo TONGUE, INLOES (1990), a real aplicação industrial de qualquer enzima só é viável se as condições utilizadas no processo fermentativo forem favoráveis e se a enzima produzida em larga escala apresentar os mesmos níveis, de atividade e produtividade obtidas em escala de bancada.

Segundo TACIRO (1992), a ampliação de escala de um processo fermentativo, para que este se torne viável industrialmente, deverá manter as condições do processo uniformes para qualquer volume de operação.

No entanto, de acordo com TONG & INLOES (1990), para tornar viável essa ampliação de escala é indispensável primeiro definir o microrganismo a ser empregado, o meio de cultivo e as condições de agitação e aeração mais adequadas ao processo.

3.1.1. Processo Descontínuo

Os cultivos descontínuos podem ser considerados como sendo um sistema fechado, exceto pela aeração e controle de pH através da adição de ácidos e bases, que contém uma quantidade limitada de meio, e no qual o inóculo passa por um número de fases, o que pode ser observado pela curva de crescimento celular. Em processos descontínuos e semi-contínuos, todo o substrato é fornecido no início da fermentação, enquanto que nos demais processos, o substrato é adicionado ao longo do cultivo.

A principal desvantagem da fermentação descontínua, quando utilizada para a produção de bioprodutos associados ao crescimento celular, é que a formação eficiente do produto ocorre somente durante uma parte do ciclo de fermentação, o que promove uma produtividade menor do que a obtida por processos que consigam prolongar este período.

Em cultivos descontínuos, as elevadas concentrações de açúcares podem resultar numa repressão chamada *Efeito Crabtree*, na qual as enzimas da respiração microbiana são inibidas e a produção de etanol aumenta. Este problema pode ser resolvido através do cultivo descontínuo-alimentado, onde os nutrientes essenciais podem ser alimentados conforme a necessidade do microrganismo durante o cultivo (WIN *et al.*, 1995).

A quantidade de biomassa alcançada por um processo descontínuo depende da concentração inicial de substrato limitante do crescimento e da eficácia do microrganismo para converter o substrato em material celular.

Segundo WARD (1991), a função principal de um fermentador é a de proporcionar um meio ambiente controlado que permita o crescimento eficiente das células e, a conseqüente, obtenção do produto de interesse. Sendo assim, na hora de decidir-se por um fermentador em escala laboratorial ou piloto, deve-se levar em conta a futura ampliação de escala, que por sua vez, resulta em fermentadores onde o custo e objetivos específicos são levados em conta. Os fermentadores trabalham, na maior parte dos processos, em condições assépticas, o que sugere a utilização de inóculo livre de contaminantes e de um sistema de fermentação passível de esterilização.

A maior parte dos processos fermentativos utiliza o reator do tipo tanque com agitação convencional mecânica, que nada mais é que um eixo vertical contendo diversos agitadores em forma de pá. O ar estéril é introduzido, geralmente, pela base da dorna e através de dispersores é distribuído por todo o meio através do sistema de agitação. Portanto, a geometria dos fermentadores deve facilitar a eficácia da troca gasosa e as características finais deste fermentador deverão levar em conta os fenômenos de transporte existentes nos processos biológicos.

3.1.2. Processo Descontínuo-Alimentado

O processo descontínuo alimentado vem sendo utilizado desde 1900 para regular o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, porém, os primeiros a utilizarem esse termo foram YOSHIDA *et al.* (1973). Basicamente, o processo descontínuo-alimentado é definido como uma técnica em processos microbianos, onde um ou mais nutrientes são adicionados no fermentador durante o cultivo e em que os produtos aí permanecem até o final da fermentação. Em alguns casos, todos os nutrientes são adicionados gradualmente à dorna (YAMANE *et al.*, 1984) ou, então, apenas os chamados aditivos (precursores de produtos ou nutrientes de menor

concentração no meio) é que são alimentados. A vazão de alimentação pode ser constante ou variar com o tempo, sendo que, no caso de a vazão de alimentação variar com o tempo, esta pode ser regulada em função da concentração de substrato desejada no meio, podendo-se, inclusive, manter a concentração de substrato constante durante a alimentação (SENE *et al.*, 2000).

Existem dois sistemas básicos de aplicação para uma fermentação descontínuo-alimentada (*Fed-Batch*), que são o de volume fixo e volume variável. No caso de volume fixo, o substrato é alimentado sem que ocorra diluição da cultura. O volume de meio de cultura pode ser mantido constante através da alimentação de substrato na forma de líquido concentrado ou através de diálise. Em sistemas de volume variável, o volume se altera de acordo com o tempo de fermentação oportuno para o substrato alimentado. A forma como esse volume se altera depende de fatores como as exigências, limitações e dos objetivos da operação. A alimentação pode ser efetuada através da adição com vazão constante, vazão crescente e vazão decrescente, entre outros. Este processo pode ser classificado, também, como fermentação descontínuo-alimentada simples ou repetida, sendo o processo de fermentação repetida aquele onde parte do meio de cultura é removido do sistema em um certo momento da operação e mais meio nutriente é então adicionado. A existência de um volume reduzido no início do cultivo ou uma menor concentração de nutrientes durante o enchimento, promove o aumento na velocidade específica de crescimento, seguido por um decréscimo gradual onde se estabelece um estado praticamente constante. No processo simples, um meio de crescimento complementar é adicionado durante a fermentação sem retirar-se a cultura até o fim do cultivo. Neste processo, a duração da fermentação é limitada pelo volume do fermentador.

A fermentação descontínuo-alimentada é uma técnica de produção situada entre a fermentação descontínua e a contínua, onde é necessária uma vazão de alimentação apropriada, com a constituição certa dos componentes. Este tipo de fermentação oferece diversas vantagens em

relação aos outros processos. Entre as vantagens oferecidas tem-se a produção de elevadas concentrações de células devido ao extenso tempo de trabalho (o que é particularmente importante no caso de produtos associados ao crescimento celular), o melhor controle das condições de adição de substratos durante a fermentação (particularmente importante no caso das concentrações de substratos específicos como, por exemplo, a fonte de carbono), o melhor controle dos produtos obtidos ou dos efeitos da repressão catabólica devido à adição de substrato ser limitado apenas à quantidade necessária para a formação do produto, o modo de operação permite dominar e controlar os desvios no crescimento do microrganismo encontrados na fermentação descontínua, permite a reposição da água perdida no meio por evaporação, é um modo alternativo de operação para fermentações que utilizem substratos tóxicos ou de baixa solubilidade e a não necessidade de peças adicionais especiais como é necessário em uma fermentação contínua.

Segundo WIN *et al.* (1996), a produtividade celular (P_{rX}) alcançada no cultivo de *S.cerevisiae* utilizando melão de cana-de-açúcar em processo descontínuo foi de 0,31 g/L enquanto que a obtida para processo descontínuo-alimentado foi de 2,33 g/L, implicando num aumento considerável da concentração de biomassa resultante graças à redução de prováveis efeitos inibitórios que estariam presentes durante o cultivo descontínuo. É necessário observar-se que este tipo de fermentação necessita de uma análise prévia do microrganismo, do que é necessário para o seu crescimento e conhecer-se sua fisiologia com a produtividade. Também é necessário conhecer-se a técnica de operação para o início, definição e desenvolvimento do processo.

O substrato é, particularmente, um importante parâmetro para se controlar este tipo de fermentação devido ao fato de estar, eventualmente, associado à inibição do crescimento e ao aumento da eficiência do fluxo de carbono, pela redução da quantidade de produtos derivados formados e a quantidade de dióxido de carbono envolvido. Um exemplo de controle de concentração

de glicose é encontrado na produção descontínuo-alimentada de levedura de panificação (AIBA & NAGAI, 1976).

Segundo KAPAT *et al* (1998), a alimentação com galactose após o meio fermentado se mostrar exaurido de glicose mostrou-se a mais eficiente estratégia de produção de Glicose-Oxidase através do cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante em processo descontínuo alimentado.

Nutrientes como metanol, etanol, ácido acético e compostos aromáticos inibem o crescimento celular, mesmo em concentrações baixas, porém, sabe-se que qualquer nutriente pode se tornar inibitório, mesmo que somente em concentrações muito elevadas e esse efeito inibitório é efetivamente reduzido pelo uso do processo descontínuo alimentado, através do controle das concentrações destes nutrientes (BORZANI *et al.*, 2001). Outro grande problema minimizado seria o da formação de produtos metabólicos tóxicos, que é crítica em processos onde exista a necessidade de se trabalhar com altas densidades celulares, como no caso de fermentações de microrganismos modificados geneticamente, onde a concentração celular elevada implica num aumento significativo na produção, já que o crescimento celular em microrganismos modificados geneticamente é sempre bem menor do que o microrganismo selvagem. Problemas de transferência de oxigênio são acentuados em fermentações em alta concentração celular, de forma que a velocidade de crescimento celular passa a ser fator determinante para a eficiência do processo, de forma que se mantenha a mesma em níveis desejáveis e tenhamos, com isso, a diminuição na produção de produtos tóxicos, possibilitando que se consiga altas concentrações celulares e, também, aumento na quantidade de produto formado. No processo descontínuo alimentado não existem problemas comuns ao processo contínuo, como os problemas de mutação, contaminação e instabilidade do plasmídeo, de forma que o processo descontínuo alimentado se torna muitas vezes o mais viável para a produção de produtos recombinantes (YOON & KANG, 1994).

