

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO

JÚLIO MASSAO TOMA

**Efeito da adição de oxigênio na produção de glicerol
quinase pela Levedura recombinante de *Pichia pastoris***

Orientadora: Profa. Dra. Edwil Aparecida de Lucca Gattás

ARARAQUARA – SP

2011

JÚLIO MASSAO TOMA

**Efeito da adição de oxigênio na produção de glicerol
quinase pela Levedura recombinante de *Pichia pastoris***

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado a Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como
requisito para obtenção do grau de
Farmacêutico Bioquímico.**

**Orientadora: Profa. Dra. Edwil Aparecida
de Lucca Gattás**

Araraquara - SP

2011

AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a todas as pessoas que me ajudaram, apoiaram, ou melhor, que simplesmente passaram por minha vida, afinal foi um longo caminho percorrido até esse momento.

Agradeço a toda minha família, principalmente aos meus pais, por minha educação e pela força que me deram em todos esses anos.

Um agradecimento muito especial a Prof^a Dr. Edwil Aparecida de Lucca Gattás, pela orientação, confiança e dedicação ao trabalho.

Agradeço também aos meus companheiros de laboratório Werner Terrazas e Raquel Aizemberg pelo tempo cedido para o fundamento de meus estudos e auxílio ao trabalho.

Agradeço a meus amigos Sakata, Felipe, Rodolfo, por todos os bons momentos em Caieiras. Aos meus companheiros de República Quebra Tudo, PT, Capiáu, Panda, Blaubus, Oxy, Loide, Debi, Lobão, Tolima, Gota, Selton, Romário e todos ex-moradores por momentos que jamais serão esquecidos. Agradeço também a todos da turma 77 de Farmácia Bioquímica.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO ESTUDO	8
1.1. A LEVEDURA <i>PICHIA PASTORIS</i>	10
1.2. OBJETIVO	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1. MICRORGANISMO.....	15
2.2. MEIOS DE CULTURA	15
2.3. CRESCIMENTOS EM FRASCOS TIPO ERLLENMEYER.....	16
2.4. INDUÇÃO E CRESCIMENTO EM ERLLENMEYERS.....	17
2.5. INDUÇÃO E CRESCIMENTOS EM FERMENTADORES.....	17
2.6. CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR	18
2.7. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR	18
2.8. PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DO FERMENTADO PARA ENSAIO DE ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA GK E DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.....	19
2.9. ENSAIO DA ATIVIDADE DA ENZIMA GK.....	19
2.10. DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA TOTAL DO EXTRATO CELULAR DA LEVEDURA.....	21
2.11. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	21
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4. CONCLUSÃO	27
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

RESUMO

O glicerol é um importante subproduto de processos fermentativos. Em algumas bebidas alcoólicas, como vinhos e vodcas contribuem com seu sabor tornando-a aceitável para o consumidor. Com o incentivo na produção de biocombustíveis, a disponibilidade do glicerol deve aumentar, já que é o principal subproduto gerado na produção do Biodiesel. A sua presença em alguns alimentos, pode identificar presença de microrganismos, já que pode ser uma fonte de carbono para eles.

Devido às inúmeras utilizações do glicerol para diversos tipos de indústrias, a dosagem do glicerol se torna cada vez mais importante e rotineira. Isso incentiva novas pesquisas de métodos de doseamento.

A enzima GK é presente em vários microrganismos e converte o glicerol em glicerol-3-fosfato. Com a utilização da enzima Glicerol -3- fosfato desidrogenase, o glicerol - 3 – fosfato é convertido a di-hidroxi-acetona fosfato com a produção de NADH. Este pode ser quantificado através do espectrofotômetro, tornando-se um rápido e eficiente método para doseamento.

A levedura recombinante *Pichia pastoris* foi escolhida pois foi inserida no seu DNA, o Gene GUT1 que expressa a GK em *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, a expressão enzimática é extracelular, diminuindo etapas no processo de isolamento da enzima GK.

O trabalho consistiu em otimizar a produção de GK expressa pela levedura recombinante *Pichia pastoris* por meio da adição de oxigênio no biorreator de fermentação em escala de 2,5 L.

