



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUIMICA

ESTUDO DA EXPRESSÃO DE LIPASE BTL2 DE *Bacillus*
***thermocatenulatus* EM *E. coli* RECOMBINANTE**

Ana Maria Vélez Escallón

São Carlos – SP
Abril/ 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUIMICA

ESTUDO DA EXPRESSÃO DE LIPASE BTL2 DE *Bacillus*
***thermocatenulatus* EM *E. coli* RECOMBINANTE**

Ana María Vélez Escallón

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadora:
Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano

São Carlos – SP
Abril/2009

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

V868ee

Vélez Escallón, Ana María.

Estudo da expressão de lipase BTL2 de *Bacillus thermocatenuatus* em *E. coli* recombinante / Ana María Vélez Escallón. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
86 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Engenharia bioquímica. 2. Fermentação. 3. Enzimas intracelulares. 4. Batelada alimentada. 5. Choque térmico. I. Título.

CDD: 660.63 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE ANA MARÍA VÉLEZ ESCALLÓN APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 03 DE ABRIL DE 2009.

BANCA EXAMINADORA:



Profª. Drª. Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora, PPG-EQ/UFSCar



Profª. Drª. Beatriz Vahan Kilikian
DEQ/EPUSP



Drª. Mônica Rosas da Costa Iemma
DEQ/UFSCar

Dedico este trabalho a minha mãe Nelly e ao meu irmão Andrés pelo apoio incondicional desde tão longe, ao meu namorado Edcarlos pela paciência e os bons conselhos e as minhas professoras de biologia da escola e da graduação por me incentivar a curiosidade por esta disciplina desde criança.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Raquel de Lima Camargo Giordano, pela confiança em mim depositada, pela dedicação e pelo apoio.

A Dra. Mônica Rosas da Costa Iemma pelo apoio, os conselhos, a dedicação e todo o conhecimento compartilhado.

Ao professor Roberto de Campos Giordano pela ajuda e conhecimento compartilhado.

A todos os amigos do Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar pela ajuda, amizade e companheirismo.

Aos demais amigos do Departamento de Engenharia Química por todos os momentos compartilhados e por me receber tão bem nesta cidade.

Ao técnico Amadeus pela assistência durante os experimentos.

A minha família por me apoiar nas minhas escolhas e me incentivar a lutar por meus objetivos.

A Deus por me dar a alegria de viver.

*La mitad de la vida es suerte, la otra disciplina;
y ésta es decisoria, ya que sin disciplina no se
sabría por donde empezar con la suerte.
(Carl Zuckmayer)*

RESUMO

Utilizando técnicas de DNA recombinante, o gene da lipase BTL2 de *Bacillus thermocatenulatus* foi clonado em *E. coli* BL321 sob controle do promotor λP_L , com o qual a indução na produção da enzima é obtida através de choque térmico. Investigou-se, inicialmente, neste trabalho, a influência de diferentes variáveis no crescimento celular e na expressão da lipase BTL2 por *E. coli* recombinante, através de experimentos realizados em frascos agitados, com meio LB. Primeiramente, estudou-se a influência da temperatura de crescimento (entre 27°C e 34,2°C) e da temperatura de choque térmico (entre 37,8°C e 46,2°C) na expressão de BTL2 por *E. coli* recombinante, usando planejamento estatístico de experimentos. Os resultados desse estudo, onde o choque era realizado no início da fase exponencial, indicaram como as melhores temperaturas $T_{\text{cresc}}=27^\circ\text{C}$ e $T_{\text{choque}}=45^\circ\text{C}$, obtendo-se concentração celular de 0,6 g massa seca/L e atividade enzimática de 121.000U/gcél.úmida. A seguir, foi investigada a influência da fase de crescimento do microrganismo no momento do choque, através de cultivos com $T_{\text{cresc}}=27^\circ\text{C}$ e $T_{\text{choque}}=45^\circ\text{C}$, os resultados desses experimentos indicaram como melhor condição choque térmico no final da fase exponencial, obtendo-se nessa condição atividade de BTL2 de 258.000U/gcél. Úmida. Investigou-se assim a influência de diferentes concentrações iniciais de glicose no meio de cultivo no crescimento celular e expressão da enzima. Os melhores resultados de massa celular foram obtidos com 10g/L de glicose, obtendo-se 1,2 g/L de massa seca, $\mu_{\text{max}} = 0,16 \text{ h}^{-1}$, $Y_{x/s}=0,19 \text{ g/g}$ e atividade enzimática em torno de 250.000 U/gcél, úmida. Concentrações de glicose menores e maiores conduziram a menores concentrações celulares, mas não influenciaram na atividade enzimática final. Baseando-se em cultivos anteriores de *E. coli* foram realizadas simulações para cálculo de alimentação de meio em ensaio em batelada alimentada. O ensaio experimental foi realizado com 10 g/L de glicose no início do cultivo, $T_{\text{cresc}}=30^\circ\text{C}$, $T_{\text{choque}}=45^\circ\text{C}$. Nesse ensaio, conseguiu-se atingir 15 g/L de massa seca, com $\mu_{\text{max}}=0,38 \text{ h}^{-1}$ e com atividade enzimática de 231.000 U/gcel.úmida, obtendo-se 100 vezes mais enzima nesse ensaio do que no cultivo em frasco agitado na melhor condição. Os resultados da simulação, obtidos usando modelo de Monod, previram bastante bem os obtidos experimentalmente. Não se observou acúmulo significativo de ácidos orgânicos e todos os aminoácidos eram consumidos até o momento do choque. A partir do choque térmico, aqueles que não estavam esgotados permaneceram com concentração constante. A enzima produzida no ensaio em batelada foi recuperada rompendo-se as células em uma prensa francesa, obtendo-se com essa metodologia 272.000 U/g cel úmida, enquanto que os resultados das amostras, que eram rompidas por sonicação resultaram em valor muito menor. Investigou-se então a eficiência do protocolo de sonicação que vinha sendo utilizado, submetendo-se as células a sucessivos ciclos de sonicação. Os resultados mostraram que realmente no primeiro ciclo apenas 50% da enzima era liberada, o que indica que a máxima produção obtida estava na verdade em torno de 462.000U/gcél.úmida. Estudo de caracterização cinética da enzima mostrou que a temperatura de máxima atividade é 65°C, com energia de ativação igual a 142,3 kJ/mol. Estudo de estabilidade em solvente mostrou que a enzima mantém atividade na presença de 2-propanol.

Palavras-chave: *Bacillus thermocatenulatus*, lipase BTL2, *E. coli* recombinante, choque térmico, batelada alimentada.

ABSTRACT

Using recombinant DNA techniques, the lipase BTL2 gene of *Bacillus thermocatenuulatus* was cloned in *E. coli* BL321 under control of the strong temperature-inducible λ PL promoter. It was investigated, initially, in this work, the influence of different variables in cell growth and expression of lipase BTL2 by recombinant *E. coli*, through experiments performed in agitated flasks with LB medium. First, it was studied the influence of temperature of growth (between 27 °C and 34.2 °C) and heat shock temperature (between 37.8 °C and 46.2 °C) in the expression of lipase BTL2 by *E. coli* recombinant, using statistical design of experiments. The results of this study, where the shock was performed in the early exponential phase, indicated as the best $T_{cresc} = 27$ °C and $T_{choque} = 45$ °C, yielding cellular concentration of 0.6 g dry weight / L and enzyme activity of 121.000 U/g.wet.cel. Then, it was investigated the influence of the growth phase of the microorganism at the shock, through cultures with $T_{cresc} = 27$ °C and $T_{choque} = 45$ °C, the results of these experiments showed how heat shock condition at the end of exponential phase, resulting in activity of 258.000 U/g.wet.cel. It investigated the influence of different initial concentrations of glucose in the medium on cell growth and expression of the enzyme. The best results were obtained from cell mass with 10 g/L glucose and $\mu_{max} = 0,16$ h⁻¹, $Y_{x/s} = 0,19$ g/g, resulting in 1.2 g / L dry cel, enzymatic activity of about 250.000 U / g.wet.cel. Lower concentrations of glucose and higher concentrations led to smaller cell, but did not affect enzyme activity in the final. Based on previous cultures of *E.coli* were conducted simulations to calculate the best condition for feed-batch. The experimental test was performed with 10 g/L glucose at the beginning of cultivation, $T_{cresc} = 30$ °C, $T_{choque} = 45$ °C. In this test, we were able to achieve 15 g/L dry.cel $\mu_{max} = 0,38$ h⁻¹ with enzyme activity of 231.000 U/g.wet.cel, with resulting in 100 times more enzyme in this test than in cultivation in shaker in the best condition. The results of the simulation, obtained using model of Monod, predicted quite well those obtained experimentally. There was no significant accumulation of organic acids and all aminoacids consumed by the moment of shock. From the heat shock, those who were not exhausted with concentration remained constant. The enzyme produced in the test batch was recovered by breaking the cells in a French press to obtain with this methodology 272.000 U/g wet cells, whereas the results of the samples, which were disrupted by sonication resulted in much lower value. Was then investigated the efficiency of the protocol of sonication that was being used, by subjecting the cells to successive rounds of sonication. The results showed that actually the first cycle only 50% of the enzyme was released, indicating that the maximum production achieved was actually around 462.000 U/g.cél.úmida. Study characterization of enzyme kinetics showed that the temperature of maximum activity is 65 °C with activation energy equal to 142.3 kJ/mol. Study of stability in solvent showed that the enzyme retains activity in the presence of 2-propanol.

Keywords: *Bacillus thermocatenuulatus*, lipase BTL2, Recombinant *E. coli* , heat shock, feed-batch.

Lista de Figuras

Figura 2.1 - Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol.....	4
Figura 2.2 - Reações catalisadas por lípases.....	5
Figura 2.3 - Modelo estrutural de α/β hidrolases.....	10
Figura 2.4 - Estrutura da conformação aberta da lipase BTL2 ligada a duas moléculas de Triton X-100.....	11
Figura 2.5 - Mecanismo catalítico de lipase.....	12
Figura 2.6 - Conformações estruturais de uma lipase contendo <i>lid</i>	13
Figura 2.7 - Sistema de expressão gênico bacteriano baseado no promotor λP_L	22
Figura 2.8 - Ciclo do stress: Processos característicos numa cultura bacteriana sujeita ao stress da indução.....	23
Figura 3.1 - (A) Reator Aplikon com capacidade para 2 L. (B) Sistema de aquisição de dados.....	31
Figura 3.2 - Esquema do procedimento utilizado para os experimentos realizados em shaker.....	40
Figura 3.3 - Esquema do procedimento utilizado para cultivo em biorreator.....	41
Figura 4.1 – Diagrama de Pareto da U/g de cél úmi.....	45
Figura 4.2 – Diagrama de Pareto U/mg prot.....	45
Figura 4.3 – Diagrama de Pareto da produtividade (U/L*h).....	46
Figura 4.4 – Relação das U/mg prot e das U/g cel. Úmi com respeito à T_{choque}	47
Figura 4.5 – Superfície de resposta para a variação da produtividade em BTL-2 com as temperaturas de crescimento e de choque.....	47

- Figura 4.6 - Eletroforese SDS-PAGE das proteínas totais obtidas em cultivo para expressão de BTL2 por *E. coli* recombinante em $T_{Cresc}=33^{\circ}C$, $T_{Choque}=39^{\circ}C$. Onde: (1) Tempo inicial de cultivo, (2) Antes do choque, (3) 1 hora, (4) 4 horas, (5) 8 horas e (6) 12 horas após choque.....48
- Figura 4.7 - Eletroforese SDS-PAGE das proteínas totais obtidas em cultivo para expressão de BTL2 por *E. coli* recombinante em $T_{Cresc}=30^{\circ}C$, $T_{Choque}=46^{\circ}C$. Onde: (1) Tempo inicial de cultivo, (2) Antes do choque, (3) 1 hora, (4) 4 horas, (5) 8 horas e (6) 12 horas após choque.....49
- Figura 4.8 - Eletroforese SDS-PAGE das proteínas totais obtidas em cultivo para expressão de BTL2 por *E. coli* recombinante nas melhores condições encontradas, $T_{Cresc} = 27^{\circ}C$, $T_{Choque} = 45^{\circ}C$. Onde: (1) Tempo inicial de cultivo, (2) Antes do choque, (3) 1 hora, (4) 4 horas, (5) 8 horas e (6) 12 horas após choque.....50
- Figura 4.9 - Concentração celular em função do tempo para cultivos de *E.coli* recombinante realizados a diferentes temperaturas.....51
- Figura 4.10 - Concentração de proteínas em função do tempo para cultivo de *E.coli* recombinante a diferentes temperaturas.....51
- Figura 4.11 - Produtividade em BTL2 obtida nos cultivos de *E.coli* recombinante em diferentes temperaturas de crescimento e de choque térmico.....52
- Figura 4.12 - Concentração celular – Cx, concentração de proteínas –Prot e atividade enzimática –At.enz. ao longo do tempo durante cultivo de *E.coli* recombinante para expressão de BTL2. $T_c=27^{\circ}C$; $T_{choque}=45^{\circ}C$. Choque térmico no início da fase exponencial ($DO_{578\text{ nm}} = 0,4-0,5$).....53
- Figura 4.13 - Concentração celular – Cx, concentração de proteínas –Prot e atividade enzimática –At.enz. ao longo do tempo durante cultivo de *E.coli* recombinante para expressão de BTL2. $T_c=27^{\circ}C$; $T_{choque}=45^{\circ}C$. Choque térmico no final da fase exponencial ($DO_{578\text{ NM}} = 0,8-0,9$).....54
- Figura 4.14 - Concentração celular – Cx, concentração de proteínas –Prot e atividade enzimática –At.enz. ao longo do tempo durante cultivo de *E.coli* recombinante

para expressão de BTL2. Tc=27°C; Tchoque=45°C. Choque térmico na fase estacionaria (DO ₅₇₈ NM = 1,1-1,2).....	54
Figura 4.15 - Eletroforese SDS-PAGE de proteínas totais antes e depois do choque térmico para fases de crescimento (DOM : DO ₅₇₈ NM=0,8-0,9) e (DOA : DO ₅₇₈ NM=1,1-1,2). Cultivo de <i>E.coli</i> recombinante para expressão de BTL2. Tc=27°C; Tchoque=45°C.....	55
Figura 4.16 - (a) Concentração de aminoácidos consumidos ao longo do tempo durante cultivo de <i>E.coli</i> recombinante para expressão de BTL2 (Tc=27°C; Tchoque=45°C) Para ensaios com choque térmico: (a) no começo da fase exponencial. (b) final da fase exponencial (c) Fase estacionaria.....	57
Figura 4.17 - Concentração celular (Cx), atividade enzimática (At Enz.) e metabólitos gerados no cultivo de <i>E.coli</i> para expressão de BTL2 em meio LB (0 g/L de glicose)....	59
Figura 4.18 - Concentração celular (Cx), atividade enzimática (At Enz.), concentração de glicose e de metabólitos gerados no cultivo de <i>E.coli</i> para expressão de BTL2 em meio LB (5,0 g/L de glicose) de glicose.....	60
Figura 4.19 - Concentração celular (Cx), atividade enzimática (At Enz.), concentração de glicose e de metabólitos gerados no cultivo de <i>E.coli</i> para expressão de BTL2 em meio LB (10,0 g/L de glicose).....	60
Figura 4.20 - Concentração celular (Cx), atividade enzimática (At Enz.), concentração de glicose e de metabólitos gerados no cultivo de <i>E.coli</i> para expressão de BTL2 em meio LB (20,0 g/L de glicose).....	61
Figura 4.21 - Resultado da simulação da batelada alimentada no cultivo de <i>E.coli</i> recombinante a 30°C, com os parâmetros da Tabela 4.6.....	65
Figura 4.22 - Concentração celular (Cx) e concentração de glicose (Cs) ao longo do tempo de cultivo de <i>E.coli</i> recombinante para expressão de BTL2 em ensaio em biorreator, com os parâmetros da Tabela .4.7 Valores experimentais e simulados.....	67