O processo descontínuo alimentado pode ser controlado não somente pela concentração de nutrientes no meio, mas também, pela variação do pH durante a alimentação como na produção de Glicose-Oxidase (GOD) através do cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* recombinante (KAPAT *et al.*, 1998). Neste procedimento, a alimentação com galactose foi automaticamente controlada pela variação do pH durante o cultivo de forma que seu valor não ultrapassasse a faixa entre 5,45 e 5,55. O sistema de controle do pH possibilitou um aumento na secreção extracelular da enzima e uma redução na produção de etanol, aumentando a produção de GOD.

Outra maneira de se controlar um processo fermentativo é através da medida *on-line* da concentração de etanol, uma vez que sua produção durante o cultivo é uma das maiores razões para uma queda na produtividade celular e do produto de interesse (WIN *et al.*, 1995).

Para que um microrganismo tenha sua sobrevivência garantida no meio ambiente, ele tem que, necessariamente, ser eficiente, não desperdiçando energia. Para isso, o microrganismo possui mecanismos regulatórios no seu metabolismo para evitar a formação de algum metabólito em excesso. Uma forma de se evitar ou contornar essa regulação é através da utilização de cultivos descontínuo-alimentados. Como exemplo temos a utilização desse processo para contornar o efeito da repressão catabólica, comum quando utilizamos Glicose como fonte de carbono. A Glicose é rapidamente metabolizável e acaba inibindo a expressão de genes que codificam enzimas relacionadas ao metabolismo de outras fontes de carbono. Uma maneira de se evitar esse efeito é através do cultivo em batelada alimentada onde se consegue manter a concentração de glicose no meio baixa, restringindo, com isso, o crescimento celular e desreprimindo a biossíntese de enzimas.

Segundo BORZANI (1996), todos os açúcares fermentáveis disponíveis na dorna são completamente metabolizados uma hora após o término da fase de alimentação de um processo descontínuo-alimentado de produção de etanol eficiente.

Outro efeito da regulação catabólica que pode ser controlado pelo uso de cultivo em batelada alimentada é o que se chama de indução. A indução, ou

desrepressão, ocorre quando na presença de algum substrato, os genes que induzem à formação de algum bioproduto (ex: enzimas) são desreprimidos, liberando a síntese dessa enzima. Por exemplo, em processos onde o produto obtido seja uma proteína recombinante, a indução de proteases se dá quando ocorre a diminuição da concentração de nitrogênio no meio. Esta teoria foi comprovada por YOON *et al.* (1994), que adicionaram extrato de levedura como fonte de nitrogênio orgânica, e evitaram a indução (desrepressão) dos genes que induzem à formação de proteases. A formação de proteases degradaria a proteína recombinante obtida no cultivo.

O processo descontínuo alimentado também é utilizado para o estudo da cinética de processos fermentativos, pois, possibilita a manutenção de baixos níveis de substrato por um longo período de tempo, concentração celular constante e controlar a velocidade de crescimento em condições transientes. Com isso, é possível estimar de forma mais favorável os parâmetros cinéticos e se obter a máxima velocidade.

A fermentação alcoólica pode ser realizada em processo descontínuo, descontínuo alimentado ou contínuo, mas, no Brasil o processo descontínuo-alimentado com reciclo de células é um dos mais empregados. A grande vantagem e principal justificativa para seu emprego estão na possibilidade de controlar-se a velocidade de alimentação de meio, diminuindo com isso a inibição, causada pelas elevadas concentrações de substrato e/ou de produto, no metabolismo celular. Vários trabalhos mostraram um aumento na produtividade em etanol entre 10 e 14% ao alimentarem o substrato através de sistemas de adição linear decrescente (KRAUTER *et al.*, 1987) ou exponencial decrescente (ECHEGARAY *et al.*, 2000) quando comparados com cultivos em processo descontínuo.

3.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae destaca-se como a espécie mais explorada comercialmente entre as leveduras e apresenta grande emprego em nosso país, notadamente, na indústria de produção de etanol.

As leveduras e, em particular, a *Saccharomyces cerevisiae*, são microrganismos aos quais nós temos algumas das mais antigas referências bibliográficas. Já em EXODUS 12 e 13 existem citações sobre leveduras (FLORES *et al.*, 2000).

Desde a Antiguidade, *Saccharomyces cerevisiae* vem sendo utilizada em processos fermentativos diversos, como na panificação, cervejaria e fabricação de vinho e, seu uso foi possível desde então, devido à sua capacidade de converter rapidamente açúcares em etanol, ácidos orgânicos e gás carbônico (WARD, 1991).

A produção de etanol pela fermentação do caldo de cana e melaço tem dado uma grande contribuição para o programa energético brasileiro.

O uso de *Saccharomyces cerevisiae* como uma fonte na obtenção de enzimas mostra-se uma alternativa viável e bem prática devido à grande manipulação desta cepa em plantas industriais (SILVA *et al.*, 2001).

A primeira pesquisa voltada ao estudo das leveduras foi realizada por Antonie van Leewhoek, que as observou primeiramente em cervejas e vinhos. Foi somente em 1876, através de Pasteur, que se conseguiu comprovar que as fermentações do vinho e da cerveja eram causadas pelas leveduras. A partir de então, as leveduras e, em particular, *Saccharomyces cerevisiae* passaram a ser os microrganismos favoritos para os estudos de biologia celular básica, o que a tornou um ponto central na evolução da microbiologia, bioquímica e genética. Existem diversas razões para isso, como a facilidade de seu isolamento e manutenção, pouca exigência nutricional, bom crescimento em meios constituídos por resíduos industriais, amplo uso em processos industriais e sua reconhecida capacidade de produzir enzimas extracitoplasmáticas.

Segundo ENTIAN (1997), a *Saccharomyces cerevisiae* tornou-se um microrganismo modelo em genética e biologia molecular, culminando com o seu completo sequenciamento.

Saccharomyces cerevisiae é uma levedura ascomicética e anaeróbia facultativa. Uma levedura típica, consta de células pequenas, ovais e apresenta uma reprodução vegetativa por brotamento. O ciclo de vida de

leveduras do tipo *Saccharomyces cerevisiae* inclui duas fases: haplóide e diplóide. Quando células diplóides são colocadas em um meio de esporulação, o crescimento vegetativo se encerra e as células começam a formar esporos de forma que cada célula diplóide forme um asco, geralmente, com quatro esporos (BYERS,1981).

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

A *Saccharomyces cerevisiae* adquirida comercialmente apresenta atividade da enzima G6PDH muito similar quando comparado à *Saccharomyces cerevisiae* produzido por fermentação sob condições controladas. Entretanto, a *Saccharomyces cerevisiae* modificada geneticamente produziu atividade enzimática de ,aproximadamente, 100 vezes mais que a cepa selvagem e mostrou ser o mais efetivo procedimento para a obtenção de G6PDH, além de justificar o uso de técnicas de biologia molecular para a produção dessa enzima pela *Saccharomyces cerevisiae* (LOJUDICE *et al.*, 2001).

Vários são os fatores que influenciam o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae*. O crescimento celular depende de fatores como temperatura, pH, componentes do meio de cultura e disponibilidade de oxigênio para a célula (SILVA *et al.*, 2001).

3.2.1.Influência da Temperatura

Sendo as leveduras microrganismos mesófilos, em geral, as temperaturas ótimas para sua utilização em processos industriais irão se situar na faixa entre 25 e 35° C. Para a produção de etanol, a temperatura ótima obtida foi de 30° C (WIN *et al.*, 1995), porém, encontram-se trabalhos em que a temperatura utilizada foi de 32° C (ECHEGARAY *et al.*, 2000; BORZANI, 1996) ou até mesmo de 28° C (PAALME *et al.*, 1997) o que reforça a idéia

da existência de uma faixa ótima de temperatura em que se possa trabalhar sem que a modificação no valor de temperatura dentro dessa faixa implique em grandes perdas de produtividade. Porém, estudos feitos por FIESCHKO & HUMPHREY (1983) mostraram que entre 23° C e 33° C o coeficiente de manutenção de bactérias se manteve constante, porém, com o aumento da temperatura de 33° C para 35° C, houve uma sensível alteração no coeficiente de manutenção celular, mesmo não tendo ocorrido grande variação no fator de conversão de substrato em célula. Isto implica que, possivelmente, o aumento da temperatura de forma que esta saia da faixa ótima resulta em alterações no metabolismo basal da célula.