Os resultados do presente estudo indicam o ponto ótimo de oxigenação em fermentador nos parâmetros estabelecidos é de 2,0 lpm tanto para a produção de enzimática quanto para biomassa formada.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: PRODUÇÃO DE BIOMASSA DA LEVEDURA <i>PICHIA PASTORIS</i> EM FUNÇÃO DA ADIÇÃO DE OXIGÊNIO REALIZADO EM ERLLENMEYER E FERMENTADOR.	22
TABELA 2: VIABILIDADE DA <i>PICHIA PASTORIS</i> SUBMETIDA A DIFERENTES FLUXOS DE OXIGÊNIO NO FERMENTADOR E EM FRASCOS TIPO ERLLENMEYER.	24
TABELA 3: PRODUÇÃO DE BIOMASSA A PARTIR DO RECOMBINANTE DE <i>PICHIA PASTORIS</i> EM CRESCIMENTO NO MEIO BMMY EM ERLLENMEYER DE 125 ML E EM FERMENTADOR CONTENDO 2,5 L DE MEIO, APÓS 48 HORAS, 120 RPM, 30°C E PH 6,0.....	24
TABELA 4: ATIVIDADE DA GK PRODUZIDA PELO RECOMBINANTE DE <i>PICHIA PASTORIS</i> . CRESCIMENTO EM ERLLENMEYER DE 125 ML E EM FERMENTADOR DE 5 L NAS CONDIÇÕES DE 48 HORAS, 120 RPM, 30°C E PH DO MEIO IGUAL A 6,0.....	25

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: VIAS DE UTILIZAÇÃO DO METANOL POR LEVEDURAS METILOTRÓFICAS.....	13
FIGURA 2: CRESCIMENTO DA LEVEDURA <i>PICHIA PASTORIS</i> EM FERMENTADOR	18
FIGURA 3: CRESCIMENTO DA BIOMASSA DE <i>PICHIA PASTORIS</i> EM FUNÇÃO DO TEMPO ATÉ 48 HORAS.	23

LISTA DE ABREVIATURAS

lpm – Litros por minuto

GK – Glicerol quinase

GUT 1 – Gene responsável pela produção da enzima GK

AOX – Alcool-oxidase

AOX 1 e AOX 2 – Gene responsável pela codificação da AOX

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO ESTUDO

O glicerol é conhecido como 1,2,3-propanotriol, glicerina, trihidroxipropano, glicialcool, gliceril.(RIVALDI et al. ,2008). Apresenta-se como um líquido viscoso, incolor, inodoro e higroscópico, sabor doce, solúvel em água e álcool, insolúvel em éter e clorofórmio. Devido as suas propriedades apresentam diferentes aplicações na indústria de cosméticos, farmacêuticas e alimentos (RIVALDI et al., 2008).

O poli álcool pode ser gerado como subproduto de processo fermentativo microbiano (WANG et al., 2001). Naturalmente encontrado em alimentos como frutas e produtos como vinhos, óleo vegetal, cerveja, tabaco, mel (CORDELLA, ANTINELLI e CABROL-BASS, 2003). É um importante indicador de presença de microrganismos nos produtos alimentares. (GAMELA et al., 2008)

Não é usualmente determinado em muitas industrias, pois o uso de processos de dosagem de rotina ainda é limitado devido ao seu alto custo.(RANGEL e TOTH, 2000; WU e CHENG, 2005).

Em vinhos o glicerol é um dos compostos de maior quantidade, depois de água e etanol. Contribui com as propriedades do vinho, como o sabor. (OLIVEIRA et al., 2006). Pode, no entanto, ser uma fonte de carbono para bactérias deteriorantes, originando compostos aromáticos e acidez volátil que conferem um sabor inaceitável. (GAMELA et al., 2008)

Algumas bebidas alcoólicas como a vodca, mistura-se uma parte de água, já outras adiciona-se alguns aditivos como: o glicerol e aromas, importantes para um sabor suave do produto e possibilitar o comércio. (LEA e PIGGOTT, 1995)

O glicerol também é o principal subproduto gerado na produção do biodiesel, sendo que seu volume total é de aproximadamente 10% do combustível. (DASARI et al., 2005)

Nos próximos anos, disponibilidade do glicerol deverá aumentar, tendo em vista ao crescimento da produção do biodiesel em todo o mundo. (YU, KIM e HAN, 2010)

Assim, a dosagem do glicerol se torna necessária em indústrias, principalmente alimentícias e destilarias. A adição em alimentos incentiva pesquisas para métodos quantitativos que possam satisfazer o consumidor. (TINNIS, 2001)

A GK, é uma enzima que catalisa a fosforilação do glicerol a glicerol-3-fosfato. (JIN et al., 1982; CRANS e WHITESIDES, 1985; STEPANIAN et al., 2003).

A enzima GK atua como fator limitante no metabolismo de glicerol de diversos micro-organismos, como a *Escherichia coli*, em que a reação é regulada por alguns metabolitos como frutose 1,6-bifosfato, adenina e proteína fosfocarreadoras III (SAKASEGAWA et al., 1998).

Essa enzima executa um importante papel fisiológico na formação de glicerol-3-fosfato na biossíntese de fosfolipídios. Além disso, a enzima é industrialmente importante e útil na determinação dos níveis de triglicerídeos no sangue em combinação com lipases e outras enzimas (SAKASEGAWA et al., 2001) e também na determinação do glicerol em bebidas fermentadas, tais como vinhos (SEHOVIC, PETRAVIC e MARIC, 2004).