Figura 4.23 - Comparação entre dados de viabilidade celular obtidos por contagem de células em placas (UFC/mL) e a sonda de permissividade (mA) com os de concentração celular obtidos por massa seca (g cel.seca/L).....	68
Figura 4.24 - Resultados do processo em batelada alimentada para <i>E. coli</i> recombinante com $T_{Cres} = 30^{\circ}C$ e $T_{Choque} = 45^{\circ}C$	69
Figura 4.25 - Velocidades específicas de crescimento celular ao longo do cultivo de <i>E.coli</i> recombinante em biorreator.....	70
Figura 4.26 - Concentração de aminoácidos ao longo do tempo de cultivo de <i>E.coli</i> recombinante em biorreator.....	71
Figura 4.27 - Lipase BTL2 de <i>E. coli</i> recombinante no pellet e no clarificado após ruptura celular e centrifugação para diferentes temperaturas de crescimento e indução.....	72
Figura 4.28 - Ciclos de ruptura celular.....	73
Figura 4.29 - (a) Efeito da temperatura na atividade da lipase BTL2. Condições do ensaio: 40-80°C, tampão fosfato 0,1 M, pH 8, p-NPP 0,03 mg/mL. (b) Gráfico de Arrhenius.....	74

Lista de tabelas

Tabela 2.1 - Principais microorganismos produtores de lipase.....	8
Tabela 2.2 - Características bioquímicas de lipases bacterianas do gênero <i>Bacillus</i>	15
Tabela 3.1 - Composição do meio LB.....	27
Tabela 3.2 – Composição do meio LB-Ágar.....	28
Tabela 3.3 – Composição de meio LB modificado.....	28
Tabela 3.4 – Composição do meio de alimentação.....	29
Tabela 3.5 – Fatores e níveis de valores que foram utilizados no planejamento fatorial.....	39
Tabela 4.1 - Valores das variáveis respostas obtidas no planejamento experimental para expressão de BTL2 no cultivo de <i>E.coli</i> recombinante. T_{Cres} = Temperatura de crescimento, T_{Ind} =Temperatura de choque térmico, AE_{esp} =Atividade enzimática específica, $Produt.$ =Produtividade.....	44
Tabela 4.2 - Concentração de aminoácidos não consumidos durante ensaios de expressão de BTL2 por <i>E. coli</i> recombinante ($T_c=27^{\circ}C$; $T_{choque}=45^{\circ}C$), com indução realizada em diferentes fases de crescimento.....	56
Tabela 4.3 - Resumo dos parâmetros cinéticos com glicose.....	61
Tabela 4.6 - Parâmetros e variáveis iniciais para simulação do cultivo de <i>E.coli</i> recombinante em batelada alimentada, utilizando alimentação exponencial calculada a partir da equação 4.4.....	65
Tabela 4.7 - Parâmetros da simulação utilizando maior vazão de alimentação de meio suplementar e $\mu_c = 0,2 h^{-1}$	66

Lista de abreviaturas e siglas

C_p: concentração de produto [g/L]
C_s: concentração de substrato [g/L]
C_x: concentração celular (g/L)
DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico
DO: densidade ótica
DO₅₇₈: Absorbância lida em 578 nm
DOB: Densidade ótica no início da fase de crescimento exponencial de *E. coli* recombinante com DO₅₇₈ = 0,4-0,5
DOA: Densidade ótica na fase de crescimento estacionária de *E. coli* recombinante com DO₅₇₈ = 1,1-1,2
DOM: Densidade ótica no final da fase de crescimento exponencial de *E. coli* recombinante com DO₅₇₈ = 0,8-0,9
E. coli: *Escherichia coli*
F: vazão volumétrica [L/h]
HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência
kDa: kiloDalton
M: molar (mol/L)
mM: milimolar
p-NPP: Palmitato de *p*-nitrofenila
rpm: rotações por minuto
SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida
T_{Choque}: Temperatura de choque térmico (°C)
T_{Cresc}: Temperatura de crescimento celular (°C)
UFC: unidades formadoras de colônia
U/g. c.úmi: Unidades de atividade enzimática por gramas de célula úmida.
(v/v): volume/volume
Y_{x/s}: coeficiente de rendimento de substrato a células [g_{células}/g_{substrato}]

Letras gregas

μ: velocidade específica de crescimento celular (h⁻¹)
μ_{max}: velocidade específica máxima de crescimento celular (h⁻¹)
μ_c: velocidade específica crítica de crescimento (h⁻¹)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Objetivos.....	3
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1	Lipases.....	4
2.1.1	Aspectos gerais das lipases.....	4
2.1.2	Fontes de obtenção das lipases.....	7
2.1.3	Aspectos genéticos e estruturais gerais de lipases.....	10
2.1.4	Mecanismo de catálise.....	12
2.1.5	Características bioquímicas de lipases bacterianas.....	13
2.1.6	Aplicações da lipase.....	18
2.2	Produção de proteínas heterólogas a partir de <i>Escherichia coli</i>	19
2.2.1	Principais aspectos para expressão de genes recombinantes em <i>E. coli</i>	20
2.2.2	Promotor λ PL.....	21
2.3	Produção heteróloga de BTL-2.....	24
2.4	Produção de proteínas heterólogas em biorreator: cultivo de <i>Escherichia coli</i> em alta densidade.....	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.1	Microrganismo empregado no estudo.....	28
3.2	Meios de cultivo.....	28
3.2.1	Experimentos em shaker.....	28
3.2.2	Meio LB-Agar.....	28
3.2.3	Meios para o biorreator.....	29
3.3	Equipamentos.....	30
3.4	Métodos analíticos, de purificação e de medida de atividade enzimática.....	32
3.4.1	Determinação da concentração celular.....	32
3.4.1.1	Turbidimetria.....	32
3.4.1.2	Método Gravimétrico.....	32
3.4.1.3	Plaqueamento e Determinação de Células Viáveis.....	33
3.4.2	Determinação da concentração de ácidos orgânicos (lático, acético e fórmico) e aminoácidos.....	33
3.4.3	Determinação da concentração de glicose.....	33
3.4.4	Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford.....	34
3.4.5	Determinação da atividade enzimática pelo método colorimétrico.....	35
3.4.5.1	Efeito da temperatura na atividade e estabilidade.....	36
3.4.5.2	Determinação da energia de ativação.....	36
3.4.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE.....	38
3.5	Determinação de parâmetros cinéticos e outros cálculos.....	38
3.5.1	Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular.....	38

3.5.2	Determinação do coeficiente de rendimento de substrato a células	39
3.6	Metodologia experimental	40
3.6.1	Planejamento experimental	40
3.6.2	Cultivo do microorganismo em shaker	40
3.6.3	Cultivo do microorganismo em biorreator	42
3.6.4	Obtenção da lipase BTL2	43
3.6.4.1	Por meio de sonicação	43
3.6.4.2	Por meio de “French press”	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1	Influência das temperaturas de crescimento e de choque térmico na expressão de lipase BTL-2 por <i>E.coli</i> recombinante	44
4.2	Determinação da melhor fase de crescimento para a realização do choque térmico	54
4.3	Determinação da concentração de glicose para o ensaio em biorreator	59
4.4	Ensaio no biorreator $T_{Cresc} = 30^{\circ}C$, $T_{Choque} = 45^{\circ}C$	64
4.4.1	Recuperação da enzima: sonicação x French Press	72
4.5	Caracterização cinética de BTL2	74
4.5.1	Influência da temperatura na atividade de BTL2	74
5	CONCLUSÕES	77
6	REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

Lípases (EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia com mais de 10 átomos de carbono a ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. São amplamente usadas em química orgânica por sua alta especificidade, reconhecendo diferentes substratos, com altas região e enantioseletividade, sendo, conseqüentemente, usadas na resolução de muitos compostos racêmicos (ácidos, álcoois, amins, etc). Muitas lípases, porém, são apenas moderadamente estáveis a altas temperaturas e pHs drásticos, o que reduz suas aplicações em algumas reações de interesse. Isso é solucionado com o uso de lípases de microorganismos termófilos que resistem naturalmente a condições drásticas (Palomo et al, 2003).

Bacillus thermocatenulatus é um microorganismo termófilo que produz duas lipases de diferentes tamanhos: 16 e 43 kDa, BTL-1 e BTL-2, respectivamente. Ambas as enzimas apresentam alta estabilidade a temperaturas médias (50°C), pH alcalino (9-11) e em solventes orgânicos (2-propanol, acetona e metanol), podendo ser utilizadas para a resolução de misturas racêmicas, para a produção de intermediários chave na síntese de medicamentos em meio aquoso e para a síntese de biopolímeros e biodiesel.

Os progressos recentes em engenharia genética e biotecnologia permitem a produção de proteínas recombinantes de alto valor agregado utilizando sistemas de expressão microbianos. No entanto, para produzir proteínas recombinantes em quantidades satisfatórias é preciso estabelecer uma integração efetiva entre diversas linhas de conhecimento, entre elas a informação genética do microorganismo hospedeiro, fisiologia, características físicoquímicas da proteína e dos ácidos nucléicos e da engenharia bioquímica, entre outros (Georgiu e Valax, 1996).

E. coli é uma bactéria gram-negativa muito utilizada nesta área, pois é muito bem caracterizada geneticamente e cada dia mais vetores de clonagem são produzidos para esse microorganismo. Além disso apresenta rápido crescimento celular e alta densidade com substratos de baixo custo, (Baneyx, 1999).

Utilizando técnicas de DNA recombinante, o gene da lipase BTL2 de *Bacillus thermocatenulatus* foi clonado em *E. coli* BL321, tendo sido primeiramente expressada sob controle do promotor nativo (Schmidt-Dannert, 1997) e depois sob controle do promotor λP_L , com o qual a indução na produção da enzima é obtida através de choque térmico (Rua et al,

1997). Utilizando esse último promotor, os autores obtiveram altos níveis de expressão intracelular da enzima, em cultivo em meio LB contendo 1g/L de glicose, realizado em frascos agitados, com temperatura de crescimento de 30°C e choque térmico realizado a 42°C, no final da fase exponencial (Rua *et al*, 1997). Esses autores realizaram a seguir cultivo em grande escala, em biorreator, mantendo agitação semelhante à utilizada nos cultivos em frascos. Esse cultivo conduziu a níveis similares de atividade enzimática/g célula úmida e, também similarmente ao cultivo em frasco, a concentração celular ficou em torno de 2 g/L de massa seca.

E. coli BL321 transformada com o plasmídeo de igual construção ao utilizado por Rua *et al*, 1997, foi disponibilizado para utilização pelo grupo de Engenharia de Processos Enzimáticos da UFSCar devido ao surgimento da necessidade de lipase BTL2 livre para a realização do processo de imobilização no grupo de pesquisa.

Uma vez que o promotor é controlado pela temperatura, essa deve ser uma variável importante para se obter aumento nos níveis de expressão da enzima e não se encontrou relatos na literatura sobre a investigação do efeito dessa variável. Foi, por isso, estudada neste trabalho, usando planejamento estatístico, com experimentos em frascos agitados, a influência da temperatura de crescimento e da temperatura de choque no crescimento do microrganismo. A seguir, também em frascos agitados, foram investigadas as influências da fase de crescimento no momento de indução (choque térmico) e concentração de glicose no crescimento do microrganismo, expressão da enzima e geração de ácidos orgânicos.

O processo industrial de expressão heteróloga de proteínas requer obtenção de altas densidades celulares. Isso requer uso de biorreator, pois ele permite controle de pH e do fornecimento de nutrientes, incluindo oxigênio. O uso da estratégia de alimentação contínua de nutrientes - batelada alimentada é usual para alcançar elevadas concentrações celulares em fermentações (Riesenber e Gutke, 1999). O rendimento em batelada alimentada é geralmente superior à batelada e é especialmente proveitoso, quando a mudança de concentração de nutrientes afeta a produtividade e o rendimento do produto desejado (Yamane *et al*, 1984). Foi, por isso, também realizado neste trabalho um cultivo em batelada alimentada, visando aumento da densidade celular e, conseqüentemente, da quantidade de enzima produzida por litro de reator. Finalmente, a enzima obtida foi caracterizada para determinação da temperatura e pH de máxima atividade e estabilidade frente a um solvente.

1.1 Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

- a) Obtenção das melhores condições de processo para a obtenção da lipase BTL2 em frascos agitados.
- b) Escalonamento do ensaio em frascos agitados para processo em batelada alimentada de um biorreator de 2 L.
- c) Caracterização de alguns parâmetros da enzima livre.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Lipases

2.1.1 Aspectos gerais das lipases

As lipases (triacilglicerol éster hidrolase, E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis de cadeia longa (acima de 10 átomos de carbono), sendo a trioleína o seu substrato padrão, aos ácidos graxos correspondentes e glicerol (Figura 2.1), Uma vez que, como toda enzima, lipases são solúveis em água, a especificidade por substratos hidrofóbicos as torna uma classe especial de carboxil éster hidrolases (Diaz et al., 2006; Jaeger e Eggert, 2002).

Além das reações de hidrólise, lipases atuam também com alta especificidade, estabilidade e em condições reacionais brandas, como catalisadores em reações de esterificação, transesterificação, lactonização, acilação regioseletiva e aminólise (Figura 2.2), quando a quantidade de água do sistema em que estão presentes é suficientemente baixa a ponto de deslocar o equilíbrio termodinâmico no sentido da síntese (Krishna e Karanth 2001; Gotor et al., 2002; Ghanem e Aboul-Enein, 2004; Rassy et al., 2004; Foresti e Ferreira 2006).