Para a produção de cerveja podemos ter uma temperatura ótima em torno de 26° C (LIMA, 1975), enquanto que para a obtenção de Glicose-Oxidase, este valor ficou em torno de 30° (KAPAT et al., 1998) e para a obtenção de Hexoquinase a temperatura ótima variou entre 35 e 40° C (ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1996).

Uma explicação para essa faixa de temperatura está no fato de que em temperaturas elevadas ocorre inibição da síntese de ácidos graxos e esteróis (STARR, 1962).

3.2.2. Influência do pH

O pH é, sem dúvida, uma importante variável a ser considerada em um cultivo de microrganismos pois cada cepa utilizada terá um valor ótimo de pH na qual deverá ser cultivada. Uma mudança no valor intracelular do pH seria indesejável e é por isto que os microrganismos tem uma eficiente capacidade tamponante intracelular, capaz de manter o valor de pH sempre ótimo. Portanto, o pH utilizado afeta apenas as enzimas extracitoplasmáticas, como a invertase, além de promover alterações na estrutura da membrana celular. (ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1996; DE MORAIS, 1984).

O pH considerado ótimo para a produção da enzima hexoquinase foi de 4,0 e a justificativa para este valor estaria no acoplamento entre a produção

de hexoquinase e a atividade da enzima extracelular invertase, diretamente afetada pela variação no pH extracelular (ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1996).

Segundo SOUZA *et al.* (2000) e ASENJO (2000), o pH pode alterar as cargas dos grupos químicos localizados ao lado das cadeias de proteínas provocando uma modificação na rede de cargas de toda a estrutura da macromolécula de forma que a enzima tenha sua capacidade catalítica reduzida ou mesmo perdida.

Sabe-se que em ausência de meio tamponado, o valor do pH cai rapidamente durante as primeiras fases de fermentação e este fenômeno pode ser tido como um reflexo da atividade da levedura, que está absorvendo aminoácidos, acumulando íons, excretando gás carbônico no meio ou mesmo excretando íons H⁺ durante a geração de ATP pela respiração (extrusão de prótons durante o transporte de elétrons pela Cadeia de Transporte de Elétrons – CTE), (DE MORAIS, 1984).

DE MORAIS (1984) comprovou que a acidificação ocorre pela extrusão de prótons para o meio extracelular, assim como, o controle dessa extrusão é feito pelo valor do pH no meio externo. Como uma forma de buscar equilíbrio na relação entre a concentração de prótons extra e intracelularmente, a célula busca o controle do pH no ambiente extracelular através dessa acidificação, o que prova a importância do pH extracelular na geração de ATP que, por sua vez, está intimamente ligado ao gradiente de prótons gerados pela diferença de concentração extra e intracelular dos mesmos.

O pH do meio de cultivo exerce papel significativo na atividade da G6PDH. ABRAHÃO-NETO *et al.* (1997), trabalhando a 35° C e 4,0 mg O₂ / L, obtiveram maior atividade para G6PDH com um pH 4,5, sendo que um acréscimo de 0,5 neste valor promoveu uma queda de 50% da atividade enzimática. Por outro lado, a modificação genética pode alterar o valor ótimo deste pH, como comprova ROSSI (2002), onde o pH 5,7 mostrou-se mais adequado para a produção de G6PDH através do cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada.

3.2.3. Influência do Meio de Cultura

Devem ser considerados os nutrientes responsáveis pelo crescimento celular. Fontes de carbono e nitrogênio são muito importantes no cultivo de microrganismos. O modo de aplicação e seleção de fontes de carbono é um dos fatores críticos dos processos fermentativos, pois muitos compostos, especialmente açúcares, podem causar intensa repressão catabólica da síntese de várias enzimas, além da redução na velocidade de crescimento de determinados microrganismos (LILLY, 1979).

As grandes parcelas de microrganismos crescem bem em meios contendo amido ou açúcar, uma fonte usual de nitrogênio e sais para suprir a necessidade de elementos minerais.

Os meios podem ser classificados como naturais ou sintéticos. Os meios naturais são tecidos ou sumo de plantas ou animais em seu estado nativo, enquanto que os meios sintéticos são preparados com açúcar puro e compostos orgânicos e inorgânicos quimicamente puros. Nos meios sintéticos, a composição química é qualitativa e quantitativamente bem definida.

Os meios naturais são altamente desejados pois permitem se cultivar microrganismos em meios obtidos a partir de fontes naturais de qualquer parte do mundo. Tem-se, também, que pelo fato do meio ser, basicamente, composto de extratos naturais, o seu custo é largamente inferior ao que se tem com o cultivo em meio sintético. Para aumentar a produtividade, se utilizam meios concentrados, porém, isto pode acarretar um aumento da pressão osmótica e dificuldades de aeração. As matérias-primas perfazem 60 a 80% do preço de custo em uma produção de enzimas por fermentação e, portanto, a composição do meio deve ser definida com cuidado e trabalhos de pesquisas são necessários para que se viabilize a substituição de compostos caros por outros disponíveis em maior quantidade e de preço mais baixo (GODFREY & WEST, 1986).

STEINBERG (1939) estudando o tema concluiu que o meio sintético exerce um excelente papel na nutrição de microrganismos. Segundo RICCI-SILVA (1998), a composição do meio de cultivo exerceu grande influência

para a produção de hexoquinase (HK) e glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PDH) em células de *S. cerevisiae*. De acordo com LIMA (1975) qualquer composto orgânico natural ou mesmo sintético pode ser utilizado como fonte de carbono por microrganismos, o que permite versatilidade no estudo e posterior emprego de diferentes meios de cultura em uma extensa série de transformações úteis ao homem. Para obtenção do produto desejado, há necessidade de uma seleção entre essas diversas fontes de carbono. Assim, podem-se obter melhores condições de processo, e suprir suficientemente as células para biossíntese e geração de energia (WANG *et al.*, 1979). Portanto, a definição da fonte de carbono e de sua concentração é um dos fatores críticos do processo fermentativo (LILLY, 1979).

3.2.3.1. Fonte de Carbono

Segundo LUCERO *et al.* (2001), *Saccharomyces cerevisiae* utiliza preferencialmente açúcares em relação a qualquer outra fonte de carbono e esta preferência é facilitada por diversos mecanismos que são controlados com eficiências diferentes por todos os açúcares fermentescíveis: indução das proteínas que favorecem a fermentação, repressão das enzimas da cadeia respiratória e do ciclo do glioxilato e inativação das enzimas chaves da gluconeogênese.

A glicose é um dos mais importantes “primeiros mensageiros” em células de leveduras. A adição de glicose ou de um açúcar rapidamente fermentescível às células que cresceram em fontes não fermentescíveis (condições de desrepressão) gera sinais metabólicos e dispara uma ampla variedade de fenômenos regulatórios. O sinal produzido interage com o produto de um gene, regulando sua transcrição por ativação de proteínas repressoras ou pela inibição de proteínas ativadoras (GANCEDO, 1992).

Segundo descrito por LUCERO *et al.* (2001), a glicose é utilizada preferencialmente pelas leveduras em relação a qualquer outro açúcar presente e isto mostra o seu efeito sobre os mecanismos, que são controlados especificamente pela glicose, através de uma imposição nos mecanismos de catabolismo dos outros açúcares, seja pela indução de

alguns transportadores de açúcares ou pela repressão de transportadores e enzimas necessárias. Três transportadores de açúcares distintos foram identificados em leveduras sendo que dois deles são específicos para o transporte de galactose e maltose e um terceiro seria para o transporte de α -glicosídeos, sendo todos os três transportadores inativados em presença de glicose através de um sistema que inclui proteólises e é denominado de inativação catabólica.

A concentração de glicose no meio exerce uma função reguladora importante no metabolismo. Por exemplo, para *S. cerevisiae*, a glicose não é somente uma fonte de carbono, mas também age como um regulador global do mecanismo de crescimento celular (REIFENBERGER *et al.*,1997). O transporte de açúcar pode ser uma fase limitante do catabolismo durante o processo fermentativo (REIFENBERGER *et al.*,1997; DOES & BISSON,1998). Um estudo de comparação da capacidade de absorção de glicose entre diferentes leveduras sugere que o seu transporte esteja relacionado com a habilidade fermentativa específica de cada microrganismo (SILVA,1998). Em presença de glicose no meio, a síntese de muitas enzimas é reprimida, particularmente, a envolvida na glicogênese, ciclo do ácido tricarboxílico, ácido glioxilato e catabolismo de açúcar fornecido ao meio, tais como: maltose, sacarose e galactose (ENTIAN *et al.*,1985).