A formação do glicerol-3-fosfato a partir da reação é importante, pois atua na produção de glicerídeos, lipídeos e fosfato e dihidroxicetona (DHAP), sendo que o DHAP é importante intermediário em uma série de caminhos metabólicos (OHIRA et al., 2005).

A enzima GK catalisa a transferência do fosfato terminal do ATP para o glicerol originando glicerol-3-fosfato e ADP. A reação determina a concentração de glicerol presente na amostra. A leitura é determinada no espectrofotômetro, pelo consumo do glicerol através da formação do NADH gerado na reação de oxidação-redução catalisada pela enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase.

O melhoramento da produção da enzima GK pela *Pichia pastoris* modificada geneticamente a serem usadas no ensaio enzimático do glicerol envolve os sistemas gênicos de indução e repressão relacionados com o metabolismo do glicerol pela célula de levedura.

1.1. A Levedura *Pichia pastoris*

A utilização da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para fins biotecnológicos estimulou, nos últimos anos, o desenvolvimento de novos sistemas de expressão baseados em espécies alternativas de leveduras. Destacam-se então as leveduras metilotróficas, ou seja, as que crescem em meio que contém metanol como única fonte de carbono. (TORRES *et. al.*, 2008).

Pichia pastoris é uma levedura metilotrófica também conhecida como *Endomyces pastoris*, *Komagataella pastoris*, *Petasospora pastoris*, *Saccharomyces pastori*, *Zygowillia pastoris*. Sua taxonomia é descrita como sendo do reino *Fungi*, do filo da *Ascomycota*; do sub-filo *Saccharomycotina* ; da classe *Saccharomycetes*; da ordem *Saccharomycetales* ; da família *Saccharomycetaceae*; do gênero *Pichia* e da espécie *Pichia pastoris*.

O estudo da fisiologia de *P. pastoris* na presença de metanol revelou a importância de uma enzima chamada álcool-oxidase (AOX) responsável pela oxidação do metanol a formaldeído, com geração de peróxido de hidrogênio, uma

reação que ocorre nos peroxissomos. Em *Pichia pastoris*, a enzima AOX é codificada por dois genes, AOX1 e AOX2, sendo o primeiro responsável pela maior atividade AOX dentro da célula. O gene AOX1 é fortemente induzido pela presença de metanol sendo que a enzima AOX corresponde a mais de 30% da proteína solúvel quando a célula é cultivada em fermentador (COUDERC & BARATTI, 1980).

Tornaram-se atraentes para a produção de proteínas heterólogas por possuírem o promotor para transcrever genes heterólogos, derivado do gene do álcool oxidase (AOX1) de *P. pastoris*. O promotor é regulado transcricionalmente por metanol, indutor relativamente barato. Em células expostas a metanol como única fonte de carbono, o início da transcrição no promotor AOX1 é altamente eficiente e comparável aos promotores derivados dos genes altamente expressos da via glicolítica. Ao contrario dos promotores glicolíticos, o promotor AOX1 é regulado e reprimido sob condições de crescimento sem metanol. Uma vez que a maioria das proteínas heterólogas é, de alguma forma, deletérias para a célula, quando expressas em altos níveis, a habilidade de manter a cultura em um estado reprimido ou desligado é altamente desejável. Para ser ativado, o promotor requer a presença de metanol e para reprimir, a ausência do mesmo. Além da presença do metanol, o sistema AOX1, precisa da ausência de glicose para ser ativada. A manipulação e o controle do promotor AOX pela fonte de carbono adicionado no meio de cultura controlam o crescimento e a indução de cepas de *P. pastoris* (CEREGHINO e CREGG, 2000).

Outra característica importante de *P. pastoris* é que a levedura não é considerada uma fonte fermentadora, como *S. cerevisiae*. A fermentação realizada por leveduras gera etanol, o qual, em culturas de alta densidade, pode rapidamente atingir níveis tóxicos. Para uma produção economicamente viável de proteínas

recombinantes a concentração de proteína no meio deve ser proporcional à quantidade de células. É necessário, pois, atingir níveis de alta densidade celular os quais não são facilmente obtidos com *S. cerevisiae*. Em contraste, as cepas produtoras de *Pichia pastoris* são facilmente cultivadas a densidades celulares de aproximadamente 100 g/L de peso seco, ou até maiores. Vários genes de diferentes procedências (bactérias, fungos, invertebrados, plantas e humanos) já foram expressos em *P. pastoris* sob o controle do promotor AOX1. A maioria dos genes expressos teve seus produtos secretados para o meio extracelular e alguns, como o fator de necrose tumoral humano, foi produzido no ambiente intracelular (TORRES & MORAES, 2000).