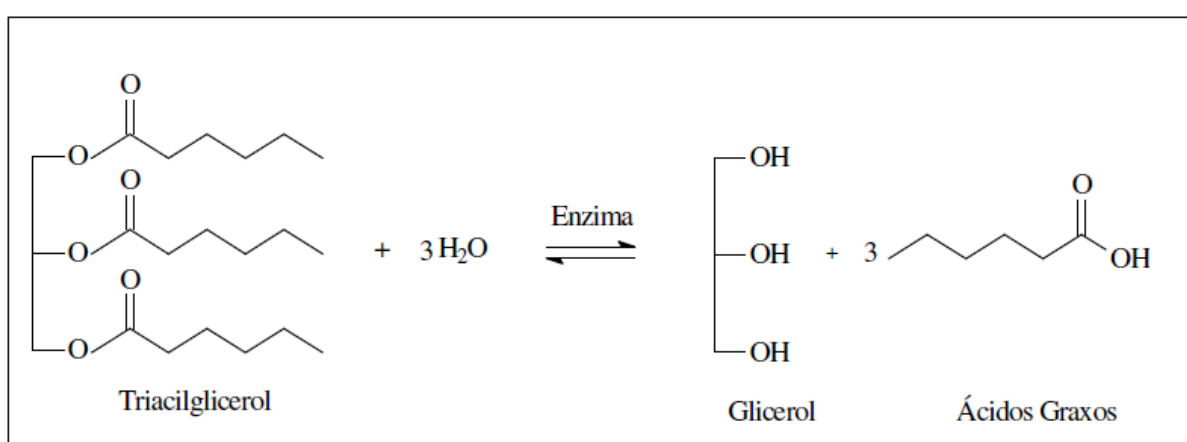


Figura 2.1 - Reação geral de hidrólise de um triacilglicerol. (Fonte: Jaeger e Reetz, 1998)

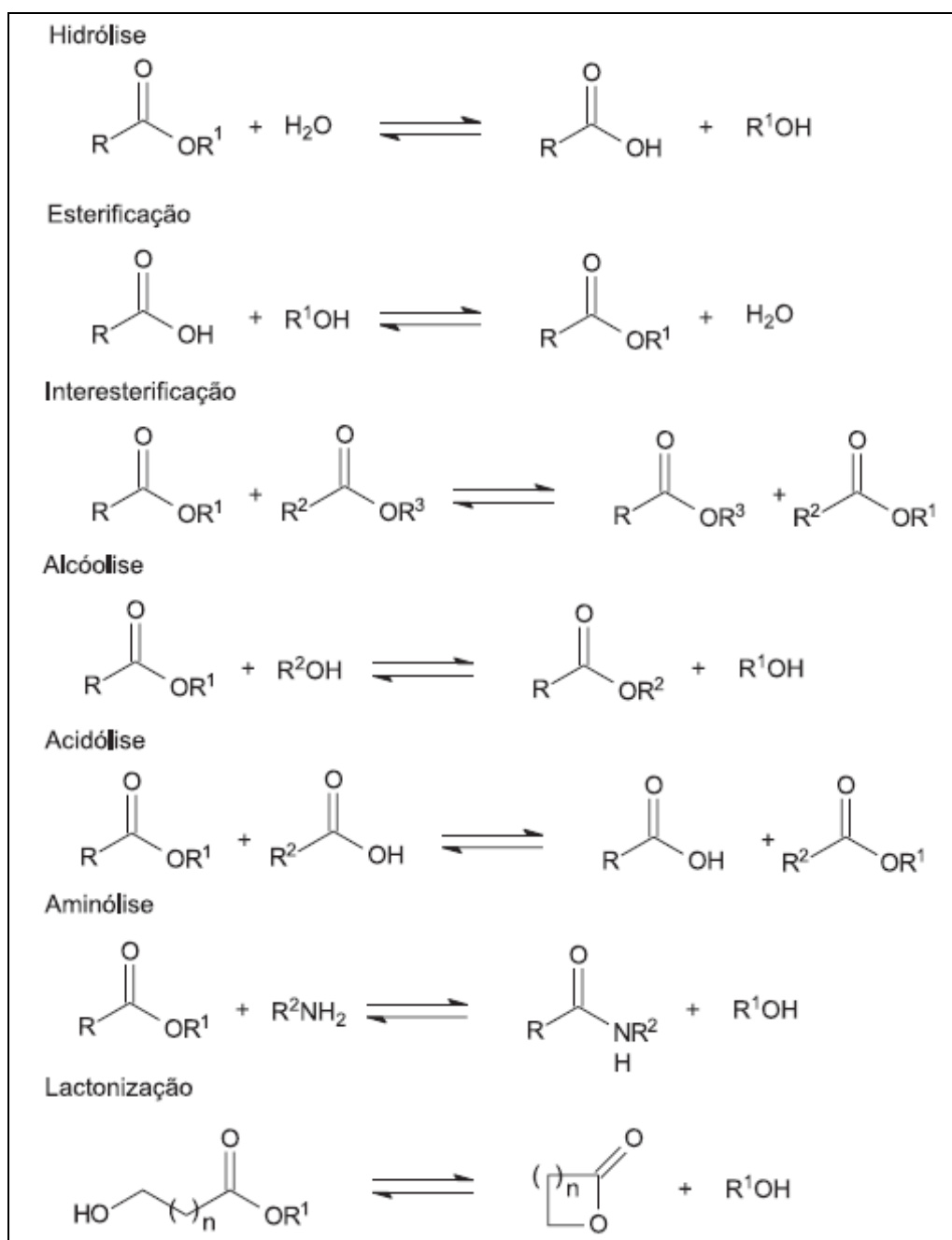


Figura 2.2 - Reações catalisadas por lipases (Fonte: Paques e Macedo, 2005).

Em 1958, Sarda e Desnuelle propuseram definir lipases a partir de suas características cinéticas, utilizando como critério a propriedade de ativação na presença de substratos insolúveis em água e na presença de uma interface lipídeo/água. Segundo estes autores, as lipases seriam ativadas na presença de ésteres emulsionados. Este fenômeno, chamado de ativação interfacial, foi explicado quando foram determinadas as estruturas

tridimensionais de algumas lipases como a pancreática humana (Winkler et al., 1979), de *Rhizomucor miehei* (Brady et al., 1990), *Geotrichum candidum* (Shrag et al., 1991) e quando verificou-se, em algumas lipases, a existência de uma tampa hidrofóbica (*lid*) cobrindo o sítio ativo da enzima. De acordo com Aloulou et al. (2006), a tampa hidrofóbica, que se move apenas quando encontra uma outra molécula hidrofóbica na interface, como um lipídeo, sofre uma mudança conformacional, expondo o seu sítio ativo e permitindo a catálise da reação. Do ponto de vista estrutural, existem evidências que sugerem que a lid pode propiciar a atividade catalítica e determinar a seletividade de algumas lipases (Secundo et al., 2006). As lipases de *Cândida antarctica* (Uppenberg et al., 1994), *Geotrichum candidum* (Schrag et al., 1991), *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* e *R. miehei* (Brady et al., 1990; Ollis et al., 1992; Cajal et al., 2000 a,b) são exemplos de lipases que apresentam a tampa em suas estruturas e sofrem ativação interfacial. Entretanto, em outros casos, a existência da lid não implica necessariamente em ativação interfacial. Este é o caso das lipases de *P. aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *C. antarctica B* (Jaeger e Reetz, 1998, Jaeger et al., 1994), que possuem a lid mas não sofrem ativação interfacial. Por outro lado, as cutinases, que são das menores lipases de estrutura conhecida (19 kDa), não apresentam a tampa catalítica e não precisam da interface para exercer sua atividade hidrolítica (Cygler e Schrag, 1997; Yao e Koller, 1994). Portanto, nem o critério de ativação interfacial, nem o da existência da tampa são suficientes para a caracterização de uma lipase.

As lipases têm sido definidas, nos trabalhos mais recentes, como carboxilesterases, que hidrolisam acilgliceróis com cadeia acila com mais de dez átomos de carbono, enquanto que as enzimas que hidrolisam acilgliceróis compostos de ácidos graxos de cadeia curta (menos de dez átomos de carbono) são reconhecidas como as esterases-carboxil éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3 (Jaeger et al., 1999; Nini et al., 2001; Sharma et al., 2001; Castro-Ochoa et al., 2005; Bornscheuer, 2002).

A diferenciação entre lipases e esterases também tem sido feita pela diferença de especificidade preferencial das duas enzimas. Os substratos naturais para lipases são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações éster tríplices, enquanto esterases atuam sobre ligações éster únicas, liberando ácidos graxos de baixa massa molar (Bier, 1955; Brockman, 1984). A maioria das lípases pode hidrolisar os substratos de esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro (Jaeger et al., 1999).

2.1.2 Fontes de obtenção das lipases

Aproximadamente cem anos atrás, o microbiologista C. Eijkmann reportou que diferentes cepas bacterianas poderiam produzir e secretar lipases (Jaeger e Eggert, 2002). A partir de 1906, iniciaram-se os estudos sobre produção de lipases utilizando-se diversos microrganismos como bactérias, fungos e leveduras (Hasan et al., 2006). Hoje se conhece um grande número de microrganismos selvagens e recombinantes produtores de lipases, (Tabela 2.1, págs. 10-13).

Entretanto, este número de microrganismos classificados representam apenas um pequeno percentual da biodiversidade dos microrganismos que potencialmente podem produzir enzimas, e que ainda não foram caracterizados (aproximadamente 0,2 a 0,6% para bactérias e de 5% para fungos). Esta grande abundância de microrganismos existentes na natureza torna importante o “screening” e o isolamento de novas cepas produtoras de enzimas com características desejáveis em biocatálise (Wubbolts et al, 2000).

As lipases diferem grandemente com respeito à origem (bacteriana, fúngica, vegetal, animal) e propriedades cinéticas. Do ponto de vista econômico e industrial, as lipases obtidas de microrganismos (bactérias, leveduras e fungos) são as mais utilizadas, devido a sua relativa facilidade de produção e abundância de microrganismos capazes de sintetizá-las.

Dentre os microrganismos, os fungos são especialmente valorizados porque as enzimas por eles produzidas normalmente são extracelulares, o que facilita a sua recuperação do meio de fermentação, e ainda a maioria dos fungos não são nocivos à saúde humana sendo reconhecidos como GRAS “Generally Regarded as Safe” (Olemska-Beer *et al.*, 2006). Por outro lado, o baixo crescimento celular dos fungos em relação as fontes bacterianas produtoras destas enzimas é uma das desvantagens dos processos fermentativos (Jaeger et al., 1999).

Fungos de diversos gêneros demonstraram ser bons produtores de lipases e as suas enzimas têm sido estudadas sob o ponto de vista acadêmico e industrial. Por exemplo, lipases de *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Mucor javanicus*, *Rhizopus niveus*, *R. oryzae*, *Penicillium camembertii*, *P. roqueforti* e da levedura *Candida rugosa* são comercializadas atualmente pela Amano (Amano Europe Enzyme Ltd., UK) para processamento de óleos, gorduras e queijos, para a determinação de triglicerídeos, como aditivos em preparações digestivas e para síntese quiral.

Dentre as bactérias produtoras de lipases, disponíveis comercialmente, estão as enzimas de *Pseudomonas sp.*, *P. fluorescens*, *Burkholderia (P.) cepacia* que são utilizadas em síntese quiral e as lipases de *Burkholderia sp* e *Arthrobacter sp.*, utilizadas na determinação diagnóstica de triacilgliceróis.

Tabela 2.1 - Principais microorganismos produtores de lipase

BACTÉRIAS	
Microrganismo	Referencia
<i>Bacillus sp.</i>	
<i>Bacillus GK8</i>	Dosanjh e Kaur, 2002.
<i>B. alcalophilus</i>	Ghanem et al., 2000.
<i>B. circulans (esterase)</i>	Kademi et al., 2000.
<i>B. licheniformis</i>	Nthangeni et al., 2001.
<i>B. megaterium</i>	Lima et al., 2004; Ruiz et al., 2002.
<i>B. stearothermophilus</i>	Kambourova et al., 2003; Kim et al., 2000.
<i>B.stearothermophilus P1</i> (recombinante)	Sinchaikul et al., 2001.
<i>B. subtilis</i>	Maqbool et al., 2002; Lessuisse et al., 1993.
<i>B. thermoleovorans</i>	Castro-Ochoa et al., 2005; Lee et al., 2001; Cho et al., 2000.
<i>B. thermocatenuatus</i>	Schmidt-Dannert et al., 1994.
<i>B. thermocatenuatus</i> (recombinante)	Quyên et al., 2003; Rúa et al., 1997;
<i>Bacillus sp.</i>	Sana et al., 2007; Ruiz et al., 2003; Sharma et al., 2002; Imamura e Kitaura, 2000; Dharmsthiti et al., 1999; Sugihara et al., 1991.
<i>Burkholderia sp.</i>	
<i>B. cepacia</i>	Fernandes et al., 2006.
<i>B. Glumae</i>	El Khattbi et al., 2000.
<i>Burkholderia sp.</i>	Yeo et al., 1998.
<i>Pseudomonas sp.</i>	
<i>P. aeruginosa LST-03</i>	Ogino et al., 2004; Ogino et al., 2000.
<i>P. cepacia</i>	Pencreac'h et al., 1997; Sugihara et al., 1992.
<i>P. fluorescens</i>	Kojima et al., 2003; Makhzoum et al., 1996; Sugihara et al., 1977.
<i>P. fragi</i>	Schuepp et al., 1997; Nishio et al., 1987; Lu e Liska, 1969.
<i>P. luteola</i>	Litthauer et al., 2002.
<i>P. mendocina PK-12CS</i>	Jinwal et al., 2003.
<i>P. pseudomallei</i>	Kanwar e Goswami, 2002.
<i>Pseudomonas sp.</i>	Suzuki et al., 2003; Sakiyama et al., 2001; Rathi et al., 2000; Yamamoto et al., 1988.
<i>Chromobacterium sp.</i>	
<i>C. viscosum</i> var. <i>paralipolyticum</i>	Sugiura et al., 1974.
<i>C. viscosum</i>	Sugiura e Isobe, 1974; Yamaguchi et al., 1973.
<i>Propionibacterium sp.</i>	
<i>P. acidi-propionici</i>	Sarada e Joseph, 1992.
<i>P. acnes</i>	Ingham et al., 1981.
<i>P. freudenreichii ITG 4</i>	Kakariari et al., 2000; Dupuis et al., 1993.
<i>Streptococcus sp.</i>	
<i>Streptococcus sp. N1</i> (recombinante)	Tripathi et al., 2004.
<i>S. faecalis</i>	Chander et al., 1979.
<i>Staphylococcus sp.</i>	
<i>S. aureus</i>	Jung et al., 2002; Simons et al., 1996; Rollof et al., 1987; Muraoka et al., 1982.
<i>S. epidermidis</i>	Simons et al., 1998.
<i>S. haemolyticus</i>	Oh et al., 1999.
<i>S. simulans</i>	Sayari et al., 2001.

<i>S. warneri</i>	van Kampen et al., 2001; Talon et al., 1995.
<i>Staphylococcus sp.</i>	Lee et al., 2001.
<i>Serratia sp.</i>	
<i>S. marcescens</i>	Abdou, 2003; Kim et al., 1996; Li et al., 1995; Matsuma et al., 1994.
FUNGOS	
<i>Aspergillus sp</i>	
<i>A. carneus</i>	Saxena et al., 2003.
<i>A. Níger</i>	Mahadik, et al., 2002; Van Heerden et al., 2002; Namboodiri et al., 2000; Kamini e Puvanakrishnan, 1998; Pokorny et al., 1997; Hatzinikolaou et al., 1996; Höfelmann et al., 1985.
<i>A. repens</i>	Kaminishi et al., 1999.
<i>A. oryzae</i>	Toida et al., 1998; Toida et al., 1995.
<i>A. nidullans</i>	Mayordomo et al., 2000.
<i>A. terreus</i>	Gulati et al., 1999; Yadav et al., 1998.
<i>Fusarium sp</i>	
<i>F. solana</i>	Maia et al., 1999.
<i>Fusarium sp YM-30</i>	Mase et al., 1995.
<i>F. oxysporum sp vasinfectum</i>	Rapp , 1995.
<i>F. heterosporum</i>	Nagao et al., 1998.
<i>F. heterosporum</i>	Shimada et al., 1993.
<i>F. oxysporum</i>	Hoshino et al., 1992.
<i>Geotrichum sp</i>	
<i>G. candidum</i>	Gopinath et al., 2003; Catoni et al., 1997; Sugihara et al., 1990.
<i>Geotrichum sp</i>	Macedo et al., 1997.
<i>Galactomyces geotrichum</i>	Phillips et al., 1991.
<i>Mucor sp</i>	
<i>M. hiemalis f. hiemalis</i>	Hiol et al., 1999.
<i>M. hiemalis</i>	Akhtar et al., 1980.
<i>M. javanicus</i>	Saiki et al., 1969.
<i>Rhizomucor miehei</i>	Uvarani et al., 1998.
<i>Mucor sp</i>	Abbas et al., 2002.
<i>Neurospora sp</i>	
<i>Neurospora sp. TT-241</i>	Lin et al., 1996.
<i>Neurospora sp. TT-241</i>	Kundu et al., 1987.
<i>Penicillium sp.</i>	
<i>P. abeanum</i>	Sugihara et al., 1996.
<i>P. aurantiogriseum</i>	Lima et al., 2004.
<i>P. candidum</i>	Ruiz et al., 2001.
<i>P. caseicolum</i>	Alhir et al., 1990.
<i>P. chrysogenum</i>	Ferrer et al., 2000.
<i>P. citrinum</i>	Krieger et al., 1995; Malizewska e Mastalerz, 1992.
<i>P. coryophilum</i>	Baron et al., 2005.
<i>P. cyclopium</i>	Chahinian et al., 2000; Ibrik et al., 1998; Druet et al., 1992; Isobe et al., 1988.
<i>P. expansum</i>	Stoecklein et al., 1993.
<i>P. restrictum</i>	Castilho et al., 2000; Gama et al., 2000; Gombert et al., 1999; Freire, 1997.
<i>P. roqueforti IAM 7268</i>	Mase et al., 1995.
<i>P. simplicissimum</i>	Sztajer et al., 1992.
<i>P. wortmanii</i>	Costa et al ., 1999.
<i>Rhizopus sp</i>	
<i>R. chinensis</i>	Yasuda et al., 1999.
<i>R. delemar</i>	Haas et al., 1992.
<i>P. expansum</i>	Toida et al., 1998.
<i>R. homothallicus</i>	Rodriguez et al., 2006; Diaz et al., 2006.
<i>R. microsporus UZLT-4B</i>	Dierov et al., 1993.
<i>R. niveus</i>	Kermasha et al., 1998.
<i>R. oligosporous</i>	Dalsenter et al., 2005; Ul-Haq et al., 2002.
<i>R. oryzae</i>	Ghangui et al., 2004; Hiol et al., 2000; Razak et al., 1999; Takahashi et al., 1999; Beer et al., 1998;