A fase germinativa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* acumula dois tipos de depósitos de glicose: o glicogênio e a trealose.

O glicogênio é polissacarídeo ramificado de elevado peso molecular. É formado pela junção da cadeia linear α (1,4) – glicosil com carbonos ligados na posição α (1,6).

A trealose é um dissacarídeo não reduzido e composto de duas moléculas de glicose ligadas na posição α (1,1).

Diversos trabalhos têm ilustrado importantes variações nos níveis desses dois estoques de fonte de carbono durante as diversas fases do cultivo do microrganismo.

Segundo FRANÇOIS & PARROU (2000), é possível às células de *Saccharomyces cerevisiae* crescer em meio contendo trealose como fonte de carbono ocorrendo, neste caso, uma extensa fase lag devido à indução do consumo de trealose. Sabe-se, também, que o consumo de trealose é favorecido em meios que contenham maltose ou α -metilglucosídeo e seu consumo é fortemente inibido em meios contendo glicose, galactose ou etanol. O consumo de glicogênio é possível quando temos amilase, catalisada por α -glicosidases, que produz glicose, ou por uma seqüência de reações envolvendo a fosforilação e produção de glicose-1-fosfato ou glicose.

A glicose atua como um importante mecanismo regulatório na levedura *Saccharomyces cerevisiae*, a qual tem seus níveis de transcrição muito afetados pela repressão pela glicose. O sinal que inicia a repressão pela glicose ainda é desconhecido, mas dados indicam que ele está localizado sobre ou através dos níveis de glicose-6-fosfato, o que sugere o envolvimento da concentração extra ou intracelular de glicose ou o fluxo de glicose no início da repressão.

A habilidade da glicose em reprimir a expressão de genes, através da inibição da transcrição, é chamada de repressão catabólica do carbono ou repressão por glicose. Os genes que estão sob o controle da repressão por glicose codificam enzimas que estão envolvidas na gliconeogênese, ciclo de Krebs, respiração, desenvolvimento mitocondrial e na utilização de outras fontes de carbono além de glicose, frutose ou manose.

Apesar de diversas proteínas e interações entre proteínas estarem ligadas à repressão catabólica, os sinais que iniciam a transdução que promove a repressão por glicose não têm sido bem identificados.

Segundo observado por MEIJER *et al.* (1998), os parâmetros que estão ligados ao caminho que promove a geração do sinal inicial para a repressão são o aumento na concentração (intra ou extracelular) de glicose ou o aumento no fluxo de glicose pela membrana.

Existem dois sistemas de captação de glicose pela *Saccharomyces cerevisiae*, sendo um com baixa e outro com alta afinidade.

O sistema de captação de baixa-afinidade, independe de Hexoquinase (primeira enzima da Via Glicolítica, responsável pela formação de 2 moléculas de ATP e Piruvato), seria aquele onde ocorre apenas uma difusão facilitada.

O sistema de captação de alta-afinidade é dependente de Hexoquinase, das condições de cultivo e pode ser reprimido pela glicose. Este sistema de captação é reduzido na presença de elevadas concentrações de glicose e, portanto, mostra-se mais presente quando as células crescem ou são transferidas para um meio com baixa concentração de glicose (DOES & BISSON,1989).

Segundo RONNE (1995), os microrganismos usualmente desativam uma série de genes em presença de glicose e a repressão por glicose durante a Gliconeogênese envolve mais de um mecanismo, sendo o principal, a repressão promovida pelo gene *MIG1*.

O controle da respiração também pode ser promovido pelo efeito de repressão catabólica sobre a expressão dos genes promotores da Via Respiratória. A repressão catabólica é indiretamente mediada através do controle do gene *HAP4*, o qual é reprimido pela Glicose.

A regulação da Glicose ainda pode envolver o controle da degradação do RNAm, o qual contribui de forma significativa para a regulação da Glicose de alguns RNA's mensageiros manifestados durante a respiração.

POSTMA *et al.* (1988) afirmaram que *Saccharomyces cerevisiae* pode fermentar glicose ou etanol sobre condições anaeróbias, onde estas são as únicas fontes possíveis de energia. Já sobre condições aeróbias, ocorre preferencialmente a respiração podendo, no entanto, ocorrer fermentação alcoólica mesmo diante da presença de oxigênio (aerobiose). Originalmente, este desvio no metabolismo para a via fermentativa em condições aeróbias é promovido pela repressão por glicose, pois, diante da presença de elevadas concentrações residuais de Glicose ocorreu uma diminuição progressiva na velocidade específica de consumo de O₂ (Q_{O2}), acompanhado pela

degradação dos componentes da Via Respiratória e repressão das diversas enzimas que atuam no Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos.

PRONK *et al.* (1996) define Efeito *Crabtree* como a fermentação alcoólica sob condições aeróbias e é descrito como sendo um dos fenômenos metabólicos mais importantes presentes em processos industriais de *Saccharomyces cerevisiae*, especialmente os ligados à produção de biomassa.

Segundo HULL (1991), uma levedura pode ser considerada *Crabtree* positiva se esta sofrer uma repressão de seu metabolismo oxidativo em altas concentrações de glicose presente no meio de cultivo.

Nesta situação temos um acúmulo de biomoléculas em sua forma reduzida, especialmente o NADH gerado pela Via Glicolítica, uma vez que a produção de NADH será maior que a capacidade que a célula tem de reoxidá-la através da doação de elétrons para o O₂ presente no meio, e que constitui o acceptor final de elétrons neste caso. Com isso, a célula passa a reoxidar o NADH através da reação de conversão do Piruvato em Etanol.

O Efeito *Pasteur* também pode ser identificado em células de *Saccharomyces cerevisiae*, porém, irá ocorrer somente em condições onde o fluxo metabólico da Via Glicolítica estiver bem reduzido (baixíssimo crescimento celular). É caracterizado por uma supressão da capacidade fermentativa da levedura na presença de oxigênio e promove um aumento da afinidade pelo sistema respiratório por Piruvato, Acetaldeído e NADH em relação à Via Fermentativa (PRONK *et al.*, 1996).

3.2.3.2. Fonte de Nitrogênio

A ausência ou limitação de fontes de nitrogênio é o principal fator de influência na inativação dos transportadores de açúcares devido a diversos fatores que terminam por estimular a degradação de proteínas. Ou seja, a inativação catabólica não deve ser promovida especificamente pelos mecanismos de controle de glicose, mas pela estimulação ao mecanismo regulador das proteínas principais ligados à deficiência em nitrogênio. Sendo

assim, pode-se afirmar que a presença de uma fonte de nitrogênio deve diminuir a inativação.

LUCERO *et al.* (2001) verificaram que em diversos casos estudados a velocidade de inativação dos transportadores foram menores na presença do que na ausência de uma fonte de nitrogênio. Ainda foi verificado que o tempo de meia-vida aumenta quando existe fonte de nitrogênio presente mas o mesmo não acontece quando da presença de aminoácidos no meio.

Os íons NH_4^+ , presentes quando da utilização de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, são considerados tóxicos para as células diante de elevadas concentrações. Ele pode ser assimilado primeiro nos aminoácidos e depois em outras biomoléculas que contêm nitrogênio. O ponto crítico de entrada destes íons está ligado a dois aminoácidos (Glutamato e Glutamina), pois o grupo amino presente nos outros aminoácidos geralmente é derivado do grupo amino do glutamato através de reações de transaminação. Portanto, o NH_4^+ é assimilado pela célula através de uma reação de biossíntese envolvendo o glutamato e catalisada pela enzima glutamina sintetase, que apresenta alta afinidade por NH_4^+ . O Glutamato, por sua vez, é gerado pela reação entre α -cetoglutarato e glutamina na presença de NADPH e H^+ , sendo esta reação catalisada pela enzima glutamato sintase (LEHNINGER *et al.*, 1995).

O efeito de repressão ocasionado por excesso de moléculas de amônia no meio é conhecido como “Efeito Amônia” e foi observado com a variação da atividade da NAD-Glutamato Desidrogenase. A maior atividade foi observada em meios limitados em moléculas de amônia.

LANG *et al.* (1997) verificaram que a quantidade da fonte de nitrogênio alimentada durante o cultivo interfere na produção da proteína de interesse, bem como a relação carbono-nitrogênio imposta no meio de cultivo, devido ao aumento no número de íons amônio e seu efeito indesejável sobre o metabolismo celular.

RICCI-SILVA (1998) verificou que além das tradicionais fontes de nitrogênio, há também alguns aminoácidos que quando adicionados ao meio

de cultivo podem aumentar a produção de enzimas como a Hexoquinase e a Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.