As leveduras do gênero *Pichia* utilizam uma via específica para o metanol, no qual envolve várias enzimas únicas. As reações iniciais ocorrem em organelas especializadas, os peroxissomos, seguido por passos metabólicos subsequente no citoplasma (Figura 1).

junto com a catalase, no qual degrada o peróxido de hidrogênio em água. Uma parte do formaldeído gerado pela AOX deixa o peroxissomo e mais adiante é oxidada a formiato e dióxido de carbono por duas desidrogenase do citoplasma, reações que são fonte de energia para o crescimento celular (CEREGHINO & CREGG, 2000).

Os sistemas de expressão neste microrganismo permitem a produção de proteínas tanto na forma intracelular quanto na extracelular. Embora o sistema de produção extracelular apresente a vantagem da liberação da proteína, de interesse no sobrenadante do meio de cultivo, ambos os modelos de expressão estão sendo amplamente estudados e precisam de quantidade suficiente de massa celular para que proteínas sejam purificadas para a utilização como produto (CEREGHINO & CREGG, 2000).

A otimização da expressão de proteínas heterólogas, que consiste em maximizar o rendimento e a produtividade, depende de diferentes fenótipos com o promotor AOX, ou outros promotores, meios de cultura e estratégias operacionais (COS *et al.*, 2006).

1.2. Objetivo

A indução da síntese da GK em crescimentos da levedura *Pichia pastoris* realizados em fermentador com otimização das condições de oxigenação do processo caracterizam o objetivo desse estudo além da ampliação da escala de produção de biomassa, proteína total e atividade enzimática.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

O microrganismo que foi utilizado é a levedura, *Pichia pastoris*, modificada através da inserção do gene GUT 1 no seu genoma para a produção extracelular da enzima GK. A levedura foi obtida em parceria com o Laboratório de Biologia Molecular do Prof. Dr. Sandro R. Valentini da FCF/UNESP de Araraquara.

2.2. Meios de cultura

Para a manutenção e propagação inicial de microrganismos foram utilizados os seguintes meios:

YPDA (extrato de levedo 1%, peptona 2%, glicose 2%, ágar 2%). Foi usado como meio na conservação das culturas, em refrigerador a 4 °C, através de transferências, seguido de crescimento em meio novo (repicagem) em cada experimento.

BMGY (extrato de levedo 1%, peptona 2%, tampão fosfato de potássio 100 mM a pH 6,0, YNB 1,34%, biotina 4×10^{-5} (INTROGEN web page). Foi usado para crescimento do inóculo.

BMMY (extrato de levedo 1%, peptona 2%, tampão fosfato de potássio 100 mM a pH 6,0, YNB 1,34%, metanol, 1,0%). Foi usado na indução da produção da enzima.

Diferentes concentrações de oxigênio foram testados nos ensaios de crescimento e produção de GK pelo recombinante de *Pichia pastoris*.

2.3. Crescimentos em frascos tipo Erlenmeyer

Primeiramente os ensaios de indução foram realizados em frascos tipo Erlenmeyer de 125 ml.

Uma alça de células foi transferida para cada erlenmeyer contendo 25 mL e submetidas à agitação por 24 horas e 120 rpm e a 30 °C, para crescimento e preparação para o inóculo. As células foram conservadas por 2 horas a um dia, a 4 °C em repouso para sedimentação da biomassa. Após decantação o sobrenadante foi descartado, a biomassa se concentrou no fundo do Erlenmeyer e 1ml da biomassa foi diluído 100x para determinação do inóculo no espectrofotômetro através das formulas:

$$[mg/ml] = F \cdot \text{Diluição} \cdot \text{Absorbância (570nm)}$$

$$F = 0,28 \text{ (fator padronizado no laboratório)}$$

$$\text{Volume inóculo} = C1 \cdot V1 / C2$$

$$C1 = 0,10 \text{ mg/ml (concentração inicial de células)}$$

$$C2 = [mg/ml]$$

$$V1 = \text{volume do meio no fermentador.}$$

Foi escolhido o tamanho do inóculo de 0,10 mg/ml por apresentar a melhor atividade enzimática. (AIZEMBERG, 2011)

Após determinado volume foi feito o inóculo no fermentador e no Erlenmeyer em ambiente asséptico.

2.4. Indução e Crescimento em Erlenmeyers

O inóculo foi obtido conforme descrição acima com células propagadas em vários frascos de 125 ml e assepticamente reunidas para concentração inicial de 0,10 mg/ml.

Foi inoculado em frascos do tipo Erlenmeyers de 125 ml contendo 25 ml de meio BMMY, pH 6,0, temperatura 30°C e agitação de 120 rpm. O crescimento foi realizado em 48 horas em mesa agitadora (Tecnal-PE 421).

A indução da produção da enzima GK, foi induzida pela adição de metanol (1%) após 24 horas de crescimento.

2.5. Indução e crescimentos em fermentadores

O inóculo para crescimento em fermentadores também foi obtido conforme descrição acima. Foi inoculado em 2,5 L do meio BMMY no fermentador (INFORS HT-Minifors, capacidade 5L) em ambiente asséptico.