	Essamri et al., 1998; Minning et al., 1998; Bensalah et al., 1994; Salleh et al., 1993.
<i>Rhizopus sp. L-1</i>	Lusta et al., 1999.
LEVEDURAS	
<i>Candida sp.</i>	
<i>C. antarctica</i>	Shimada et al., 2002.
<i>C. rugosa LIP4</i>	Lee et al., 2002; Benjamin et al., 2001; Pernas et al., 2000.
<i>C. cylindracea</i>	Rua et al., 1993; Tomizuka et al., 1966.
<i>C. rugosa B</i>	Lopez et al., 2000.
<i>Candida sp</i>	Qing-Xun e Dong-Zhi, 2002.
<i>Cryptococcus sp</i>	
<i>Cryptococcus sp S-2</i>	Kamini et al., 2000.
<i>Ophiostoma sp</i>	
<i>O. piliferum</i>	Brush et al., 1999.
<i>O. piceae</i>	Gao e Breuil, 1998.
<i>Humicola sp.</i>	
<i>H. lanuginosa n.3</i>	Omar et al., 1987.
<i>H. lanuginosa S-38</i>	Liu et al., 1972.
<i>Streptomyces sp.</i>	
<i>S. rimosus</i>	Abramic'et al., 1999.
<i>Pichia sp.</i>	
<i>P. burtonii</i>	Sugihara et al., 1995.
<i>Yarrowia sp.</i>	
<i>Y. lipolytica</i>	Corzo e Revah, 1999; Destain et al., 1997.
<i>Kluyveromyces sp.</i>	
<i>K. marxianus</i>	Deive et al., 2003.
<i>Kurtzmanomyces sp.</i>	
<i>Kurtzmanomyces sp I-11</i>	Kakugawa et al., 2002.

2.1.3 Aspectos genéticos e estruturais gerais de lípases

A estrutura terciária de todas as lipases descritas, tanto de eucariotos quanto procariotos, é do tipo α/β hidrolase (Schrag e Cygler, 1997) (Figura 2.3). Este tipo de estrutura apresenta um núcleo central composto por fitas β paralelas rodeadas por porções em α -hélice. As fitas β têm orientação para a esquerda, e a primeira e a última fita possuem um ângulo de aproximadamente 90° entre si.

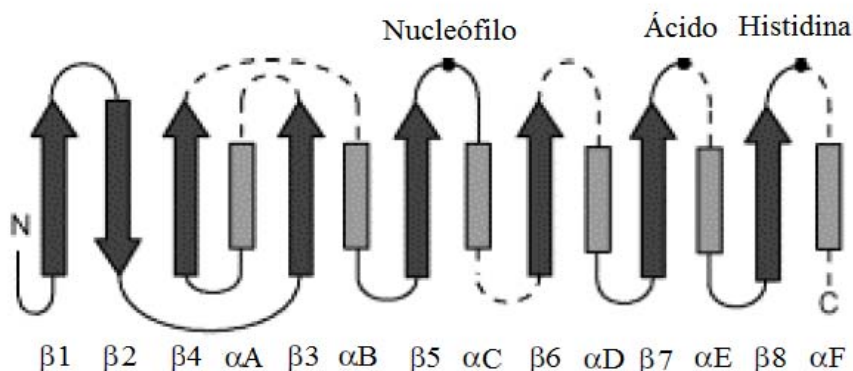


Figura 2.3 - Modelo estrutural de α/β hidrolases. (Fonte: Pouderoyen *et al*, 2001)

Arpigny e Jaeger, 1999, propuseram uma classificação para lipases, esterases e fosfolipases bacterianas, baseada na similaridade das diversas enzimas com a lipase de *Pseudomonas aeruginosa* (100 %). As seqüências de aminoácidos e nucleotídeos foram obtidas a partir dos dados depositados no NCBI e a comparação entre elas foi realizada com o programa BLAST 2.0. A classificação inclui oito famílias de enzimas lipolíticas.

Jaeger e Eggert, 2002, fizeram uma atualização da família I desta classificação. Nesta família estão agrupadas as lipases “verdadeiras”, ou seja, as carboxilesterases que hidrolisam substratos de cadeia longa. A família I está dividida em 6 sub-famílias.

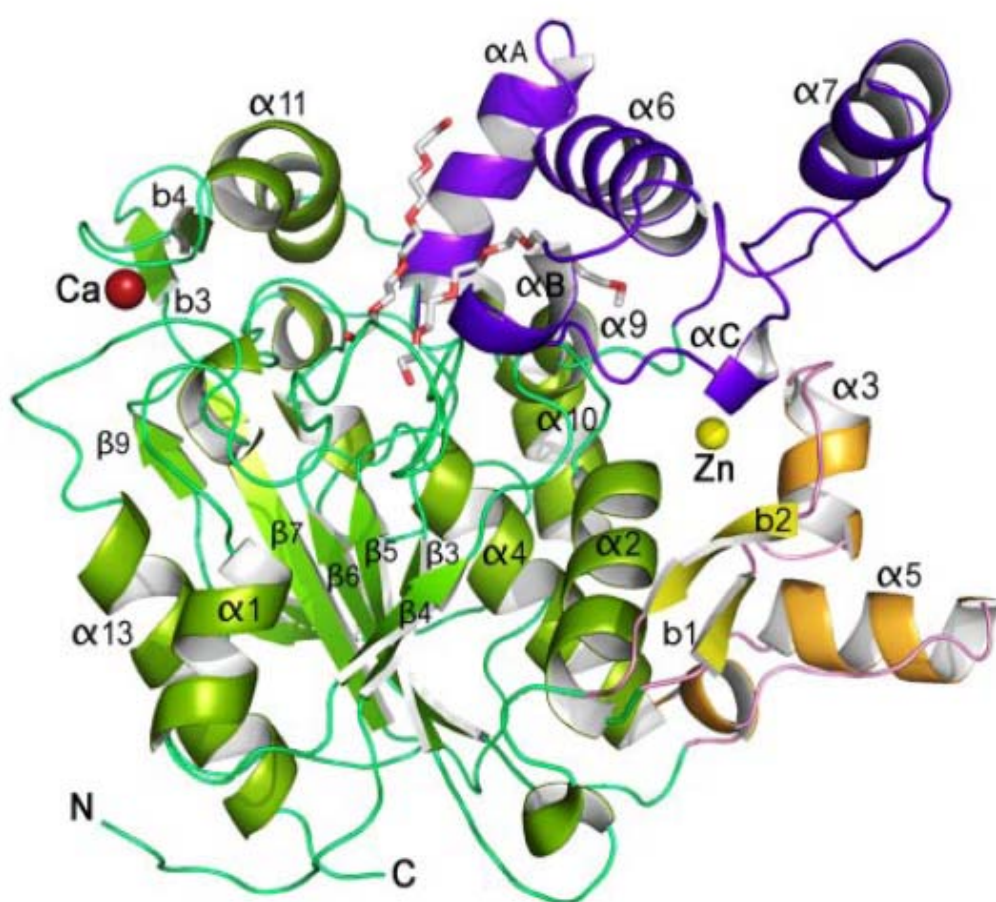


Figura 2.4 - Estrutura da conformação aberta da lipase BTL2 ligada a duas moléculas de Triton X-100. (Fonte: Carrasco-López *et al*, 2009)

A sub-família I.4 inclui lipases de *Bacillus* mesófilos (*B. subtilis* – n. acesso M74019, *B. pumilus* – n. acesso A34992, *B. licheniformis* – n. acesso AJ297356), enquanto na sub-família I.5 estão as lipases de *Staphylococcus* e de cepas termófilas de *Bacillus* (*B. stearothermophilus* – n. acesso U78785, *B. thermocatenulatus* – n. acesso X95309 (Figura 2.4), *B. thermoleovorans* – n. acesso AF134840) (Arpigny e Jaeger, 1999 e Eggert *et al.*,

2001). As lipases destas famílias apresentam similaridade com a lipase de *P. aeruginosa* em torno de 15%.

2.1.4 Mecanismo de catálise

O mecanismo catalítico das reações de hidrólise ou síntese de ésteres é semelhante para as lipases e proteases, devido à semelhança estrutural entre o sítio ativo destas enzimas (presença da tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu). O mecanismo é composto por quatro etapas e segue o modelo proposto para a quimotripsina, uma serina protease (Figura 2.5).

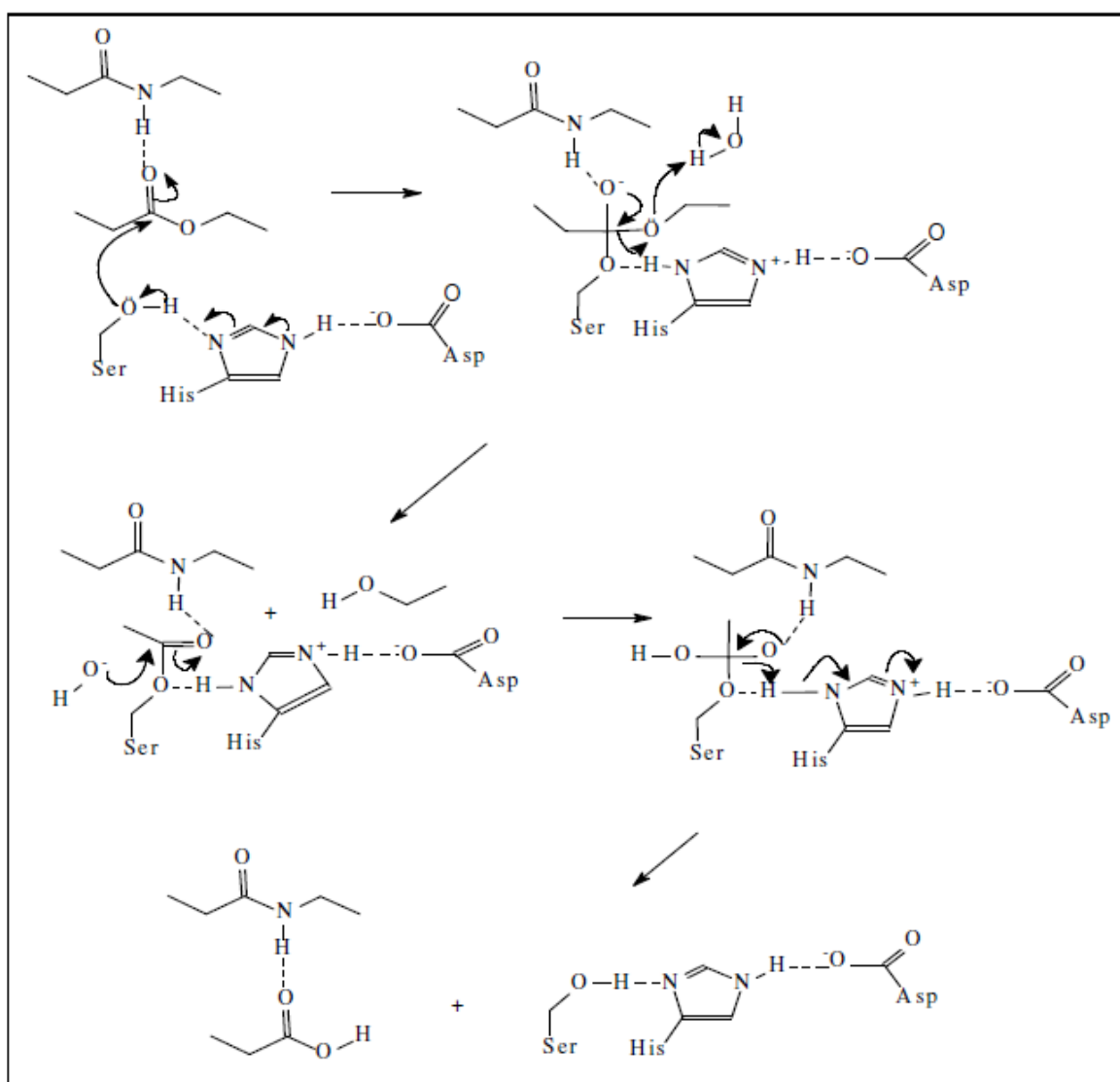


Figura 2.5 - Mecanismo catalítico de lipase. (Fonte: Jaeger *et al*, 1994)

Inicialmente, a histidina da tampa hidrofóbica aumenta a nucleofilicidade do grupo hidroxila da serina do sítio catalítico. Ocorre, então, um ataque nucleofílico do oxigênio da hidroxila serínica ao carbono carbonílico da ligação éster da cadeia do substrato, formando um intermediário tetraédrico, que é estabilizado pelos resíduos catalíticos de His e Asp. Uma molécula de álcool é liberada, formando um complexo acil-enzima. Em um segundo ataque nucleofílico por um íon hidroxila da água, o ácido graxo é liberado e a enzima é regenerada (Bornscheuer, 2002; Bornscheuer e Kazlauskas, 1999 apud Baron, 2008).

O mecanismo catalítico das lipases também está relacionado a algumas propriedades estruturais e conformacionais, como a hidrofobidade de partes de sua estrutura e à presença da *lid* ou tampa hidrofóbica em algumas lipases. As enzimas que contêm a *lid* podem apresentar duas conformações, uma fechada e inativa, com a *lid* cobrindo o sítio ativo e uma aberta e ativa, como pode ser observado na figura 2.6.

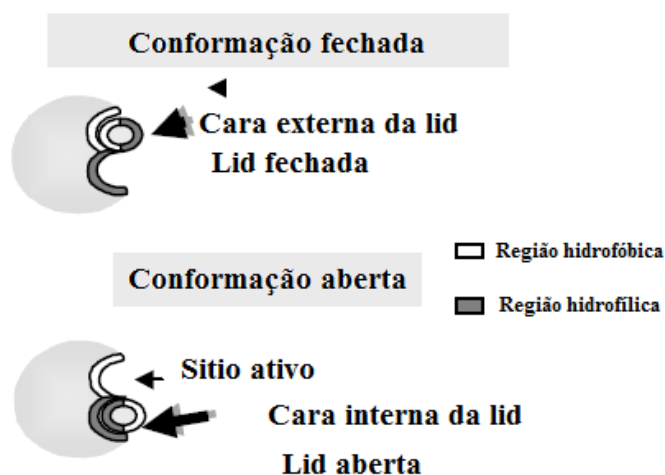


Figura 2.6 - Conformações estruturais de uma lipase contendo *lid*. (Fonte: Palomo *et al.*, 2004).