LANG *et al.* (1997) utilizaram diversas fontes de aminoácidos (caseína, peptona e extrato de levedura) para enriquecer o meio e observaram que em todos os casos testados houve um aumento na produção da proteína heteróloga de interesse.

As leveduras podem ter uma alteração no comportamento gerada por desvios metabólicos, que por sua vez, são promovidos por efeitos como o *Crabtree* e o *Pasteur*. Estes mecanismos estão diretamente ligados ao balanço entre a capacidade fermentativa e respiratória da levedura.

3.2.4. Influência da Agitação e Aeração

O estudo da agitação e aeração em processos fermentativos também é essencial para o desenvolvimento das melhores condições de crescimento do microrganismo considerado. Diversos autores afirmam que os objetivos principais das condições de agitação e aeração são a dispersão das bolhas de ar, com conseqüente suprimento de oxigênio aos microrganismos, a manutenção das células em suspensão e o aumento da transferência de calor e massa no meio (AIBA *et al.*, 1973; WANG *et al.*, 1979; LEE, 1992).

Para microrganismos facultativos, como *S. cerevisiae*, o oxigênio tem crucial importância em todo metabolismo porque ele participa da geração de energia através da cadeia de respiração dentro da mitocôndria, que é fundamental para obtenção de uma velocidade de crescimento específico significativa (SILVA *et al.*, 2001).

Mostra-se de fundamental importância abordar o problema da transferência de oxigênio em processos fermentativos aeróbios, que nada mais é que a dissolução de oxigênio no meio de cultura para que o microrganismo possa exercer atividades.

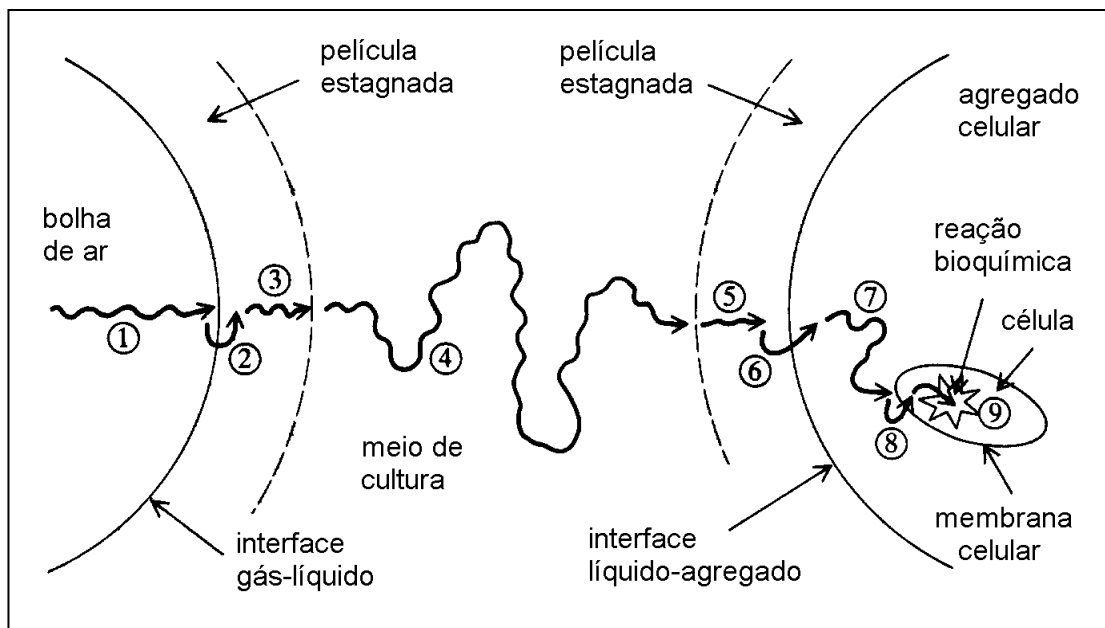
Do ponto de vista bioquímico, o oxigênio é o último elemento a aceitar elétrons, ao final da cadeia respiratória, sendo então reduzido à água, permitindo que ocorra a reoxidação das coenzimas que participam das reações de desidrogenação (ao longo da Glicólise e Ciclo de Krebs) e, ainda,

permitindo a estocagem de energia através da passagem das moléculas de ADP para ATP. Estas últimas, por sua vez, irão participar necessariamente nas reações de sínteses de moléculas, para a sobrevivência das células e para o surgimento de novas células, no processo de proliferação da biomassa microbiana, para as quais é fundamental a introdução de energia. Assim sendo, um cultivo que seja altamente eficiente, ocorrendo com elevadas velocidades de crescimento celular, implica em elevadas velocidades de consumo de substrato, a fim de que haja abundância de elétrons transportados na cadeia respiratória (CTE – Cadeia de Transporte de Elétrons) e, com isso, gerar mais ATP; mas significa também, a necessidade de existência de oxigênio dissolvido, a fim de que estes elétrons sejam drenados para fora da célula ao final da cadeia.

Para que ocorra a oxidação de um mol de Glicose são necessários seis moles de oxigênio a serem consumidos, o que torna óbvio a necessidade de se agitar e aerar um meio de cultura no caso de processos fermentativos aeróbios. Por ser muito pouco solúvel em meio líquido, podendo atingir apenas alguns miligramas por litro, em termos de concentração de saturação, existe a necessidade de estarmos suprindo a demanda de oxigênio durante o processo fermentativo para que as células encontrem a possibilidade de converterem, de forma adequada, o substrato no produto desejado. Sendo assim, de nada adianta dissolver centenas de gramas por litro de glicose, além das quantidades necessárias dos demais nutrientes, sem se imaginar que se deverá introduzir, ao longo do processo fermentativo, o oxigênio necessário para suportar a condição de aerobiose, tendo em vista a limitada capacidade de estocar O_2 na solução. Diante desta situação, pode-se afirmar que a extensão de um processo descontínuo aeróbio e, sua conseqüente, obtenção de elevadas concentrações de bioprodutos de interesse, depende totalmente da capacidade de se transferir oxigênio para a fase líquida, especialmente, nos instantes mais avançados do processo, onde a concentração celular deve ser elevada, existindo situações onde as condições de operação a serem empregadas serão definidas em função da capacidade de transferência de oxigênio. O transporte de oxigênio desde a

bolha de ar até o interior da célula é afetado e controlado por uma grande resistência a essa transferência de oxigênio e que pode ser subdividida em diversas resistências específicas mostradas na Figura 3.1.

FIGURA 3.1.: Diagrama esquemático dos passos envolvidos no transporte do oxigênio de uma bolha de ar para o interior de uma célula microbiana (BAILEY, OLLIS, 1986).



As resistências apresentadas na Figura 3.1. podem ser conceituadas da seguinte forma:

R₁ : Difusão do gás do interior da bolha até a interface gás-líquido

R₂ : Passagem pela interface gás-líquido

R₃ : Difusão através da película estagnada de líquido, externa à bolha

R₄ : Transporte através do meio líquido

R₅ : Difusão através da película estagnada externa ao agregado celular

R₆ : Passagem pela interface película estagnada-agregado celular

R₇ : Difusão no agregado celular

R₈ : Passagem pela membrana celular

R₉ : Difusão interna na célula

Estas resistências, por sua vez, podem ser agrupadas em três grandes grupos de resistências:

- 1) Transferência do oxigênio da bolha para a solução.
- 2) Transferência do oxigênio dissolvido através do meio de cultivo.
- 3) Utilização do oxigênio pela célula.

Considerando que ocorra simples difusão na transferência de oxigênio dissolvido pelo meio de cultivo (devido a uma agitação adequada), o segundo grupo de resistência pode ser considerado desprezível, restando somente duas grandes resistências interferindo no transporte da molécula de oxigênio: A transferência da Fase Gasosa para a Fase Líquida e a própria reação bioquímica no interior da célula.

A demanda de oxigênio no início do processo fermentativo descontínuo padrão é bastante baixa devido à baixa concentração celular. Porém, com o crescimento celular, esta demanda aumenta com o tempo, tornando obrigatório o fornecimento contínuo de oxigênio.

Uma célula consome mais oxigênio, por unidade de tempo, quanto maior for a velocidade de crescimento existindo um limite, ou seja, uma velocidade dita máxima, a qual nada mais é do que a capacidade máxima de síntese das enzimas que participam do processo. Esta velocidade depende das condições de cultivo (pH, temperatura, etc) e do meio de cultura.