O tempo total de crescimento foi de 48 horas em 120 rpm, temperatura de 30°C e a indução da expressão enzimática foi feita com 25 ml de metanol após 24 horas de fermentação.

A injeção de oxigênio no meio de cultura durante a fase de crescimento e síntese da enzima foi analisada em relação ao acúmulo de biomassa e síntese enzimática e foi expressa em lpm.



Figura 2: Crescimento da levedura *Pichia pastoris* em fermentador (INFORS HT-Minifors, capacidade 5L)

2.6. Curva de Crescimento Celular

Para o calculo da biomassa foi utilizada a formula abaixo para os tempos de 12, 24, 36 e 48 horas.

$$[mg/ml] = F(*) \cdot \text{Diluição (50x)} \cdot \text{Absorbância (570nm)}$$

(*) O fator F utilizado foi de 0,28.

2.7. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando-se a técnica de coloração com a solução de Ringer (AIZEMBERG, 2011) e fazendo a contagem de células (viáveis e totais) em câmara de Neubauer.

Viabilidade (%) = células vivas / (células vivas + células mortas) X 100.

Células vivas não apresentam coloração, já as células mortas se coram pela solução de Ringer.

2.8.Preparação do Extrato Bruto do fermentado para ensaio de atividade enzimática da GK e determinação de proteína total.

O extrato foi centrifugado para a separação das células em 15.000 g durante 10 min e posteriormente concentrado utilizando membranas filtrantes (Amicon® Ultra-15, PLGC Ultracel-PL Membrane, 10 kDa) através de centrifugação a 2800 g á temperatura de 17°C, para posterior dosagem de GK e determinação de proteína total.

2.9.Ensaio da atividade da enzima GK

A reação enzimática da GK foi realizada no ensaio e nos procedimentos de leitura e calculo da atividade em espectrofotômetro, por meio de uma modificação de ensaio de WIELAND (1962), foi utilizada a seguinte mistura: 0,07 ml de NAD 0,02 mol/L; 0,07de ATP ml 0,05 mol/L; 0,9 ml de tampão glicina hidrazina (0,1 mol/L de tampão glicina /HCl a pH 9,8, contendo 0,88 mol/L de hidrato de hidrazina); 0,9 ml de glicerol 6mM; 0,220 ml de sulfato de magnésio 0,2 mol/L; 0,330 ml de cloreto de cálcio 0,1 mol/L; 0,220 ml de agua destilada; 0,400 ml de glicerol-3-fosfato desidrogenase (Sigma nº G6751); 0,200 ml de extrato enzimático (GK) diluído, totalizando 3,3 ml em cubeta de quartzo, em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 340 nm.

A enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase e o extrato enzimático de GK foram diluídos em solução tampão Tris-Naf 10 mmol/L, pH 7,2.

Para análise da enzima, espectrofotômetro foi ajustado a 340 nm e a velocidade de reação foi ajustada de 15 em 15 segundos durante um intervalo de 90 segundos. O aparelho foi zerado com o branco substrato, que é preparado com todos os reagentes da reação excetuando-se a amostra enzimática, substituída por água destilada. Assim desconta-se a absorbância de cada reagente na reação final. Já o processo com a leitura do branco-enzima foi preparado com todos os reagentes excetuando-se o substrato, cujo objetivo é descontar da reação a absorbância dada pela amostra contendo a enzima. Fez-se a leitura da reação contendo todos os reagentes e a amostra contendo a enzima.

Os valores do branco-enzima foram subtraídos dos valores da reação contendo a amostra enzimática e as diferenças foram utilizadas para a realização dos cálculos de atividade e a obtenção das curvas de tempo.

$$U/ml = \frac{\Delta Abs * V * dil}{\Delta t * \epsilon * d * v}$$

Onde:

ΔAbs = variação da absorbância no comprimento de onda em $\lambda = 340nm$

V = volume do ensaio (ml)

dil = diluição da enzima

Δt = variação do tempo (min)

ϵ = coeficiente de absortividade molar do NADH ($6,22 \times 10^6 M \times cm^{-1}$)

d = caminho ótico (cm)

v = volume de amostra no ensaio (ml)

A atividade catalítica específica foi calculada através do quociente da atividade (U/ml) e pelo conteúdo proteico (Cp) (mg/ml), sendo expressa portanto em U/mg.

2.10. Determinação da proteína total do extrato celular da levedura

O conteúdo proteico da levedura foi determinado pelo método Lowry et. al, (1951) tendo soroalbumina bovina como padrão.

A curva padrão de proteína utilizada foi àquela disponível no laboratório.