2.1.5 Características bioquímicas de lipases bacterianas

De maneira geral, as lipases bacterianas da família I.4 e I.5 atuam em faixas médias e altas de temperatura (Jaeger e Eggert, 2002). Já a lipase do *B. sphaericus* MTCC 7526 apresenta atividade ótima em 15° C, fazendo parte das lipases que tem maior atividade em baixas temperaturas (Cold active lipases) (Joseph, *et al* 2008). Muitas lipases bacterianas atuam em uma faixa de pH alcalino. Das vinte duas lipases apresentadas na Tabela 2.2, nove apresentam atividade máxima numa faixa de pH entre 8,5 e 11,5. A termoestabilidade é uma

das características requeridas de enzimas que têm potencial para aplicação industrial, caso de lipases, uma vez que muitos processos usam temperaturas em torno de 50 °C.

O *B thermocatenulatus* produz duas lipases de diferentes tamanhos: 16 e 43 kDa, BTL-1 e BTL-2, respectivamente. A lipase BTL-1 apresenta um alto conteúdo de aminoácidos (aa) hidrofóbicos (39,4%), em média as lipases bacterianas apresentam 35% de aa, também a lipase BTL-1 possui um tamanho menor com respeito as lipases de baixo peso molecular (\cong 20 kDa). Além destas, a mesma apresenta uma boa estabilidade com solventes orgânicos e detergentes entre 60 e 70°C e pH 7-8 com p-NPP e azeite de oliva como substratos; atividade específica de 50 U/mg que é considerada baixa com respeito as atividades enzimáticas apresentadas pelos microorganismos mesófilos (Schmidt-Dannert *et al*, 1994, 1996, 1997).

BTL-2 recombinante, gene obtido da biblioteca genômica de *Bacillus thermocatenulatus*, e expressada por *E.coli*, apresentou 388 resíduos de aminoácidos, onde 33,2% são hidrofóbicos, sendo este valor abaixo da média geral de lipases; ponto isoelétrico de 7,2; atividade lipolítica máxima na faixa de pH 8-9 e temperatura de 60 -70°C, com p-NPP e azeite de oliva como substratos; alta estabilidade na faixa de pH 9-10 com solventes orgânicos (2-propanol, acetona e metanol) e detergentes (Schmidt-Dannert *et al*, 1996, 1997).

Tabela 2.2 - Características bioquímicas de lipases bacterianas do gênero *Bacillus*.

Microrganismo	Substrato	Atividade			Estabilidade		Referencia
		pH	Temperatura (°C)	Atividade específica	pH	Temperatura (°C)	
<i>B. subtilis</i>	Tributirina (1)	10 (1)	35(2)	420 U/mg	12 (100%, 24 h) (2)	40 (100%, 30 min) (2)	Lessuisse et al, 1993
	p-NPPalmitato (2)						
<i>B. subtilis</i>	Tributirina	8	37	450 U/mg prot.	6-10 (2 h, 25°C)	40 (1 h)	Maqbool et al, 2002
<i>B. subtilis</i> (Lip A) (recombinante)	p-NPButirato	7	37	440 U/mL	Nr	Nr	Mormeneo et al, 2008
<i>B. pumilus</i>	Azeite de oliva	8,5	35	32 U/mg	Nr	40 (1 h)	Kim et al, 2002
<i>B. licheniformis</i>	p-NPPalmitato	10-11,5	50-60	1.6 U/mg	7-12 (4 h, 30°C)	45 (90%, 30 min)	Nthangeni et al, 2001
<i>B. licheniformis</i> MTCC 6824	p-NPPalmitato	8	45	0,64 U/mg	Nd	45 (50%, 82 min)	Chakraborty e Raj, 2008
<i>B. stearotherophilus</i> MC7	p-NPPalmitato	7,5-9	75-80	188 U/mg	7,5-9,5 (30 min, 60°C)	65(100%, 30 min)	Kambourova et al, 2003
<i>B. stearotherophilus</i> (recombinante)	Azeite de oliva	Nr	68	146 U/mg	Nr	55 (100%, 30 min)	Kim et al, 2000

Microrganismo	Substrato	Atividade			Estabilidade		Referencia
		pH	Temperatura (°C)	Atividade específica	pH	Temperatura (°C)	
<i>B. thermocatenulatus</i> (BTL-1)	Azeite de oliva e p-NPPalmitato	7,5-8	60-70	0,43 U/mg	7 (95%, 16,5 h, 30°C)	40 (100%, 30 min)	Schmidt-Dannert et al, 1994
<i>B. thermocatenulatus</i> (BTL-2) (Recombinante)	Tributirina	8,0-9,0	60-70	10225 U/mg	9-11 (100%, 30 min)	40 (100%, 30 min)	Schmidt-Dannert et al, 1996
<i>B. thermocatenulatus</i> (BTL-2) (Recombinante)	Tributirina	8	60	55000 U/mg	9-11 (100%, 30 min)	50 (100%, 30 min)	Rua et al, 1997
<i>B. thermocatenulatus</i> (BTL-2) (Recombinante) (Hospedeiro: <i>Pichia pastoris</i>)	Tributirina	7,5	65	23000 U/mg	7-11 (100%, 30 min)	50 (100%, 30 min)	Quyen et al, 2003
<i>B. thermoleovorans</i> (ID-1) (BTID-A)	Tricaprilina	9	60-65	12,8 U/mg	6-8 (1 dia)	50 (100%, 30 min)	Lee et al, 2001

Microrganismo	Substrato	Atividade			Estabilidade		Referencia
		pH	Temperatura (°C)	Atividade específica	pH	Temperatura (°C)	
<i>B. thermoleovorans</i> (ID-1) (BTID-B) (Recombinante)	Tricaprilina	8,0-9,0	60-65	63,3 U/mg	6-8 (1 dia)	70 (100%, 30 min)	Lee et al, 2001
<i>Bacillus sp BP-6 Lip A</i> (Recombinante)	MUF-butirato (1) p-NPB (2)	7 (1)	45 (1)	1,41 U/mg (2)	4-12 (1 h) (1)	50 (91%, 1 h) (1)	Ruiz et al, 2003
<i>Bacillus sp RSJ-1</i>	p-NPButirato	8	50	2,13 U/mg	8-9 (2 h)	50 (100%, 1 h)	Sharma et al, 2002
<i>Bacillus sp GK-8</i>	p-NPLaurato	8	50	1,42 U/mg	6-10,5 (90%, 1h)	50 (100%, 1 h)	Dosanjh e Kaur, 2002
<i>B. alcalophilus</i>	Azeite de oliva	10,6	60	105 U/mL	11 (80%, 60°C)	80 (80%, 20 min)	Ghanem et al, 2000
<i>B. cereus C71</i>	p-NPButirato	9	33	0,2 U/mg	Nd	35 (92%, 3 h)	Chen et al, 2007
<i>B. sphaericus</i> MTCC 7526	p-NPPalmitato	8	15	1,3 U/mg	8 (100%, 30 min)	30 (100%, 30 min)	Joseph, 2006
<i>Geobacillus sp. TW1</i> (Recombinante)	p-NPButirato	7-8	40	Nr	8 (100%, 15 min, 40°C)	50 (80%, 15 min)	Li e Zhang, 2005
<i>B. circulans</i> (esterase)	p-NPCaprato	8	60	0,1 U/mg	8-10 (1 h)	70 (100%, 1 h)	Kademi et al, 2000

2.1.6 Aplicações da lipase

As lipases, como biocatalisadores, apresentam importantes vantagens sobre os catalisadores clássicos industriais. Suas características de especificidade, regioseletividade e enantioseletividade, permitem a síntese de compostos de alta pureza, com um número reduzido de subprodutos e baixa geração de resíduos. Além disso, os processos enzimáticos evitam o uso de compostos químicos com alto potencial poluentes; são mais econômicos; apresentam maior facilidade de manuseio; requerem temperatura e pressão ambientes, condições estas que minimizam a degradação de compostos lábeis (Castro-Ochoa *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2005; Villeneuve *et al.*, 2000). Conseqüentemente, uma considerável atenção tem sido dada ao uso das lipases em aplicações industriais.

O uso de lipases como aditivos em detergentes ainda representa a maior aplicação industrial destas enzimas (Kirk *et al.*, 2002). Entretanto, a capacidade hidrolítica das lipases têm sido explorada em vários outros campos de atividade, como, por exemplo, na indústria de papel e celulose para a remoção do “pitch”, este é um termo usado para descrever todo tipo de material hidrofóbico da madeira, como triacilgliceróis e ceras, que são indesejáveis na manufatura de papel (Jaeger e Reetz, 1998). Podem também ser utilizadas para a remoção de óleo presente nas águas residuárias de fábricas, restaurantes e residências, ou proveniente de indústrias de refinação de óleos e que poluem solos e águas (Camarota *et al.*, 2001, Pandey *et al.*, 1999 e Jaeger e Reetz, 1998). Ainda, lipases e proteases têm sido responsáveis pelo desenvolvimento de aromas em queijos e derivados, bebidas alcoólicas, achocolatados e sobremesas, pela hidrólise seletiva de triacilgliceróis e liberação de ácidos graxos, que atuam como flavorizantes ou como precursores destes (Jaeger e Reetz, 1998).

As lipases termoestáveis, obtidas de diversas fontes microbianas como as de *Bacillus* e *Pseudomonas*, apresentam grandes vantagens em aplicações biotecnológicas, pois podem ser produzidas a baixo custo e são estáveis a elevadas temperaturas. As principais vantagens em utilizar biocatalisadores termoestáveis, ou seja, aqueles que catalisam reações a elevadas temperaturas são: maior reatividade (maior velocidade de reação e difusão); maior rendimento da reação (elevadas temperaturas aumentam a solubilidade dos substratos e produtos hidrofóbicos além de favorecer o deslocamento do equilíbrio no sentido endotérmico); menor viscosidade do substrato e risco de contaminação microbiana (Hasan *et al.*, 2006). Todas estas qualidades fazem das lipases microbianas um catalizador muito útil para sínteses poliméricas,

transesterificações para produção de biodiesel a partir de óleo vegetal e síntese de química fina são outras de suas múltiplas aplicações (Jaeger e Eggert, 2002).

Ainda, segundo as propriedades bioquímicas da lipase BTL2 apresentadas na seção anterior, esta lipase pode ser estudada como um biocatalizador para síntese orgânica, possuindo boa seletividade com substratos quirais e uma alta enantioseletividade para alcoís secundários com respeito aos primários (Liu *et al*, 2001). Ela vem sendo, pois, estudada para resolver misturas racêmicas de diferentes compostos e intermediários chaves na síntese de fármacos em meio aquoso, tais como: (-)-Paroxetina que é usado em tratamentos contra a depressão, transtornos obsessivos compulsivos e de pânico; (S)-Zopiclone que é um agente hipnótico e (S)-Enalapril que ajuda a controlar a hipertensão e a deficiência cardíaca (Palomo *et al*, 2005). Uso de BTL-2 em reações de esterificação também foi relatado (Ramos-Martín *et al*, 2005).

Entre as maiores empresas produtoras de enzimas estão a Amano Pharmaceuticals (Japão), Novozyme (Dinamarca), Genencor International (USA), Unilever (Holanda), Biocatalysts (Inglaterra) e Meito Sankyo (Japão) (Krishna, 2002).

2.2 Produção de proteínas heterólogas a partir de *Escherichia coli*

Até meados dos anos setenta, a *Escherichia coli* não tinha grande importância industrial. Com o advento da tecnologia do DNA recombinante, essa perspectiva mudou, principalmente, porque grande parte desta tecnologia foi desenvolvida com estudos utilizando este microrganismo, plasmídeos e fagos compatíveis.

Atualmente a *Escherichia coli* é o microrganismo mais bem estudado e explorado a pesar que *Sacharomyces* é considerado hoje em dia o melhor hospedeiro para a produção de proteínas heterólogas.

O profundo conhecimento da fisiologia e organização genética de *E. coli* permitiu que fossem desenvolvidas e aprimoradas diversas técnicas de manipulação genética. Genes estranhos ao seu genoma podem lhe ser introduzidos em plasmídeos e fagos ou até no seu próprio genoma com relativa facilidade e previsibilidade.

2.2.1 Principais aspectos para expressão de genes recombinantes em *E. coli*

A expressão de genes heterólogos é influenciada por diversos fatores dentre os quais destacam-se a estabilidade e o número de cópias do plasmídeo, a força do promotor, a estabilidade do mRNA, a eficiência de transcrição e tradução, as modificações pós-traducionais, a estabilidade e a solubilidade da proteína recombinante, e da célula hospedeira e as condições de cultivo (Sawers e Jarsch, 1996, apud Lima, 2004).

A produção de elevadas quantidades de uma proteína heteróloga é baseada em sistemas de expressão fortes, os quais são regulados ao nível de transcrição e utilizam promotores de indução tais como P_{lac} , λP_L e λP_R ou o promotor da T7 RNA polimerase (Swartz, 1996, Vincent et al., 1999, apud Lima, 2004). Alguns sistemas de produção de proteínas recombinantes utilizam a indução após uma determinada fase de crescimento celular durante a qual a formação é nula ou muito baixa (Lin, 2000). Depois de acionado o sinal de indução, a taxa específica de produção alcança o seu valor máximo por um período curto de tempo e a síntese do produto continua por algumas horas. Isto é suficiente para que a proteína recombinante seja parte significativa da proteína celular. Essa elevada síntese da proteína heteróloga também afeta o metabolismo central, o que eventualmente pode resultar em um acúmulo de acetato (Shimizu et al, 1988, Seeger et al., 1995).

As condições ambientais para a cultura de microrganismos são um ponto importante para o sucesso de bioprocessos. A limitação de nutrientes gera stress nas bactérias, levando ao aumento de células desprovidas de plasmídeos. Vários relatos indicam que a limitação de carbono, nitrogênio, fósforo e outros elementos podem ser prejudiciais à estabilidade do plasmídeo. A instabilidade em condições nutricionais limitantes pode ocasionar uma redução do número de cópias do plasmídeo, pois este é particularmente afetado pela limitação de fósforo e magnésio no meio de fermentação, enquanto que a limitação de glicose e amônia leva a um aumento no número de cópias do plasmídeo (Lima, 2004).

O efeito da temperatura na produção de proteínas recombinantes necessita de maiores investigações, pois afeta a estabilidade e o número de cópias do plasmídeo. O nível de oxigênio no meio tem igualmente grande efeito no metabolismo dos microrganismos. De um modo geral, a perda do plasmídeo aumenta com a diminuição da taxa de oxigenação. Um aumento na taxa de perda do plasmídeo pode ser a principal causa para a instabilidade (Kumar et al., 1991 apud Lima, 1994).

A perda de plasmídeos por distribuição defeituosa dos mesmos entre células filhas durante a divisão celular é chamada de instabilidade segregativa. Outra fonte de

instabilidade é originada de mudanças estruturais como mutação pontual, deleção, inserção e arranjo do DNA do plasmídeo. Este tipo de instabilidade recebe o nome de instabilidade estrutural. As células resultantes, sem plasmídeo ou alteradas estruturalmente, são improdutivas (Summers, 1991, apud Lima, 2004) e contribuem para uma menor produtividade do processo.