ABRAHÃO-NETO *et al.*, (1997) estudaram a influência de vários fatores na produção de G6PDH por *S. cerevisiae* e verificaram que a maior atividade da enzima ocorria com uma taxa de oxigênio dissolvido de $4,0 \text{ mg ar.L}^{-1}$, sendo que a diminuição da atividade enzimática observada com valores superiores e inferiores de oxigênio dissolvido tiveram como causa a reduzida taxa de crescimento sob estas concentrações de oxigênio. Essa observação deve-se ao fato da G6PDH participar da via das pentoses, caminho pelo qual as células sintetizam ribose-6-fosfato, um dos constituintes chave dos ácidos nucléicos e nucleotídeos. Dado que a demanda por ácidos nucléicos durante a fase de crescimento máximo é acentuada, a atividade específica da G6PDH também aumenta. Porém, segundo OURA (1976), a contribuição do ciclo das

pentoses no crescimento aeróbio da levedura é pequeno destacando-se apenas sua função de fornecimento de NADPH reduzido para reações biossintéticas. Deste modo, poucas mudanças foram observadas por esse autor na atividade da G6PDH sob diferentes regimes de aeração.

Segundo PINHEIRO *et al.* (1997), *Saccharomyces cerevisiae* cresce melhor quando o oxigênio é fornecido através da alimentação com ar do que quando a alimentação é efetuada com oxigênio puro. Oxigênio puro promoveu um aumento na produção de etanol e o crescimento celular foi inibido tanto pelo aumento da vazão de ar como de oxigênio puro.

O O₂ passa a ter efeitos tóxicos nos microrganismos aeróbios sob pressões parciais não muito maiores que no ar sobre 1 bar. Esta toxicidade é iniciada pela redução univalente do O₂, à qual, conduz a danos às enzimas, ácidos nucléicos ou lipídeos. Sendo assim, temos que um fornecimento acima do necessário pela demanda de oxigênio pode causar efeitos adversos nas células de leveduras.

OURA *et al.* (1976) concluíram que a atividade de enzimas da Via Glicolítica, bem como a álcool desidrogenase e a piruvato descarboxilase são afetadas pela condição de aeração imposta. A atividade da enzima álcool desidrogenase, por exemplo, cai com o aumento da quantidade de oxigênio contido no gás fornecido, mas ocorre um aumento em sua atividade quando temos elevadas intensidades de aeração. Para a relação entre a atividade da enzima G6PDH e a vazão de aeração empregada, temos que poucas mudanças são observadas na atividade da enzima sobre diferentes condições de aeração, exceto quando se utilizam vazões que forneçam concentrações tóxicas de oxigênio, onde a atividade enzimática dobra.

SILVA *et al.* (2001) verificaram a influência da agitação e aeração na produção de Hexoquinase e concluíram que as melhores condições de aeração são as de vazão moderada de ar resultando em coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}) da ordem de 60 h⁻¹. A enzima teve sua formação afetada pela utilização de vazões maiores de oxigênio, o que seria devido à saturação da via respiratória pelo oxigênio.

OURA *et al.* (1974) concluíram que a capacidade da levedura seguir um metabolismo aeróbio varia quando o cultivo é efetuado sob diferentes intensidades de aeração e a máxima atividade seguindo a via respiratória foi observada para os crescimentos com 10% de oxigênio no gás de mistura da aeração.

Segundo SILVA *et al.* (2002), as melhores condições de aeração para a produção da enzima G6PDH são obtidas diante de aerações moderadas (1,7 vvm e 400 rpm), gerando um $K_L a$ igual a 60 h^{-1} . Os resultados indicaram, também, que a produção desta enzima pelo microrganismo está ligada à formação de biomassa, ou seja, ao crescimento celular, que por sua vez, é definido pelas condições operacionais e do meio de cultivo.

3.2.5. Metabolismo da levedura *S. cerevisiae*

Segundo FLORES *et al.* (2000), açúcares são utilizados por quase todas as leveduras conhecidas e todas têm em comum no seu metabolismo a conversão da Glicose-6-Fosfato (ou Frutose-6-Fosfato) em Piruvato através de uma Via Glicolítica comum. O destino metabólico do Piruvato é que será diferenciado de acordo com a espécie de levedura e as condições de cultivo.

No caso específico de *Saccharomyces cerevisiae*, a glicose e outros açúcares podem causar um forte prejuízo à capacidade respiratória (Efeito *Crabtree*) de forma que, mesmo em presença de ar, *Saccharomyces cerevisiae* fermenta em cultivos descontínuos. Desta forma temos uma levedura *Crabtree* positiva. Entretanto, na maioria dos casos em condições aeróbias, o Piruvato é oxidado para CO_2 através do Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos (TCA).

Sendo assim, temos que a Glicólise e o Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos são as principais vias metabólicas para a *Saccharomyces cerevisiae* e são responsáveis diretos pela produção de energia e redução dos equivalentes na forma de ATP, NADH e NADPH, além da geração de grande parte dos compostos precursores necessários à biossíntese de biomoléculas.

As membranas celulares não são livremente permeáveis a todos os componentes que possam estar presentes no meio. O primeiro passo no

metabolismo das hexoses é o transporte de carboidratos, exceto nos casos onde um di ou trissacarídeo é hidrolisado fora da célula. Este transporte através da membrana é conduzido por transportadores específicos chamados permeases e para a *Saccharomyces cerevisiae* este transporte consiste de uma difusão facilitada no caso de meios contendo glicose, frutose ou manose.

O metabolismo de dissacarídeos é precedido pela hidrólise para outros monômeros e dependendo da espécie de levedura e da natureza do açúcar a ser metabolizado, esta hidrólise acontece fora da membrana celular, no espaço periplasmático, ou dentro da célula através do transporte deste dissacarídeo. No caso de *Saccharomyces cerevisiae* esta hidrólise é feita em sua maior parte pela invertase extracelular repressível pela glicose.

A hexose intracelular entra na Via Glicolítica após uma etapa inicial de fosforilação, onde duas hexoquinases são responsáveis pela fosforilação da glicose, frutose e manose enquanto que uma glicoquinase é responsável pela fosforilação de glicose e manose, que são obtidos a partir da transcrição dos genes HXK1 e HXK2 (Hexoquinases) e GLK1 (Glucoquinase), cuja expressão é controlada pela concentração de glicose. As hexoquinases também são reprimidas pela presença de Trealose-6-Fosfato, o que a transforma em uma importante ferramenta de controle da glicólise em *Saccharomyces cerevisiae*. A Fosfofrutoquinase é considerada o “gargalo” da Via Glicolítica, pois, a superprodução de genes que codificam a fosfofrutoquinase não aumenta a fermentação em *Saccharomyces cerevisiae*.

A oxidação do Piruvato, após a etapa final da Via Glicolítica, para CO₂ ocorre através do Ciclo de Krebs, onde para entrar no ciclo, o Piruvato sofre uma descarboxilação oxidativa catalisada pela Piruvato Desidrogenase, um complexo multienzimático formado por três componentes (Piruvato Desidrogenase, Di-hidrolipoamidoacetil transferase e di-hidrolipoamido Desidrogenase).

As reações catabólicas geradoras de NADH ocorrem tanto no citosol como na mitocôndria e, durante a fermentação, o NADH produzido pela Via

Glicolítica é regenerado a NAD^+ através da formação de Etanol enquanto que o NADH formado por outras reações diferentes das da Via Glicolítica são regenerados através da produção de Glicerol.

Durante o crescimento em aerobiose, as enzimas NADH Desidrogenases mitocondriais também participam da reoxidação em NAD^+ . A reoxidação do NADH pela via respiratória é a principal fonte de energia para as células com um metabolismo respiratório. Esta reoxidação está acoplada pela produção de ATP no processo conhecido como Fosforilação Oxidativa.

A Via das Pentoses constitui uma importante rota implicada na produção de NADPH necessário às reações de biossíntese e de Ribose-5-Fosfato para a síntese de ácidos nucleicos e cofatores nucleotídeos. Esta Via também gera Eritrose-4-Fosfato, presente como precursor na síntese de aminoácidos aromáticos. A Via tem início com duas reações oxidativas irreversíveis e uma outra reversível e não-oxidativa. A divisão entre a Via Glicolítica e a Via das Pentoses ocorre no nível da Glicose-6-Fosfato e a concentração da fonte de nitrogênio no meio influencia na quantidade de açúcar a ser direcionado a cada uma dessas Vias, sendo que, a presença de aminoácidos promove a queda na atividade da Via das Pentoses, direcionando maior parcela dos açúcares para a Via Glicolítica.

Em *Saccharomyces cerevisiae* existem quatro genes que codificam isoenzimas de álcool-desidrogenases, sendo que o gene ADH1 codifica a isoenzima durante a fermentação e é induzida pela glicose enquanto que o gene ADH2 codifica a isoenzima que está ligada à utilização do etanol como fonte de carbono, sendo esta, repressível pela presença de glicose.

