

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	x	
ÍNDICE DE TABELAS	xix	
NOMENCLATURA	xxvi	
1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS DO TRABALHO	4
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1	Processos Fermentativos	5
3.1.1	Processo Descontínuo	6
3.1.2	Processo Descontínuo Alimentado	7
3.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
3.2.1	Influência da Temperatura	14
3.2.2	Influência do pH	15
3.2.3	Influência do Meio de Cultura	17
3.2.3.1	Fonte de Carbono	18
3.2.3.2	Fonte de Nitrogênio	22
3.2.4	Influência de Agitação e Aeração	24
3.2.5	Metabolismo da levedura <i>S.cerevisiae</i>	29
3.3	Enzimas	32
3.3.1	Glicose-6-Fosfato Desidrogenase	36
3.4	Obtenção de produtos geneticamente modificados	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Microrganismo	41
4.2	Esterilização	42
4.3	Transferência para tubos inclinados	42
4.4	Cultivo do pré-inóculo	42
4.5	Cultivo do Inóculo	43
4.6	Rompimento das amostras da fermentação	44
4.7	Processo Fermentativo Descontínuo	44
4.7.1	Descrição de um ensaio descontínuo típico	44
4.7.1.1	Preparo do meio de cultivo	46

4.7.1.2	Coleta de amostras no decorrer do ensaio	48
4.7.2	Variáveis de estudo para o processo descontínuo	48
4.7.2.1	Ensaio variando a relação carbono-nitro-gênio (C/N)	49
4.7.2.2	Ensaio variando a concentração de micronutrientes	49
4.7.2.3	Ensaio variando a concentração de glicose	50
4.7.2.4	Ensaio variando aeração e pH	51
4.8	Processo Fermentativo Descontínuo Alimentado	52
4.8.1	Descrição de um ensaio descontínuo alimentado típico	52
4.8.1.1	Preparo do meio de cultivo	53
4.8.1.2	Coleta de amostras no decorrer do ensaio	54
4.8.2	Variáveis de estudo para o processo descontínuo alimentado	54
4.8.2.1	Ensaio variando o tipo de alimentação	54
4.8.2.2	Ensaio variando o nutriente alimentado	55
4.9	Técnicas Analíticas	55
4.9.1	Determinação da concentração celular	55
4.9.2	Dosagem de proteínas totais	56
4.9.2.1	Estabelecimento da curva de calibração	56
4.9.2.2	Procedimento Analítico	57
4.9.3	Contagem celular em câmara de Neubauer	57
4.9.3.1	Procedimento analítico	58
4.9.3.1.1	Diluição da amostra e carregamento da câmara de Neubauer	58
4.9.3.1.2	Preparo da câmara de Neubauer	58
4.9.3.1.3	Contagem de células	58
4.9.3.1.4	Cálculo do número de células	59
4.9.3.1.5	Cálculo da taxa de inviabilidade	59
4.9.4	Dosagem de glicose	60
4.9.4.1	Estabelecimento da curva de calibração	60
4.9.4.2	Procedimento Analítico	61
4.9.5	Atividade enzimática da glicose-6-fosfato desidrogenase	61
4.10	Metodologia de análise dos resultados	62
4.10.1	Obtenção da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase no Decorrer do Processo (U/L _{meio})	62

4.10.2	Fator de Conversão de Substrato em Células (g/g)	63
4.10.3	Fator de Conversão de Substrato em G6PDH (U/g)	63
4.10.4	Máxima Produtividade em Enzimas (Pr^*_{G6PDH})	64
4.10.5	Máxima Produtividade em Células (Pr^*_X)	64
4.10.6	Produtividade Média em Enzima (Pr_{G6PDH})	64
4.10.7	Produtividade Média em Células (Pr_X)	64
4.10.8	Avaliação da Velocidade Específica Máxima de Crescimento (μ_{Xmax})	64
4.10.9	Velocidades instantâneas e específicas	64
4.10.10	Tempo de Geração (T_g)	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1	Obtenção de G6PDH em processo Descontínuo	66
5.1.1	Ensaio variando concentração de Glicose (D-1 e D-5)	68
5.1.2	Ensaio variando relação carbono-nitrogênio (D-1, D-2 e D-3)	72
5.1.3	Ensaio variando concentração de micronutrientes (D-4 e D-5)	77
5.1.4	Ensaio variando pH e Aeração (D-5 a D-13)	79
5.1.5	Análise dos dados de crescimento celular nos ensaios descontínuos	94
5.1.6	Análise dos dados de consumo de substrato nos ensaios descontínuos	95
5.1.7	Análise dos dados de produção de G6PDH nos ensaios descontínuos	97
5.1.8	Análise dos dados de consumo de ácido e base durante o controle de pH nos ensaios descontínuos	97
5.1.9	Perfis das Curvas de Velocidades Específicas de Crescimento Celular, Consumo de Substrato e Produção de G6PDH	98
5.2	Obtenção de G6PDH em Processo Descontínuo Alimentado	117
5.2.1	Discussão sobre a condição ótima de enchimento e nutriente alimentado	118
5.2.1.1	Discussão dos perfis das curvas de velocidades específicas	138

	de Crescimento Celular, Consumo de Substrato e Produção de G6PDH	
5.2.1.2	Ensaio utilizando vazão constante	138
5.2.1.3	Ensaio utilizando vazão linear decrescente	140
5.2.1.4	Ensaio utilizando vazão linear crescente	143
5.2.1.5	Ensaio utilizando vazão exponencial decrescente	145
5.2.1.6	Ensaio utilizando vazão exponencial crescente	148
5.2.2	Ensaio variando o nutriente alimentado	151
6	CONCLUSÕES	156
6.1	Obtenção de G6PDH em Processo Descontínuo	156
6.2	Obtenção de G6PDH em Processo Descontínuo Alimentado	157
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158
APÊNDICE I	Cálculo da vazão de alimentação (ϕ) e da constante de adição (K) utilizada em cada tipo de alimentação nos ensaios descontínuo alimentados	173
APÊNDICE II	Preparo de reagentes	187
APÊNDICE III	Resultados obtidos nos ensaios em fermentador	193
APÊNDICE IV	Parâmetros Fermentativos dos ensaios descontínuos	219
APÊNDICE V	Parâmetros Fermentativos dos ensaios descontínuo alimentados	226
APÊNDICE VI	Velocidades Específicas obtidas nos ensaios em fermentador	234
ANEXO	Estudo dos métodos mecânicos de rompimento celular	260