Com o objetivo de aumentar a estabilidade do plasmídeo, algumas estratégias são adotadas e podem ser chamadas de métodos seletivos. Estes métodos incluem a manutenção da pressão seletiva por incorporação de antibióticos no meio de cultura, complementação de auxotrofia no microorganismo hospedeiro, por incorporação de vetores plasmidiais de marcadores auxotróficos, repressão de fagos lisogênicos e incorporação de proteínas ou RNA suicidas (Lin, 2001).

2.2.2 Promotor λ PL

Sistemas de expressão baseados no promotor P_L e/ou P_R do bacteriófago λ , em combinação com o repressor (cI857) sensível à temperatura, são usados extensivamente para a produção de proteínas recombinantes em *Escherichia coli* (Makrides, 1996). Os sistemas de expressão induzidos por temperatura mostram altos níveis de produção de proteína recombinante e apresentam características importantes e convenientes para os bioprocessos. Como pode ser observado na figura 2.7 a transcrição de genes heterólogos é reprimida altamente a temperaturas abaixo de 37° C, porém, o incremento progressivo de temperatura causa um incremento dos níveis de indução até o máximo, que é atingido a 42°C (Caulcott e Rhodes, 1986; Villaverde et al., 1993).

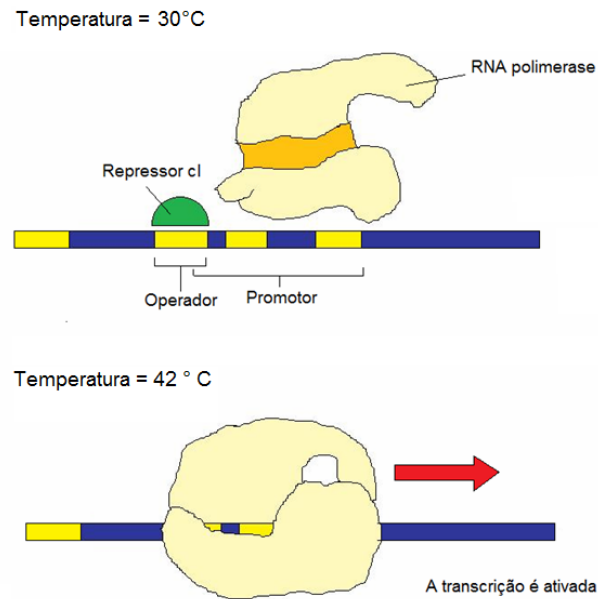


Figura 2.7 - Sistema de expressão gênico bacteriano baseado no promotor λP_L . A temperaturas em torno de 30°C é reprimida a transcrição do gene “downstream” do promotor pelo repressor cI. Quando a temperatura é aumentada a 42°C o repressor é inativado e a transcrição do gene é iniciada.

Estas características permitem um controle rígido da expressão de genes heterólogos por meio de um processo simples e econômico que é a indução baseada no aumento de temperatura. Além disso, a adição de indutores onerosos, quimicamente tóxicos ou outros inconvenientes associados com o promotor controlado metabolicamente, são descartados (Palomares et al., 2004).

Vários processos característicos acontecem quando uma cultura bacteriana está sujeita ao choque térmico ou outro tipo de stress químico ou físico. Como pode ser observado na figura 2.8, o grau dos processos ilustrados depende da magnitude, duração e da faixa onde a indução do stress acontece. Porém, as propriedades físico-químicas do ambiente de crescimento onde acontece o stress, o estado fisiológico e a condição da bactéria que está sujeita ao stress são de suma importância (Heitzer *et al.*, 1992).

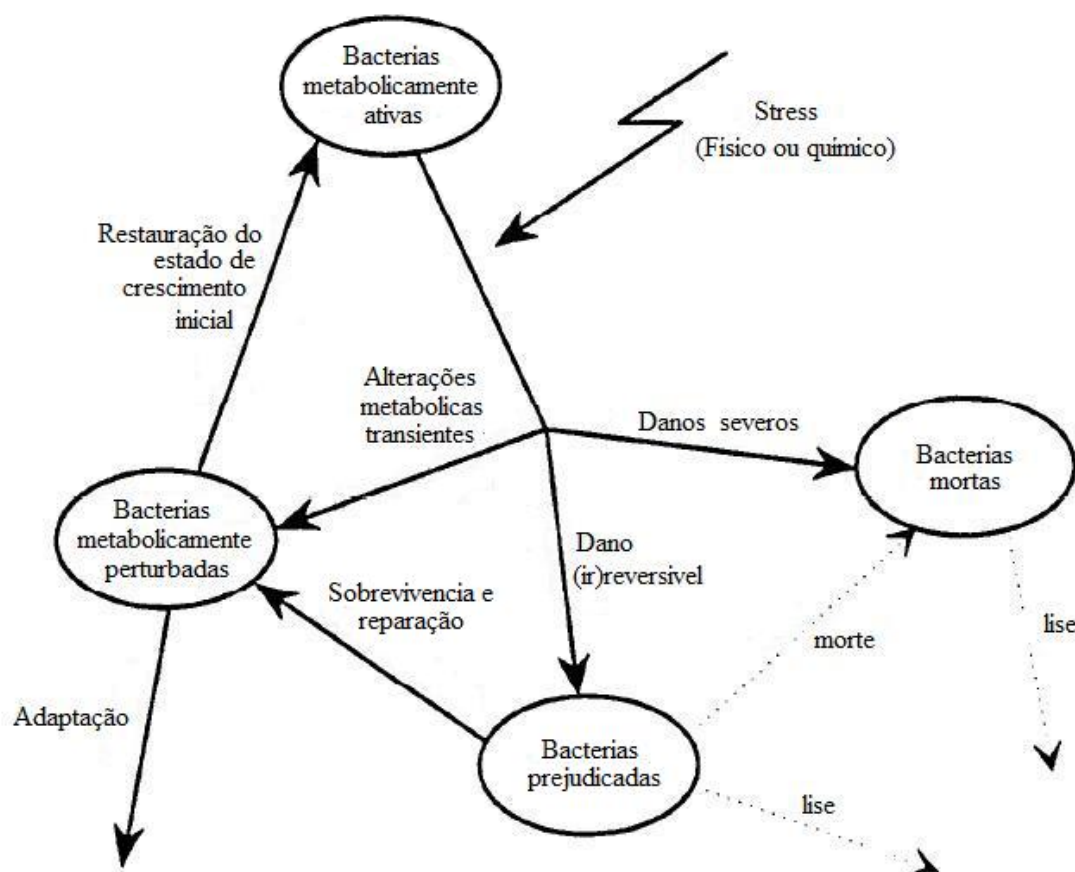


Figura 2.8 - Ciclo do stress: Processos característicos numa cultura bacteriana sujeita ao stress da indução. (Fonte: Heitzer *et al*, 1992).

A resposta ao choque térmico pode ser prejudicial para a síntese e estabilidade de proteínas recombinantes pela fração de energia e precursores que devem ser gastados para suportar a mudança abrupta e transiente na síntese de chaperonas moleculares, proteases e outras proteínas de choque térmico, após do incremento de temperatura (Hoffman e Rinas, 2001). A síntese de proteínas de choque térmico é controlada no início do nível transcripcional pela subunidade σ^{32} da RNA polimerase. Após o aumento da temperatura de 30 para 42° C a taxa da síntese das proteínas totais da *E coli* podem ser incrementadas 1,5 vezes. Porém, a taxa da síntese das proteínas de choque térmico mais representativas como a GroEL é incrementada entre 3,2 e 9,6 vezes, correspondentes ao 21% de todas as proteínas sintetizadas (Strauss *et al*, 1987; Yamamori *et al*, 1978).

As taxas de aquecimento lentas, que simulam as condições de indução de um fermentador de grande escala aumentam a produção de proteína recombinante. A diminuição

da taxa de aquecimento aumenta os níveis de produção de pré-proinsulina e diminui a produção de ácidos orgânicos, indicando que em taxas rápidas de aquecimento, grandes desequilíbrios entre a glicolysis e o ciclo TCA acontecem e que os requerimentos de energia adicional são usados para vencer os altos níveis de stress (Caspeta et al, 2009).

2.3 Produção heterológa de BTL-2

Lípase BTL-2 foi clonada (Rual *et al*, 1997) a partir de uma biblioteca de expressão de DNA genômico e expressada em *E. coli* sob o controle do promotor λP_L e do vetor pUC18. A lipase recombinante obtida apresentou homologia significativa de 30-35% com as lípases de *Staphylococcus hyicus*, *S. aureus* e *S. epidermis*, as quais possuem um peso molecular ao redor de 45 kDa.

E coli recombinante foi cultivada por Rua et al, 1997, num biorreator de 100 L, com 80 L de meio LB e 1 g/L de glicose a $T_{Cresc} = 30^\circ C$ por 5 horas até atingir o final da fase exponencial com uma $DO_{578\text{ nm}} = 1,65$. Quando a temperatura do cultivo foi aumentada a $42^\circ C$ (choque térmico), a produção da lipase começou e aumentou continuamente atingindo a atividade enzimática máxima após 4 horas. Observou-se um pequeno incremento da produção celular após 2 horas da indução. A massa celular úmida obtida no final do cultivo foi de 11 g/L. O rompimento celular foi realizado por um homogenizador de alta pressão submetendo-se as amostras a 3 ciclos com pressão de 500 bar, mantendo a temperatura do processo a $35^\circ C$ e retirando-se amostras em banho de água-gelo. Foram removidos os “debris” celulares por centrifugação a $14000 \times g$ por 15 min a $4^\circ C$. Foi dosada a atividade lipolitica deste clarificado, obtendo 53.000 U/g cel. Úmida.

Em 2003, Quyen *et al*. clonaram o gene da lipase BTL2 no vetor pPICZ α A e integraram esse sistema no DNA genômico da *Pichia pastoris*, obtendo-se um produto extracelular com 309.000 U/L no sobrenadante. A lipase obtida a partir dessa levedura apresentou resultados similares aos obtidos para a lipase clonada em *E.coli* por Schmidt-Dannert, 1996, para pH e temperatura ótimas, termoestabilidade e perfis de especificidade com os substratos.

2.4 Produção de proteínas heterólogas em biorreator: cultivo de *Escherichia coli* em alta densidade

A produtividade de proteínas heterólogas em um biorreator é afetada pela velocidade em que as células sem plasmídeo são geradas e propagadas. Esse fenômeno foi observado por muitos pesquisadores e é responsável por dificuldades no escalonamento requerido para a comercialização de produtos recombinantes (Kumar et al., 1991 apud Lima, 1994). Uma vez que o sistema de expressão esteja construído, a produção de proteínas recombinantes pode ser melhorada pelo aumento da quantidade de proteína por célula por unidade de tempo (produtividade específica) ou pelo aumento da concentração celular por unidade de tempo (produtividade celular) sendo que a primeira é muito difícil de variar, pois depende das características genéticas da cepa hospedeira e dos plasmídeos nela inseridos.

A obtenção de elevada concentração celular do microrganismo recombinante (cultivo de alta densidade) torna-se assim o melhor caminho para a obtenção de altas quantidades da proteína heteróloga. Isso exige fornecimento adequado de todos os nutrientes requeridos pela célula, ou seja, de todos os elementos constituintes da célula (composição elemental) que se deseja crescer e também daqueles necessários para operar as rotas metabólicas que geram energia para a reprodução e manutenção celular.

O cálculo dos fatores de conversão ($Y_{X/S}$) dos diferentes elementos fornece o rendimento da biomassa produzida pela quantidade do elemento consumido, o que possibilita uma melhor estimativa da composição do meio de cultivo, tanto nas concentrações utilizadas como na escolha de um determinado substrato utilizado para suprir um determinado elemento. Bauer *et al.*, 1976, apud Castillo, 1997, determinaram a composição elemental e os fatores de conversão glicose/célula, para três linhagens de *E. coli*. A composição elemental se mostrou praticamente igual para os três microrganismos, com valores obtidos, dados em % (massa/massa), que variaram entre 43,06- 45,30, para C, entre 6,7-7,03, para N, entre 2,01-2,40, para P e entre 29,6-31,6, para O . Os fatores de conversão foram obtidos em cultivos a 30°C e a 25°C, sem limitação de glicose. A 30°C e 25°C, $Y_{X/G}$ (fator de conversão célula/glicose) variou entre 0,31-0,49 e entre 0,32-0,46, respectivamente. Não se observou variação significativa nos valores obtidos nas duas temperaturas, para cada linhagem.

A composição elemental de *E.coli* mostra que carbono, nitrogênio e oxigênio são os que estão presentes em maior porcentagem. Dentre esses elementos, um dos que requer mais atenção é o oxigênio, pois é requerido em grandes quantidades e tem baixa solubilidade

no meio. Nos cultivos em frascos agitados, seja de microrganismos selvagens, seja de recombinantes, dificilmente se atingem as máximas conversões possíveis das fontes de carbono e nitrogênio que são fornecidos em massa celular, devido, principalmente, à limitação no fornecimento de oxigênio. No cultivo em frascos, menor a relação entre volume do meio e volume do frasco, maior a área de interface líquida – gás para um determinado volume a ser aerado, o que permite a obtenção de concentrações celulares maiores. Contudo, uma vez que o volume é menor, muitas vezes isso leva a produtividade volumétrica menor. Assim, a obtenção de alta densidade celular em grandes volumes de produção, só é possível em biorreator que permita evitar limitação do crescimento por falta de oxigênio, ao se manter constante a concentração de oxigênio dissolvido no meio, mesmo com o aumento da concentração celular. Isso é feito através do aumento da velocidade de agitação, da vazão de aeração e da composição da fase gasosa (ar enriquecido com oxigênio, até 100% de oxigênio).

Segundo Fass & Shiolac, 2005, os resultados publicados por Herbert et al., 1965, e, mais tarde, confirmados por Bauer and Shiloach, 1974; Shiloach and Bauer, 1975; e Bauer and Ziv, 1976), indicam que o fator de conversão célula/oxigênio para *E.coli* crescendo em glicose como fonte de carbono é próximo de 1 (1 g de oxigênio é necessário para produzir 1.06 g de massa de *E. coli*). Assim, segundo Fass&Shiolac, 2005, desde que num cultivo a 25 °C é possível fornecer até 1.5 M O₂ L/h (quando aerado com oxigênio puro), a densidade desse cultivo poderia atingir, teoricamente, 350 g/L (massa seca), com uma velocidade de crescimento de 0.2 h⁻¹, garantido que todos os outros requerimentos nutricionais foram atendidos. Esse valor está acima do limite baseado na fluidez do meio, 250 g massa seca/L. Portanto, se oxigênio puro é disponível para aeração, transferência de oxigênio da fase gasosa para a célula, não seria um fator limitante.

Existem também outros componentes orgânicos requeridos em pequenas quantidades por alguns microrganismos, consideradas substâncias essenciais, pois o microrganismo é incapaz de sintetizar através dos nutrientes disponíveis. Esses componentes são chamados de fatores de crescimento e a necessidade para tais nutrientes é resultante de uma via metabólica estar bloqueada ou ausente na célula. Os fatores de crescimento são divididos em purinas e pirimidinas, aminoácidos e vitaminas, sendo que eles são assimilados para cumprir um papel específico no metabolismo da célula. Os aminoácidos são requeridos para a síntese de proteínas e as purinas e pirimidinas para a síntese de ácidos nucleicos (DNA e RNA). Muitas bactérias não requerem nenhum fator de crescimento, elas conseguem sintetizar todos os nutrientes necessários.