Segundo PRONK *et al.* (1996), nas leveduras o Piruvato é um ponto fundamental entre a dissimilação respiratória e a fermentação alcoólica. A etapa mais lenta da Via Glicolítica está ligada à conversão de trioses-fosfatos em Piruvato. Durante o crescimento fermentativo, o Piruvato pode ser convertido em diversos compostos, inclusive moléculas de hidrogênio, CO_2 e alguns metabólitos orgânicos, enquanto que durante a respiração celular, o Piruvato segue para o Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos, onde ocorre sua completa oxidação para CO_2 e H_2O . Quando a célula segue um

metabolismo fermentativo, os principais metabólitos excretados por ela serão o Etanol e o CO₂, sendo que o Glicerol também pode ser encontrado, porém, não como um produto obtido primariamente pela oxidação do açúcar e sim devido a reoxidação do NADH gerado pela Via Glicolítica. Como durante o metabolismo respiratório, o NADH é reoxidado por enzimas específicas na mitocôndria, no caso de limitação ou ausência de oxigênio, esta reoxidação será efetuada através da formação de Glicerol, funcionando, portanto, como uma válvula redox.

JIN *et al.* (1997) avaliaram os fluxos metabólicos obtidos durante a produção de uma proteína heteróloga em *Saccharomyces cerevisiae* e identificaram um aumento na atividade da Via das Pentoses quando de um aumento na produção da proteína heteróloga e resultando também em um aumento no fator de conversão em ATP.

A fonte de carbono teve sua utilização ampliada durante a fase exponencial de crescimento da ordem de 2 e 5 vezes quando comparada, respectivamente, com o final da fase exponencial e a fase estacionária em presença de meio mínimo de Galactose e em cultivos descontínuos.

3.3.Enzimas

As enzimas tornaram-se importantes ferramentas práticas não só na área médica, mas também, para a indústria química, no processamento de alimentos, na agricultura e na indústria farmacêutica.

Devido a essa grande expansão no uso de enzimas, nos últimos anos vem crescendo ainda mais o interesse na produção das mesmas. Existem muitas aplicações comerciais para as enzimas, entre elas a Pectinase utilizada durante a fabricação de sucos de frutas (SANTHANAM, 1992); a Invertase utilizada para a obtenção de açúcar invertido (DURANTI, 1991; KOO *et al.*, 1998); a Xilose-redutase utilizada na produção de xilitol por processo enzimático (SILVA *et al.*, 1996); a Xilanase e seu potencial de aplicação na etapa de branqueamento na indústria de papel e celulose (VIKARI,1991); a Hexoquinase e a Glicose-6-Fosfato Desidrogenase e suas

aplicações em métodos analíticos para se medir teores de glicose, frutose, manose, ATP e creatinquinase (ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1996; RICCI-SILVA, 1998; SILVA, 2000); e a Glicose-Oxidase e seu potencial de aplicação para a obtenção de ácido glicônico (KAPAT *et al.*, 1998).

A diversidade de áreas de potencial de aplicação de enzimas torna necessária a realização de estudos que desenvolvam processos de obtenção e purificação eficientes e passíveis de ampliação de escala, de forma a tornarem-se viáveis comercialmente.

O emprego de microrganismos recombinantes vem de encontro à expectativa de aumento na disponibilidade de enzimas, como a glicose-6-fosfato desidrogenase, já utilizadas ou que passariam a estar disponíveis com a aplicação destas novas técnicas de modificação genética. A redução de custos de produção, também é uma perspectiva real (BUCKLAND and LILLY, 1993).

A pesquisa sobre enzimas está ligada à maior parte da história da bioquímica, sendo, sua atividade catalítica, descrita desde o século XIX, quando tiveram início os estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago e a conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por diversos extratos vegetais (LEHNINGER *et al.*, 1998). O estudo das enzimas apresenta grande importância prática, uma vez que, diversas doenças são ocasionadas pela deficiência funcional ou mesmo pela ausência de uma ou mais enzimas em um indivíduo. Condições anormais podem ocorrer também pelo excesso da atividade de uma enzima até por serem, as enzimas, as principais ferramentas de regulação do metabolismo.

Os microrganismos são capazes de alterar seu metabolismo em resposta às mudanças no meio. Esta alteração é obtida por mecanismos regulatórios capazes de conferir flexibilidade ao metabolismo. Os principais mecanismos regulatórios estão ligados à síntese das enzimas, bem como, à regulação dos seus níveis de atividade (WARD, 1991).

As enzimas são proteínas, constituídas por uma ou mais cadeias polipeptídicas, e que são capazes de catalisar de forma específica uma dada reação bioquímica. As enzimas apresentam quatro características principais:

- Reduzem a E_a (Energia de Ativação), levando a altas velocidades de reação.
- Apresentam elevada especificidade, ou seja, cada enzima tem uma estrutura que permite a ela se encaixar perfeitamente a apenas um determinado substrato de forma a promover a catálise.
- São sintetizados pela própria célula.
- Tem concentração e atividades moduláveis, ou seja, podem ser reguladas, permitindo um ajuste em diferentes condições fisiológicas.

As enzimas são catalisadores, ou seja, aceleram a velocidade de uma reação sem serem consumidos durante o processo. O uso crescente desses catalisadores em aplicações industriais deve-se em muito a essas características específicas, bem como aos avanços das pesquisas em genética e na otimização de processos fermentativos para a produção de enzimas. Cada enzima apresenta um substrato específico, ou seja, só irá se ligar a um determinado reagente, de forma que sua estrutura fique tensionada e amoldada para que se aproxime da estrutura característica do estado de transição da reação. Esse amoldamento faz com que o substrato fique mais próximo dos grupos radicais "R", no sítio ativo da enzima, e que são os responsáveis pela catálise.

Cada enzima possui em sua estrutura quaternária uma região definida por sítio ativo onde é feita a ligação com o substrato. Trata-se de uma região pequena e bem definida formada por resíduos de aminoácidos que foram trazidos mais próximos uns dos outros pelos desdobramentos da cadeia polipeptídica que compõe a estrutura terciária da enzima. É através do sítio ativo que a enzima consegue reconhecer o seu substrato uma vez que, por se tratar de uma cavidade com forma definida, é necessário que o substrato tenha forma espacial adequada para alojar-se no centro ativo, além de grupos químicos capazes de estabelecer ligações precisas com os radicais do centro ativo.

Segundo VITOLO & ROCHA-FILHO (1998), a utilização de enzimas em escala industrial é de fundamental importância, devendo ser analisada, no entanto, a relação custo/benefício. Com relação à aplicação na indústria, as enzimas podem ser classificadas em três grupos:

- Enzimas utilizadas na produção de alimentos e ingredientes alimentícios.
- Enzimas utilizadas na produção de bebidas.
- Enzimas utilizadas na produção de bens variados, como os reagentes analíticos.

A estabilidade de uma enzima é afetada por duas condições do meio: temperatura e pH. O aumento da temperatura favorece a velocidade de uma reação, pois, proporciona uma maior energia cinética e ocasionando um aumento no número de choques entre as moléculas (enzima e substrato) por unidade de tempo. Tem-se, porém, que o excesso dessa energia cinética pode romper as estruturas terciárias e quaternárias de forma que a enzima acaba perdendo sua atividade catalítica. (SEGEL, 1979).

Segundo HALL (1996), a quantidade de calor necessário para desnaturar uma enzima varia de acordo com a molécula e este fenômeno depende também do pH e da força iônica do meio.

O pH também afeta a estabilidade das enzimas de forma que estas apresentam um valor ou uma região de pH ótimo onde sua atividade será máxima. Isto ocorre porque as cadeias laterais de alguns aminoácidos agem como ácidos ou bases fracos e realizam funções críticas no sítio ativo da enzima e esta variação no estado de ionização é uma das razões da variação na atividade. A mudança no pH pode eliminar uma interação iônica essencial, através da remoção de prótons de grupos residuais de aminoácidos, de forma a afetar a estabilidade da conformação ativa da enzima (LEHNINGER *et al.*, 1995).

Segundo HALL (1996), as enzimas quando submetidas a valores extremos de pH, tanto ácidos como básicos, podem desnaturar, expondo com isso grupamentos hidrofóbicos. Esta desnaturação é devido à queda nas

interações eletrostáticas e, em muitos casos, pode ocorrer inclusive uma precipitação dessa molécula.

3.3.1. Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

A glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) é a primeira enzima do processo oxidativo da via pentose-fosfato, convertendo a Glicose-6-Fosfato em 6-Fosfogliconato e é classificada bioquimicamente como uma oxidorreductase.