2.11. Planejamento Experimental

O trabalho experimental consistiu na otimização da produção de GK no meio BMMY, em fermentações realizadas em frascos tipo Erlenmeyer de 125 ml e em fermentadores de 5 L contendo 2,5 L de meio.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O crescimento da biomassa de levedura *Pichia pastoris* em meio BMMY no fermentador e no Erlenmeyer foi acompanhado por 48 horas. As condições de oxigenação no fermentador foram variadas a cada ensaio.

Os resultados obtidos estão descritos na tabela 1:

Tabela 1: Produção de Biomassa da levedura *Pichia pastoris* em função da adição de oxigênio realizado em Erlenmeyer e fermentador.

Tempo de Crescimento (h)	Biomassa (mg/ml)			
	Ensaio em Erlenmeyer	Ensaio em Fermentador		
		Adição de O ₂ (1 lpm)	Adição de O ₂ (2 lpm)	Adição de O ₂ (3 lpm)
12	0,451	0,584	0,623	0,570
24	0,525	0,941	1,099	0,987
36	0,801	1,253	2,012	1,480
48	0,661	1,634	2,838	2,096

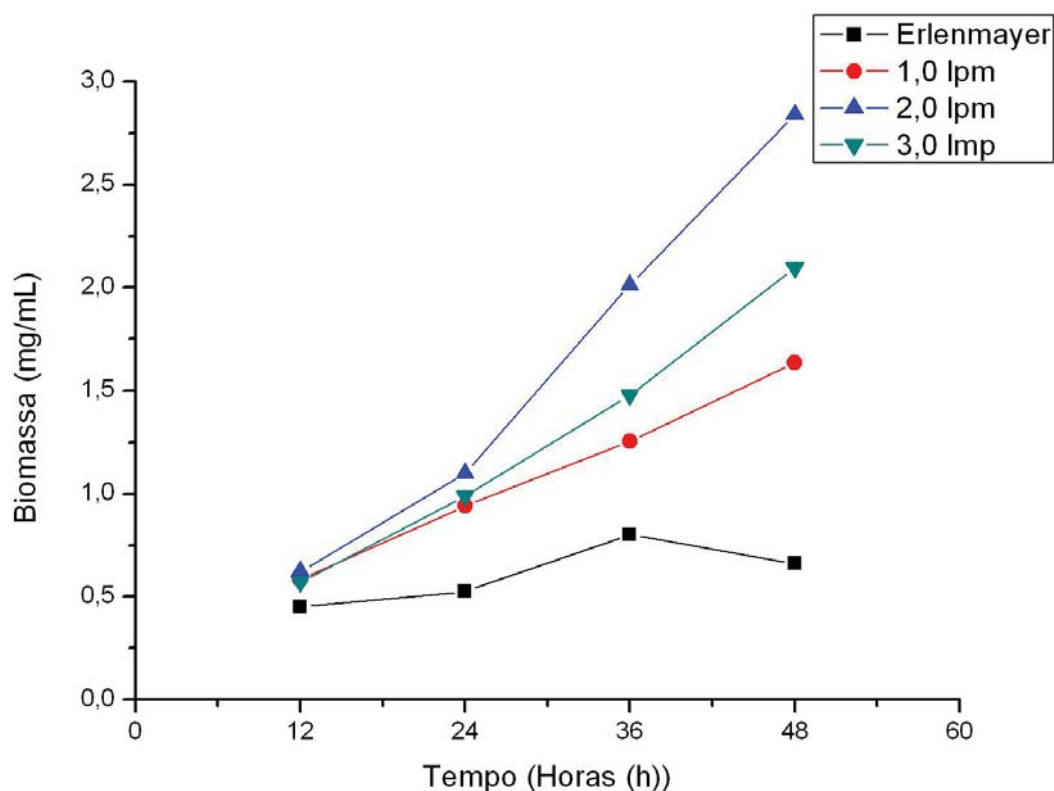


Figura 3: Crescimento da biomassa de *Pichia pastoris* em função do tempo até 48 horas.

A figura 3 apresenta a curva de crescimento celular, crescente em função do tempo e da adição de oxigênio no meio, na fase de indução, até 2,0 lpm em fermentador. O aumento da oxigenação no meio para 3,0 lpm resultou na diminuição da biomassa da ordem de 1,35 vezes, após 48 horas de crescimento em fermentador.

A tabela 2 apresenta os resultados da viabilidade celular, em função do tempo de 12 a 48 horas, nos ensaios de oxigenação no fermentador e no Erlenmeyer, em mesa agitadora.

Tabela 2: Viabilidade da *Pichia pastoris* submetida a diferentes fluxos de oxigênio no fermentador e em frascos tipo Erlenmeyer.

Tempo de Crescimento (h)	Viabilidade %			
	Ensaio em Erlenmeyer	Ensaio em Fermentador		
		Adição de O ₂ (1 lpm)	Adição de O ₂ (2 lpm)	Adição de O ₂ (3 lpm)
12	80,00	90,75	94,07	88,02
24	93,88	95,98	92,96	99,22
36	99,41	96,58	97,95	99,37
48	98,98	99,10	98,38	97,86

A viabilidade celular aumenta com tempo em crescimento da levedura *Pichia pastoris* em Erlenmeyer contendo 25 ml de meio de cultura.