Para a obtenção de proteínas recombinantes e outros produtos em culturas de alta densidade de *E. coli*, é preciso evitar também dois problemas: 1) inibição por substratos como glicose (50 g/L), amônia (3 g/L), ferro (1,15 g/L) e 2) inibição por subprodutos metabólicos como: acetato, formiato, propionato, lactato, etanol, etc (Lee, 1996, Zhang e Greasham, 1999; Suárez e Kilikian, 2000). Para evitar a inibição por substrato, os cultivos são realizados em meios definidos ou semi-definidos, com concentrações dos substratos inferiores às inibitórias. Assim, o modo de operação do biorreator em batelada alimentada é estratégia frequentemente empregada.

Com relação à produção de metabólitos, o acetato é reconhecidamente o principal inibidor tanto do crescimento celular quanto da síntese protéica. Acetato é produzido por *E. coli* por dois mecanismos distintos. O metabolismo conhecido como “over flow” acontece quando uma quantidade importante de glicose é catabolisada até piruvato, que é oxidado a acetil-CoA por piruvato desidrogenase, enzima ativa somente em condições de aerobiose. O excesso de acetil-CoA formado que não consegue ser metabolizado pelo ciclo de Krebs e/ou cadeia transportadora de elétrons, é transformado em acetato, que é secretado, então, para o meio de cultura.. Em condições anaeróbias, entretanto, piruvato desidrogenase não é ativa. Nessa condição, piruvato-formiato liase catalisa a transformação de piruvato a ácido fórmico e acetil-Coa, e lactato desidrogenase transforma piruvato a lactato, que é em parte metabolizado a outros produtos da fermentação ácida mista (formiato, succinato, etanol, CO₂ e H₂).

Desta maneira, para evitar o acúmulo desses produtos de metabolismo, os procedimentos para cultivo de *E. coli*, especialmente em alta densidade celular, se baseiam basicamente em dois pontos: a) manutenção de oxigênio dissolvido do meio de cultura em altos níveis, e b) velocidade específica de crescimento abaixo de um valor crítico (μ_{crit}) para evitar o metabolismo de “over flow”. Este valor, evidentemente menor que $\mu_{máx}$, varia entre as diversas linhagens de *E. coli* e depende do meio de cultura utilizado (Lee, 1996). Para alcançar essas condições, em geral lança-se mão de cultivos descontínuos alimentados com limitação da fonte de carbono e altas velocidades de transferência de oxigênio.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismo empregado no estudo.

Na realização dos experimentos foi utilizada *Escherichia coli* BL21, doada pelo Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. O plasmídeo pCYTEXP1 com o gene da BTL2 de *Bacillus thermocatenulatus* (Rua *et al*, 1997) também foi obtido por doação, desta vez junto ao laboratório de Biocatálisis do ICP-CSIC-Madri, Espanha. Por fim, o processo de *transformação* de *Escherichia coli* foi realizado no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar. A cepa obtida foi conservada com 10% (v/v) de glicerol 80%, mantido em ultrafreezer a -70 °C.

3.2 Meios de cultivo

3.2.1 Experimentos em shaker

Foram realizados experimentos de crescimento celular de *E. coli* recombinante em meio LB (Luria-Bertoni) sendo a composição do mesmo apresentada na tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Composição do meio LB

Componente	Concentração (g/L)
Triptona	10
Extracto de levedura	5
Cloreto de sódio (NaCl)	10
Ampicilina	100 µg/mL
pH = 7	

3.2.2 Meio LB-Agar

Este meio foi utilizado para repicar as células de *E. coli* recombinante contidas no estoque de glicerol e na determinação da concentração de células viáveis (em unidades formadoras de colônias -UFC- por mL de meio de cultivo). Sua composição é dada na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Composição do meio LB-Ágar

Componente	Concentração (g/L)
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	10
Ágar	20
Ampicilina	100 µg/mL
pH 7,0	

3.2.3 Meios para o biorreator

3.2.3.1 Meio de crescimento celular

Para atingir uma alta concentração celular de *E. coli* recombinante foi utilizado o meio LB modificado por Van de Walle e Shiloach, 1998. A composição deste meio é apresentada na tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Composição de meio LB modificado

Componente	Concentração
Glicose	10 g/L
Triptona	10 g/L
Extrato de levedura	5 g/L
Cloreto de sódio (NaCl)	10 g/L
Sulfato de magnésio (MgSO ₄)	10 mM
Fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	40 mM
Ampicilina	100 µg/mL
pH = 7,0	

3.2.3.2 Meio de alimentação

Para o ensaio em batelada alimentada foi necessário fazer um meio de alimentação com altas concentrações de glicose que permitiu a manutenção de baixos níveis

de substrato por longo período de tempo. A composição da fonte de alimentação, é mostrada na tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Composição do meio de alimentação

Componente	Concentração (g/L)
Glicose	240
Triptona	10
Extrato de levedura	5
Cloreto de sódio (NaCl)	10
Sulfato de magnésio	20
Fosfato de potássio (K ₂ HPO ₄)	6,97
Ampicilina	100 µg/mL
pH = 7,0	

3.3 Equipamentos

- **Autoclaves:** Empregada na esterilização dos meios de cultura e todo material em contato com os microrganismos. Foram utilizadas autoclaves da marca FABBE modelo 103, 4000 W e 2000 W.
- **Câmara Asséptica:** Nas etapas de manipulação dos microrganismos e do material em contato direto com os mesmos, utilizou-se a câmara asséptica de fluxo laminar da marca VECO, contendo bico de Bunsen e lâmpada germicida UV.
- **Câmara rotativa de temperatura controlada:** “shaker”: As etapas de crescimento dos microrganismos e produção da enzima foram realizadas em frascos agitados (erlenmeyers) em mesa rotativa com controle de temperatura e velocidade de agitação, da marca NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC.
- **Biorreator tipo tanque agitado:** Ensaios em batelada convencional e alimentada foram realizados em biorreator APPLIKON encamisado com capacidade para 2,0 L acoplado a um sistema de aquisição de dados, apresentado na Figura 3.1.

-
- **Centrífuga Refrigerada:** A separação do microrganismo dos caldos fermentados foi realizada em centrífuga refrigerada EPPENDORF, modelo 5403, com capacidade para seis tubos.
 - **Estufa:** Para secagem de material limpo e incubação de caldos fermentados a 80°C utilizou-se estufa bacteriológica QUALXTRON.
 - **pHstato:** pHstato Titrino 718, METROHM foi empregado nos ensaios de hidrólise de soro de queijo.
 - **Banho termostático:** As análises de atividade enzimática foram realizadas em reator de vidro encamisado com capacidade para 50 mL acoplado a um banho termostático BROOKFIELD modelo EX – 200.
 - **Espectrofotômetro:** Métodos colorimétricos utilizaram Espectrofotômetro PHARMACIA BIOTECH modelo Ultrospec 2000.
 - **Incubadora:** Para a incubação de microrganismos em meio sólidos e em placas de 96 poços utilizou-se incubadora MA 415/S MARCONI.
 - **Balança analítica:** Marca METTLER modelo PB 3002, pHmetro ORION modelo 420 A, demais equipamentos e vidrarias comuns a laboratório foram utilizados na preparação dos meios de cultivo.
 - **Sonicador:** Marca VIBRA-CELL modelo VCX para o rompimento celular por meio de ultrassom.
 - **French Press:** Marca SIM-AMINCO, modelo FA-073 para o rompimento celular por meio de altas pressões.



Figura 3.1 - (A) Reator Aplikon com capacidade para 2 L. (B) Sistema de aquisição de dados.

3.4 Métodos analíticos, de purificação e de medida de atividade enzimática

3.4.1 Determinação da concentração celular

3.4.1.1 Turbidimetria

A densidade ótica (DO) foi determinada através de leitura em espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 578 nm. As amostras foram diluídas de modo que a leitura da absorbância não ultrapassasse o valor de 0,8, para garantir com segurança que a medida fosse realizada dentro da faixa de linearidade da relação entre densidade ótica e concentração.

3.4.1.2 Método Gravimétrico

A concentração celular foi ainda determinada pelo método gravimétrico nos ensaios realizados em biorreator. Neste procedimento, inicialmente filtrou-se um volume conhecido de amostra em uma membrana com diâmetro de poro de 0,22 μm previamente pesada. A amostra foi então lavada com água destilada, submetida à secagem por 24 horas em estufa a 80°C e pesada.

3.4.1.3 Plaqueamento e Determinação de Células Viáveis

A determinação do número de microrganismos viáveis (UFC/mL – unidades formadoras de colônia por mililitro) foi realizada de acordo com o seguinte procedimento:

- Diluições sucessivas da amostra até a concentração desejada na proporção de 1:10 (1,0 mL de suspensão de bactéria para 9,0 mL de solução salina, até a concentração no tubo de ensaio estar em torno de 1×10^3 UFC/mL);
- Adição de 100 μ L da suspensão de bactéria adequadamente diluída na placa de Petri (em triplicata), em pelo menos duas concentrações diferentes, de forma a se obter em torno de 30 a 300 UFC na placa.
- Incubação das placas a 37°C por 24 h.
- Contagem das colônias formadas e cálculo da concentração de células viáveis.

3.4.2 Determinação da concentração de ácidos orgânicos (lático, acético e fórmico) e aminoácidos.

As concentrações dos ácidos orgânicos foram determinadas por HPLC utilizando a coluna Aminex HPX-87H da Bio-Rad como fase estacionária e solução de ácido sulfúrico 5 mM a uma vazão de 0,6 mL/min como fase móvel. A temperatura utilizada para a separação dos componentes foi de 50°C, e a detecção dos ácidos foi realizada com detector de UV a um comprimento de onda de 210 nm. A concentração de aminoácidos foi determinada também em HPLC, pelo sistema Pico-tag utilizando coluna de fase reversa (Waters), detecção por UV 254 nm, de acordo com Cohen *et al.*, 1989.

3.4.3 Determinação da concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada através do método de DNS, descrito na literatura (Miller, 1959). Nesta análise é necessária a preparação de uma curva de calibração com soluções de Açúcares Redutores de 0,6 a 1,5 g/L.

O reagente foi preparado, mantendo-se num banho à $\pm 45^\circ$ C, ou usando bico de Bunsen com muito cuidado, para que não atinja a temperatura de ebulição. Em um becker

de ± 400 mL, dissolveu-se por completo 30 gramas de sal de Rochelle P.A. (tartarato duplo de sódio e pótassio) em 50 mL de água destilada. Adicionou-se em seguida 1 grama de 3-5 ácido dinitrosalicílico (DNS) à solução anterior, e com uma bagueta de vidro tentou-se dissolver ao máximo as partículas sólidas. E finalmente adicionou-se 20 mL de NaOH 2 N (8,3 g em 100 mL de H₂O destilada), misturando sempre até completa dissolução dos sólidos presentes.

Transferiu-se quantitativamente a solução obtida para balão volumétrico de 100 mL. Colocou-se este balão em banho de água á temperatura ambiente por ± 2 horas para resfriamento. Por fim ajustou-se o volume do balão para 100 mL com água destilada.

A 1 mL de solução de AR, adequadamente diluída adicionou-se 2 mL da solução de DNS. O tubo Follin-wu de 25 mL com esta mistura foi aquecido por 5 minutos em água em ebulição e a seguir resfriado em água gelada, mantendo os tubos tampados com rolhas fendidas. Completou-se o volume do tubo até 25 mL com água destilada, homogeneizou-se bem, e determinou-se a absorbância no espectrofotômetro num comprimento de onde de 540 nm. Calibrou-se o espectrofotômetro com teste em branco, antes de fazer as leituras das outras amostras, que foram convenientemente diluídas para que estivesse na faixa de concentração abrangida pela curva de calibração.

3.4.4 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford

O procedimento utilizado corresponde ao método descrito Bradford, 1976. O reativo foi preparado dissolvendo-se 100 miligramas de Coomassie Brilliant Blue G 250 em 50 mL de etanol e 95% v/v sob vigorosa agitação. A esta solução adicionavam-se 100 mL de ácido fosfórico a 85% p/v, diluindo-se em balão volumétrico até 1,0 L com água destilada. Esta solução era filtrada sob vácuo em sistema Millipore com papel de filtro Wathman 113, e armazenada em frascos na geladeira, permanecendo estável por duas a três semanas.

Em tubos de ensaios, adicionavam-se 5 mL do reativo e 100 μ L da amostra. A amostra era convenientemente diluída quando necessário, de forma que a concentração de proteína total não ultrapasse a 660 mg/L. Agitava-se em vórtice, deixando-se em repouso por 5 minutos. Fazia-se a leitura da absorbância das amostras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm.

3.4.5 Determinação da atividade enzimática pelo método colorimétrico

A atividade lipolítica da enzima livre foi determinada usando o método p-Nitrofenilpalmitato (p-NPP) como substrato (Winkler e Stuckmann, 1979). A emulsão contendo o substrato foi preparada pela adição lenta (gota a gota) sob agitação de 1 mL de solução de p-NPP em isopropanol (3 mg/mL solução A) em 9 mL de uma solução contendo 0,2 g de Triton X-100 e 0,5 g de goma arábica dissolvidos em 450 mL de solução tampão fosfato pH 8,0 (Solução B). 2,7 mL desta emulsão foram incubados em uma cubeta no espectrofotômetro com circulação de água na temperatura de 60° C (Rua *et al*, 1997). Após o equilíbrio da temperatura, 0,3 mL de solução enzimática foram adicionados ao sistema e as absorvâncias medidas a 410 nm, em intervalos de 30 segundos, ao longo de 5 min de reação.

O coeficiente de absorção molar do p-NPP ($1,32 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) foi usado para calcular a atividade enzimática. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a produção de 1 μmol de p-nitrofenol por minuto nas condições experimentais estabelecidas. Os cálculos da atividade enzimática específica foram realizados pela equação 3.1 e 3.2.

$$AE_{esp} = \frac{(Abs / seg) \cdot V_{subs+solenz} \times 60seg}{\frac{1,32 \times 10^4}{6} \times m_{x1} \times c} \quad (3.1)$$

Onde:

Coef. de absorção do p-NPP = $1,32 \times 10^4 / \text{M} \cdot \text{cm}$

C=espessura da cubeta (1cm)

$V_{subs+solenz}$ = Volume da cubeta/1000 (L)

m_{x1} = massa de célula úmida lisada correspondente a 0,3 mL de solução

Onde

$$m_{x1} = \frac{g_{celumi} \times V_{amostra}}{V_{Re.suspendido}} \quad (3.2)$$

$V_{\text{amostra}} = \text{Vol. de caldo.}$

$V_{\text{resuspendido}} = \text{Vol. de tampão onde se ressuspende o centrifugado.}$

Considerando-se 70% de umidade na célula segundo Watson, 1972, obtém-se a equação 3.3:

$$g_{\text{celumi}} = \frac{xg_{\text{cel sec a}} \times 1g_{\text{celumi}}}{0,3g_{\text{cel sec a}}} \quad (3.3)$$

3.4.5.1 Efeito da temperatura na atividade

Para determinar o efeito da temperatura sobre a atividade lipolítica do extrato bruto e da enzima purificada, a atividade enzimática foi determinada em temperaturas entre 37 e 80 °C, em tampão fosfato 0,1 mol/L pH 8,0. A reação foi acompanhada a cada 30 segundos por 5 minutos e as atividades foram calculadas com base na concentração de p-Nitrofenol em 1 min.