A G6PDH vem sendo extensivamente purificada e é obtida, principalmente, por leveduras, *E. coli* e tecidos animais. A coenzima específica para a reação catalisada por essa enzima é o NADP⁺, podendo, no caso de outros microrganismos (*Leuconostoc mesenteroides*, *Acetobacter suboxydans* e *Pseudomonas aeruginosa*) apresentar dois cofatores específicos (NAD⁺ e NADP⁺).

A G6PDH obtida a partir de *Leuconostoc mesenteroides* apresenta massa molar de 104kDa e é composta por dois monômeros de 55kDa. O pH ótimo é igual a 7,8, ponto isoelétrico em torno do pH 4,6 e coeficiente de extinção igual a 11,5 (pH 7,2). Os principais ativadores desta enzima seriam o Mg²⁺ e HCO₃⁻ e os principais inibidores da sua atividade enzimática seriam o Piridioxal – 5 – Fosfato, que promove uma inibição competitiva com o substrato (G6P) e não-competitiva com o NADP⁺. O íon Al³⁺ também pode ser considerado um inibidor e, esta característica, é devida a seus efeitos sobre mudanças conformacionais induzidas por este íon. No caso de leveduras, sabe-se que a massa molar de uma sub unidade da enzima equivale a 56kDa e que ela será altamente específica a NADP⁺.

O NADPH formado pela reação catalisada pela G6PDH é utilizado em diversos processos da biossíntese como, por exemplo, na formação dos ácidos graxos (REILLY & ALLRED, 1995). Por formar NADPH durante a reação catalisada por ela, a G6PDH é fundamental para a manutenção celular, já que será responsável diretamente pela regulação da concentração deste importante cofator. Por participar da Via das Pentoses, a G6PDH também tem importância reconhecida devido à formação de Ribose-5-

Fosfato, precursor necessário na biossíntese de DNA e RNA pela célula (SEVERO,1979).

Segundo DUMITRU *et al.* (1995), a radiação ultravioleta e o acetato de cobre são sistemas geradores de radicais livres e, estes radicais, reduzem a atividade da enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase em *Saccharomyces cerevisiae*. A queda na atividade enzimática está ligada ao aumento na concentração de produtos gerados pela peroxidação de lipídeos e a enzima parcialmente inativada pela ação dos radicais livres apresenta um aumento na sensibilidade ao calor de desnaturação quando comparada com a enzima livre destes radicais.

3.4. Obtenção de produtos geneticamente modificados

O desenvolvimento sustentável tem se tornado uma prioridade na política dos fabricantes mundiais. Entre as diversas tecnologias com potencial para alcançar a meta da sustentabilidade, a biotecnologia teria um importante lugar, especialmente nos campos de produção de alimentos, matérias-primas e energia renováveis, prevenção da poluição e biorremediação (ZECHENDORF, 1999).

A *E.coli* foi o primeiro microrganismo de eleição como hospedeiro para a formação de bioprodutos a partir do desenvolvimento da tecnologia do DNA Recombinante e, isto se deu, porque a *E.coli* apresentava seu sistema genético bem caracterizado, o que, por sua vez, facilitava a obtenção de altos níveis de expressão (YIN *et al.*, 2000 ; WARD, 1991).

O primeiro bioproduto recombinante a conseguir liberação para a produção foi a insulina humana obtida a partir do cultivo de cepas recombinantes de *E.coli* (WARD, 1991).

A grande limitação para a obtenção destes bioprodutos recombinantes sempre esteve ligada à produção em larga escala, onde manter os mesmos níveis de produtividade obtidos em escala laboratorial eram quase impossíveis (YING-LIN *et al.*, 2000).

Uma desvantagem na utilização de *E.coli* como um hospedeiro vantajoso está ligado à sua incapacidade de excretar proteínas recombinantes e por estas células conterem uma série de endotoxinas que deverão encarecer o processo posterior de purificação.

Outro microrganismo que pode ser utilizado na obtenção de bioprodutos recombinantes é o *Bacillus subtilis*, por não ser patógeno, poder crescer em aerobiose, não produzir lipossacarídeos e ser capaz de secretar proteínas extracelulares no meio. Uma desvantagem está no fato de terem diminuídos os níveis de expressão dos genes heterólogos neste microrganismo com relação aos níveis de expressão alcançados pela *E.coli*.

As leveduras também são bastante empregadas, porém, apresentam níveis de expressão menores que os da *E.coli*. *Saccharomyces cerevisiae* tem sido modificada geneticamente mediante o emprego de técnicas de engenharia genética para a obtenção de produtos comerciais como o antígeno de superfície do vírus da *Hepatite B*, entre outras proteínas heterólogas (WARD, 1991; CHUNG *et al*, 1997).

A Glicose-Oxidase é uma enzima que catalisa a oxidação de β -D-Glicose para D-Glucono- δ -Lactona e peróxido de hidrogênio e é encontrada originalmente em *Aspergillus niger*. KAPAT *et al.* (1998) descrevem uma modificação genética em *S.cerevisiae* onde foi construído um vetor contendo um promotor GAL10, da própria *S.cerevisiae*, uma seqüência de sinal de α -amilase e a estrutura do gene da GOD do *A .niger*, além do terminal GAL7 da levedura. A modificação genética possibilitou a produção de GOD pelo cultivo de *S.cerevisiae* recombinante em Processo Descontínuo-Alimentado.

Segundo O'KENNEDY *et al.* (1995), a instabilidade de vetores recombinantes em organismos comercialmente importantes representa um obstáculo significativo para a produção em larga escala de proteínas através de elevados níveis de expressão de seus genes heterólogos. Rearranjos estruturais e instabilidades segregacionais podem resultar na perda do gene de interesse. A instabilidade segregacional irá ocorrer quando o plasmídeo no hospedeiro perde a capacidade de se transferir para as células-filhas.

A perda do plasmídeo pode ocorrer pela competição entre as duas subpopulações presentes (com e sem plasmídeo) e pode ser estimulada pela menor velocidade de crescimento obtida pelas células recombinantes. A menor velocidade de crescimento é gerada pelo aumento da carga metabólica, como um resultado direto da necessidade de replicação do plasmídeo e da expressão do gene recombinante.

O uso de *S.cerevisiae* como hospedeiro recombinante apresenta diversas vantagens sobre outros microrganismos por não ser patogênica, não produzir endotoxinas, por ter sido muito estudada e ter grande aplicação em processos industriais (KINGSMAN *et al*, 1987 apud CHUNG *et al.*, 1997).

Segundo LANG *et al.* (1997), *S.cerevisiae* é um hospedeiro muito atrativo pois pode excretar proteínas recombinantes para o meio sem excretar conjuntamente proteínas homólogas de forma que quase a totalidade das proteínas secretadas ser constituída pela proteína de interesse, com isso, facilitando o processo de purificação e resultando numa significativa redução nos custos do processo.

Uma grande variedade de trechos de genes de expressão contendo promotores constitutivos ou induzidos tem sido definidos e construídos para uma superprodução de proteínas heterólogas em *S.cerevisiae* (CHUNG *et al.*, 1997).

As indústrias nos EUA geram mais que 300 milhões de toneladas de lixo perigoso e 600 milhões de toneladas de lixo não perigoso por ano. A Biotecnologia tem dado uma pequena contribuição no tratamento desse lixo, porém apresenta um potencial ainda maior. O desenvolvimento de árvores geneticamente modificadas para auxiliar na separação da lignina de celulose tem economizado US\$ 100 milhões/ano na produção do papel. As indústrias químicas estão interessadas na aplicação de biocatálise e microrganismos modificados geneticamente para minimizar a formação de lixo tóxico sem aumentar o consumo de energia. Indústrias farmacêuticas e de alimentos já aplicam em grande escala técnicas de fermentação com tecnologia genética. Alguns exemplos incluem enzimas utilizadas a frio e a quente visando otimizar o uso de energia e reduzir a quantidade de lixo. Os usos da

engenharia genética nos processos de produção proporcionam uma redução de 41% no consumo de matérias-primas, redução de 48% no consumo de vapor e redução de 49% no consumo de eletricidade (ZECHENDORF, 1999).

O gene da fosfogliceratoquinase 1 (PGK 1) de *S. cerevisiae* codifica um dos mais abundantes níveis de RNAm de determinadas proteínas na célula, compreendendo entre 1% e 5% do total celular (OGDEN *et al.*, 1986 apud LOJUDICE *et al.*, 2001). Portanto, o promotor PGK 1 é uma opção atraente para obtenção de altos níveis de expressão de proteínas. Seqüências codificadoras de proteínas de interesse também tem sido clonadas sob o controle do promotor GAL 1, o qual é um dos mais potentes promotores fortemente regulados na *S. cerevisiae*.

A Engenharia Genética poderá certamente melhorar a eficiência dos microrganismos quando sua capacidade puder ser explorada ao máximo (ZECHENDORF, 1999).