A oxigenação favorece a viabilidade com a adição de até 3,0 lpm após 36 horas em fermentador.

Comparando-se o melhor resultado das condições de oxigenação no fermentador, na produção de biomassa com o resultado do frasco tipo Erlenmeyer, obtivemos os resultados descritos na tabela 3.

Tabela 3: Produção de biomassa a partir do recombinante de *Pichia pastoris* em crescimento no meio BMMY em Erlenmeyer de 125 ml e em Fermentador contendo 2,5 L de meio, após 48 horas, 120 rpm, 30°C e pH 6,0.

Condição de crescimento	Abs 570 nm	Diluição (X)	Concentração de Células (ug/ml)	Índice de comparação
Frasco contendo 25 mL de meio BMMY	0,047	50	0,661	1
Fermentador contendo 2,5 l de meio BMMY	0,202	50	2,838	4,29*

(*) O índice de comparação é calculado pela razão entre a concentração de células do Erlenmeyer e do fermentador.

O efeito do oxigênio de 2,0 lpm, favorece a formação de biomassa na ordem de 4,29 vezes, quando comparado com o crescimento da levedura *Pichia pastoris* realizados em frascos de 125 ml.

Para análise do efeito da adição de entrada de oxigênio no fermentador sobre a produção da enzima GK e sua atividade, os dados foram descritos na tabela 4.

Tabela 4: Atividade da GK produzida pelo recombinante de *Pichia pastoris*. Crescimento em Erlenmeyer de 125 ml e em Fermentador de 5 L nas condições de 48 horas, 120 rpm, 30°C e pH do meio igual a 6,0.

Condição de Crescimento	Oxigenação em lpm	Diluição do extrato de GK (vezes)	Proteína Total (mg/ml)	Atividade da GK	
				Atividade enzimática (U/ml)	Atividade específica (U/mg x 10 ⁻³)
Frasco contendo 25 ml de meio BMMY	-	10	27,469	0,159	5,788
Fermentador contendo 2,5 l de meio BMMY	1,0	20	39,031	0,286	7,327
Fermentador contendo 2,5 l de meio BMMY	2,0	10	28,719	0,318	11,072
Fermentador contendo 2,5 l de meio BMMY	3,0	10	29,969	0,159	5,305

A atividade da GK é crescente em função da adição de oxigênio até 2,0 lpm no meio.

A adição de 3,0 lpm de oxigênio no meio de cultura mostra efeito inibitório na expressão da enzima GK pela levedura *Pichia pastoris*. Isso pode ser devido a

grande formação inicial de espuma no fermentador que ocasionou perda do volume do meio de cultura.

4. CONCLUSÃO

A produção de GK por recombinantes de *Pichia pastoris* mostrou dependência pelo oxigênio adicionado no meio de cultura.

O fluxo variou de 1 a 3 lpm em crescimentos da levedura por até 48 horas, realizados em fermentador de 5 l contendo 2,5 l de meio de cultura.

O ótimo de oxigênio dissolvido no meio de cultura na fase de indução por metanol, tanto para a produção da enzima quanto para produção de biomassa foi 2 lpm nas condições de 30°C, 120 rpm, pH 6 em Biorreator.

No presente estudo a produção de biomassa em todos os ensaios aumenta em função do tempo e em função de oxigenação do meio de cultura até 2,0 lpm. O aumento do fluxo de oxigênio para 3 lpm resultou em declínio na curva de crescimento. A viabilidade celular se manteve alta e estável nas condições dos experimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIZEMBERG, R. **Produção de glicerol quinase em *Pichia pastoris***. 2011.110 f. Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciências do Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Unesp, Araraquara, 2011.

CRANS, sn-glycerolr-3-phosphate, and chiral analogs. **J. Am. Chem. Soc.**, v.107. n. 24, p. 7019-7027, 1985.

CEREGUINO, J. L., CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast by *Pichia Pastoris*. **FEMS Microbiol.** v.24, p. 45-66, 2000.

CEREGUINO, J. L., CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast by *Pichia Pastoris*. **FEMS Microbiol.** v.24, p. 45-66, 2000.

CORDELLA, C.; ANTINELLI, J-F.; CABROL-BASS, D. computer-aided determination of glycerol in food products with GlycerolSoft, a tool for assenssing the quality of food. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 115-122, 2003.

COS, O., RAMÓN, R., MOTESINOS, J. L., VALERO, F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. **Microb. Cell. Fact.** V.6, p. 5-17, 2006.

COS, O., RAMÓN, R., MOTESINOS, J. L., VALERO, F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. **Microb. Cell. Fact.** V.6, p. 5-17, 2006.

COUDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. **Agric. Biol. Chem.** v. 44, p. 2279-2289, 1980.

COUDERC, R.; BARATTI, J. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. **Agric. Biol. Chem.** v. 44, p. 2279-2289, 1980.

CRANS, D. C., WHITESIDES, G. M. Glycerol kinase: synthesis of dihydroxyacetone phosphate, sn-glycerol-3-phosphate, and chiral analogs. **J. Am. Chem. Soc.**, v.107. n. 24, p. 7019-7027, 1985.

DASARI, M. A.; KIATSIMKUL, P. P.; SUTTERLIN, W. R.; SUPPES, G. J. Low-pressure hydrogenolysis of glycerol to propylene glycol. **Applied Catalysis A: Gen.** v. 281, p. 225-231, 2005.

GAMELLA, M.; CAMPUZANO, S.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, J. M. Integrated multienzyme electrochemical biosensors for the determination of glycerol in wines. **Analytica Chimica Acta**, v.609, p. 201-209, 2008.

HARTNER, F. S., GLIEDER, A. Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts. **Microbial Cell Fact.** 2006 Dec 14; v.5, p. 39.

JIN, R. Z., FORAGE, R. G. LIN, E. C. C. Glycerol kinase as a substitute for dihidroxiacetone kinase in a mutant of *Klebsiella pneumonia*. **J. Bacteriol.**, v. 152, n. 3, p. 1303-1307, 1982.

LEA, A. G. H; PIGGOTT, J. R. Fermented beverage production. London: Blackie **Academic & Professional**, 1995, p. 36, 292.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

MACAULEY-PATRICK, S., FAZENDA, M.L., MCNEIL, B., HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**. v. 22, p.249-270, 2005.

OHIRA, R. H.; DIPPLE, K. M.; ZHANG, Y.; MCCABE, E. R. B. Human and murine glycerol kinase: Influence of exon 18 alternative splicing on function. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 331, p. 239-246, 2005.

OLIVEIRA, H. M; SEGUNDO, M. A.; LIMA, J. L. F. C.; GRASSI, V.; ZAGATTO, E. A. G. Kinetic Enzymatic Determination of Glycerol in Wine and Beer Using a Sequential

Injection System with Spectrophotometric Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 54, p. 4136-4140, 2006.

RANGEL, A. O. S. S.; TÓTH, I. V. Enzymatic determination of ethanol and glycerol by flow injection parallel multi-site detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 416, p. 205-210, 2000.

RIVALDI, J. D.; SARROUB, B. F.; FIORILO, R.; SILVA, S. S. DA. Glicerol de biodiesel. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 37, p. 44-51, 2008.

SAKASEGAWA, S.; YOSHIOKA, I.; KOGA, S.; TAKAHASHI, M.; MATSUMOTO, K.; MISAKI, H.; OHSHIMA, T. A novel glycerol kinase from *Flavobacterium meningosepticum*: characterization, gene cloning and primary structure. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 62, n. 12, p. 2388-2395, 1998.

SEHOVIC, D.; PETRAVIC, V.; MARIC, V. Glycerol and Wine Industry, Glycerol Determination in Grape Must and Wine. **Kem. Ind.** v. 53, n. 11, p. 505-516, 2004.

STEPHANIAN, S. V., HUYN, S. T., McCABE, E. R. B., DIPPLE, K. M. Characterization of the human glycerol kinase promoter: identification of a functional HNF-4 α binding site and evidence for transcriptional activation. **Molecular Genetics and Metabolism**. v. 80, p. 412–418, 2003.

TININIS, C. R. C. S. **Ensaio enzimático para dosagem de glicerol**. 2001. 124 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unesp, Araraquara- SP, 2001.

TORRES, F. A. G., MORAES, L. M. P., DE MARCO, J. L. POÇAS-FONSECA, M. J. FELIPE, M. S. S. **O uso de leveduras e fungos filamentosos para expressão heteróloga de enzimas**. In: BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L. (editores). *Enzimas em biotecnologia: Produção, aplicações e mercado*. Rio de Janeiro: Interciência: UFRJ; CAPES; FAPERJ; FCT (Portugal), 2008.

TORRES, F. A. G.; MORAES, L. M. P. **Proteínas recombinantes produzidas em leveduras**. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Brasil, v. 12, p. 20-22, 2000.

WANG, Z.; WANG, Y.; ZHANG, D.; LI, J.; HUA, Z.; DU, G.; CHEN, J. Enhancement of cell viability and alkaline polygalacturonate lyase production by sorbitol co-feeding with methanol in *Pichia pastoris* fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 1318-1323, 2010.

YU, K. O.; KIM, S. W.; HAN, S. O. Engineering of glycerol utilization pathway for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4157-4161, 2010.

D. C., WHITESIDES, G. M. Glycerol kinase: synthesis of dihydroxyacetone phosphate