3.4.5.2 Determinação da energia de ativação

A energia de ativação foi estimada pela equação de Arrhenius (Equação 3.4).

$$k = k_0 \cdot e^{\frac{E_a}{RT}} \quad (3.4)$$

Multiplicando-se ambos os lados da equação pela concentração inicial e enzima E_0 , obtém-se:

$$E_0 \cdot k = E_0 \cdot k_0 \cdot e^{\frac{E_a}{RT}} \quad (3.5)$$

Aplicando-se logaritmo neperiano:

$$\ln E_0.k = \ln E_0.k_0 - \frac{E_a}{R.T} \quad (3.6)$$

Sabendo-se que:

$$V_{m\acute{a}x} = E_0.k \quad (3.7)$$

Tem-se:

$$\ln(V_{m\acute{a}x}) = \ln(V_0) - \left(\frac{E_a}{R}\right)\left(\frac{1}{T}\right) \quad (3.8)$$

Foi estimado o valor de $V_{m\acute{a}x}$ como:

$$V = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_m + S} \quad (3.9)$$

E o valor obtido para K_m mostra que ele é cerca de 10 vezes menor que a concentração de lipase utilizada como padrão para medida de atividade da enzima, tem-se que:

$$V = V_{m\acute{a}x} \quad (3.10)$$

Assim, utilizaram-se os valores de velocidade da reação no trecho ascendente linear, obtidos nas temperaturas de 40-65°C e construiu-se o gráfico $\ln(V)$ vs $(1/T)$, sendo feito em seguida o ajuste linear para o cálculo da energia de ativação da lipase, através do coeficiente angular α :

$$\alpha = -\frac{E_a}{R} \quad (3.11)$$

3.4.6 Eletroforese em gel de poliacrilamida – SDS-PAGE

Após o tratamento descrito no item 3.3.5, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) em um sistema Hoefer mini VE da Amershan Pharmacia Biotech.

Para isso, as amostras foram aplicadas em um gel de empilhamento de 4% de poliacrilamida e um gel de resolução de 12%, sendo então submetidas à eletroforese com corrente elétrica de 15 mA para o gel de empilhamento e de 20 mA para o gel de resolução. Em seguida, os géis foram então incubados em uma solução corante de Coomassie Brilliant Blue 0,1% (PhastGel Blue R - Amershan Pharmacia Biotech) e logo após em uma solução descorante de metanol 10% (v/v) e ácido acético 10% (v/v).

O tampão de amostra utilizado era composto por uma solução tampão de Tris-HCl (0,125 M, pH 6,8), solução de SDS (4%), azul de bromofenol (0,025%), glicerol (20%) e o agente redutor β – mercaptoetanol (concentração final de 0,1 M).

A massa molecular da proteína de interesse foi estimada utilizando-se padrões de massa molecular conhecidos, na faixa de 14 a 94 kDa (*BenchMark Protein Ladder* – Invitrogen®) e o software de digitalização de imagens Doc It LS – UVP, também utilizado para a fotodocumentação das análises realizadas.

3.5 Determinação de parâmetros cinéticos e outros cálculos

3.5.1 Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular

A velocidade específica de crescimento celular é definida por meio de um balanço de massa em reator em batelada representado pela Equação 3.12, conforme descrito em Bailey e Ollis (1986).

$$\frac{dCx}{dt} = \mu \cdot Cx \quad (3.12)$$

onde:

μ é a velocidade específica de crescimento celular

Cx é a concentração celular

Considerando a fase exponencial de crescimento celular, quando $\mu = \mu_{\max}$, determina-se o valor da velocidade específica máxima de crescimento integrando-se e rearranjando-se a Equação 3.12 para obter a Equação 3.13.

$$\ln\left(\frac{Cx}{Cx_0}\right) = \mu_{\max} \cdot t \quad (3.13)$$

onde:

Cx_0 é a concentração celular de microrganismo no tempo “zero”,

t é o tempo de cultivo.

A Equação 3.13 é linear, e o valor de μ_{\max} pode ser obtido através do método dos mínimos quadrados.

3.5.2 Determinação do coeficiente de rendimento de substrato a células

Para o cálculo do rendimento de substrato a células ($Y_{x/s}$) foi utilizada a Equação 3.14 (Bailey e Ollis, 1986).

$$Cx - Cx_0 = Y_{x/s} \cdot (Cs_0 - Cs) \quad (3.14)$$

onde:

Cs é a concentração de substrato

Cs_0 é a concentração inicial de substrato

Com os valores de concentração celular e de glicose obtêm-se os valores de $Y_{x/s}$ através da regressão linear.

3.6 Metodologia experimental

3.6.1 Planejamento experimental

A temperatura de cultivo e de choque foram os fatores considerados no estudo. Como variáveis resposta foram obtidas a “atividade enzimática/g célula úmida” e a “atividade enzimática/mg proteína”. Um delineamento composto central rotacional em dois níveis para cada fator foi utilizado. Resultando em onze ensaios, sendo quatro fatoriais, quatro axiais e uma triplicata no ponto central (Rodrigues e Iemma, 2005). Os níveis utilizados neste planejamento experimental são mostrados na tabela 3.5. Para análise dos resultados foi usado o programa computacional STATISTICA®.

O ponto central do planejamento foi baseado nas condições de processo descritas na literatura, onde o mesmo plasmídeo foi utilizado para expressão de BTL2 por *E.coli* BL21, utilizado na literatura (Rua *et al*, 1997).

Tabela 3.5 – Fatores e níveis de valores que foram utilizados no planejamento fatorial.

Variáveis	Níveis				
	- α	-1	0	1	A
Temp. cultivo (°C)	25,7	27	30	33	34,2
Temp. Indução (°C)	37,8	39	42	45	46,2

3.6.2 Cultivo do microorganismo em shaker

A linhagem de *E. coli* BL321 transformada com o plasmídeo pCYTEXP1 foi cultivada em meio LB como pode ser observado na figura 3.2. Para a seleção de clones contendo os plasmídeos foi adicionado ao meio ampicilina (100 μ g/ml), a 37 °C, por 16 horas e sob agitação de 200 rpm. Após o cultivo, uma alíquota de 900 μ L foi retirada e acrescentou-se 100 μ L de glicerol 80% na mesma. Imediatamente, as amostras foram armazenadas em

ultrafreezer a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, para posterior utilização nos cultivos de produção da lipase recombinante.

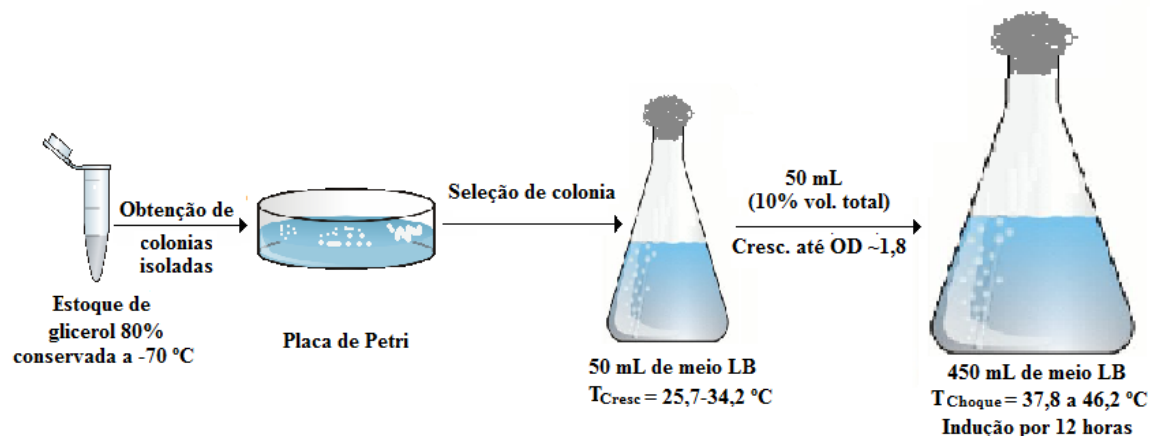


Figura 3.2 - Esquema do procedimento utilizado para os experimentos realizados em shaker

Uma amostra do estoque de glicerol foi transferida para uma placa, tomando-se o cuidado de flambar (esterilizar) a alça. Este processo foi realizado na câmara de fluxo laminar no meio de cultura sólido com antibiótico até a obtenção de colônias isoladas. As placas foram identificadas e incubadas em estufa a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Após de 16 horas observou-se a formação de colônias isoladas. Selecionou-se então uma destas e repicando-as em erlenmeyers contendo 50 mL de meio LB líquido com ampicilina.

Os erlenmeyers foram encubados por 12 horas sob rotação de 150 rpm a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ em shaker e quando o cultivo alcançou uma DO_{578} de 1,3 (amostra de 250 μL , diluída para atingir faixa entre 0,1-0,8), os 50 mL de cultura foram transferidos para 450 mL de meio LB líquido com ampicilina cultivado a diferentes temperaturas (entre 25,7 e 34,2 $^{\circ}\text{C}$) sob rotação de 150 rpm.

Para a indução da enzima aumentou-se a temperatura (entre 37,8 e 46,2 $^{\circ}\text{C}$) provocando um choque térmico que ativa a expressão do gene BTL2 sob controle do promotor λP_L . No planejamento experimental a DO_{578} , do momento do choque, foi fixada entre 0,4-0,5. Neste ponto observou-se o começo da fase exponencial de crescimento bacteriano em shaker. Após definir as melhores condições de temperatura, também foram realizados experimentos em outras fases de crescimento celular, como a fase exponencial e a estacionária.

Após o choque térmico, os cultivos foram monitorizados por 12 horas, amostrando-se a cada 4 horas, para a determinação de métodos analíticos e obtenção da lipase BTL2.

3.6.3 Cultivo do microorganismo em biorreator

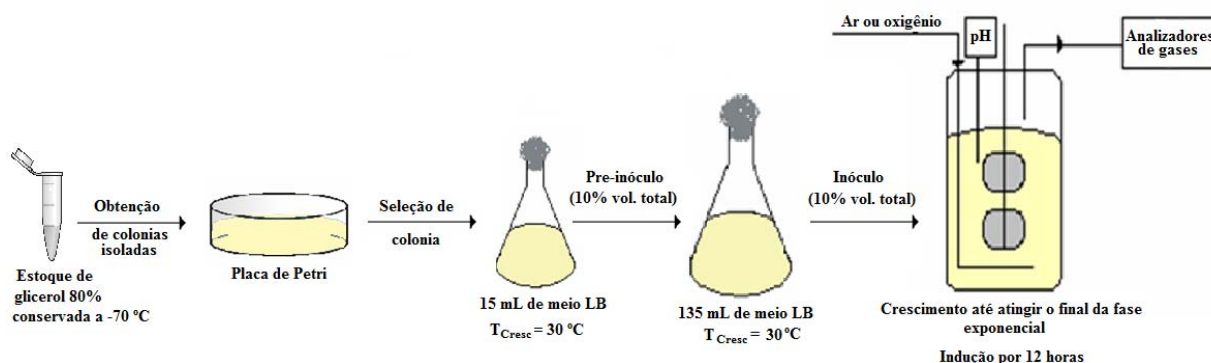


Figura 3.3 - Esquema do procedimento utilizado para cultivo em biorreator.

Para o cultivo em biorreator partiu-se de um Eppendorf, como pode ser visto na figura 3.3 com o microorganismo num estoque de glicerol 80%. Após isto, foi feito um repique em placa de Petri para obtenção de colônias isoladas, sendo uma destas colônias transferida para um Erlenmeyer com 15 mL de meio LB e ampicilina, sob agitação de 150 rpm e 30 °C. Este pré-inóculo foi deixado durante aproximadamente 8 horas até atingir uma $DO_{578} = 1,5$, sendo transferido depois ao inóculo com 135 mL de meio LB e ampicilina, também sob agitação de 150 rpm e 30 °C. Após atingir uma DO_{578} de 1,3 o inóculo foi transferido para o biorreator com 1,35 L de meio LB modificado e ampicilina. Neste ensaio o choque térmico sobre o inóculo foi feito após o mesmo atingir altos níveis de densidade celular, no final da fase exponencial.

O cultivo foi realizado em batelada alimentada onde a concentração do oxigênio no meio reacional foi mantida em torno de 30% a partir de um sistema de agitação que variava entre 150 e 600 rpm. Das amostras coletadas, cinco foram submetidas a diluições sucessivas e plaqueadas em LB-Ágar para posterior contagem das unidades formadoras de colônia por mililitro (UFC/mL). No final do cultivo a biomassa obtida foi separada do caldo por meio de centrifugação, para posterior ruptura celular por meio de “French Press”, foi determinada a atividade enzimática e a concentração de proteínas.

3.6.4 Obtenção da lipase BTL2

3.6.4.1 Por meio de sonicação

Como a enzima foi produzida intracelularmente, a amostra era centrifugada a 14.000 x g (gravidade), por 20 minutos a 4° C, para separação do microrganismo que foi submetido posteriormente ao rompimento celular. Nesse processo, a massa do microrganismo foi dissolvido em tampão fosfato 100 mM pH 8, sob refrigeração em um banho água-gelo. A amostra foi também sonicada com 3 pulsos de 1 minuto (8-10 watts) e amplitude de 20 mHz com intervalo de 20 segundos entre cada pulso. Após nova centrifugação a 14.000 x g por 20 minutos, a 4°C, o sobrenadante era utilizado para posterior análise de atividade enzimática e concentração de proteína.

3.6.4.2 Por meio de “French press”

A massa do microrganismo foi ressuspensa em 100 mL de tampão fosfato 100 mM pH 8. Após isto procedeu-se o rompimento celular em alta pressão por meio da “French press”, com as amostras sendo mantidas num banho de água-gelo para evitar a desnaturação das proteínas. A “French press” foi operada a partir dos seguintes passos: inicialmente aumentou-se a pressão do sistema retirando-se praticamente todo o ar do interior do equipamento. Na seqüência, houve uma diminuição da pressão para introdução da biomassa. Após a introdução da biomassa a pressão foi aumentada novamente, desta vez para um valor determinado de 18.000 psig, sendo este o recomendado para bactérias. Este procedimento foi repetido de 3 a 5 vezes para assegurar o rompimento celular.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Influência das temperaturas de crescimento e de choque térmico na expressão de lipase BTL-2 por *E.coli* recombinante

Nos trabalhos reportados na literatura para expressão de BTL-2, com o mesmo sistema de expressão que está sendo utilizado neste trabalho, o crescimento é realizado a 30°C e o choque a 42°C (Rua et al, 1997), obtendo-se níveis de atividade enzimática de 53.000 U/g cél. Úmida. Contudo, não há relatos de expressão em outras temperaturas. Uma vez que o promotor para a expressão de lipase é regulado pela temperatura, tanto a temperatura de crescimento do microrganismo quanto a de choque devem ser variáveis importantes na expressão da enzima. Realizou-se, por isso, neste trabalho, o estudo da influência dessas variáveis na expressão de BTL-2, utilizando-se um planejamento fatorial completo em dois níveis, com 11 ensaios. O momento do choque foi fixado no começo da fase exponencial de crescimento celular, que correspondia a DO (densidade óptica) entre 0,4 e 0,5. As condições usadas na literatura foram tomadas como pontos centrais.

Em tempos determinados, eram retiradas amostras do cultivo. As células colhidas eram lisadas por sonicação e submetidas a centrifugação para separação dos “*debris*”, determinando-se atividade enzimática e concentração de proteína no sobrenadante. Uma vez que era conhecida a concentração celular no lisado e o tempo de cultivo, era possível calcularem-se atividade enzimática por grama de célula úmida, por mg de proteína total produzida e produtividade, valores esses que foram utilizados como variáveis resposta no planejamento. Os resultados dos onze ensaios são mostrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Valores das variáveis respostas obtidas no planejamento experimental para expressão de BTL2 no cultivo de *E.coli* recombinante. T_{Cres} = Temperatura de crescimento, T_{Ind} = Temperatura de choque térmico, AE_{esp} = Atividade enzimática específica, $Prod.$ = Produtividade.

Ensaio	Variáveis Resposta				
	T_{Cres} (°C)	T_{Ind} (°C)	AE_{esp} (U/mg proteína) $\times 10^{-2}$	AE_{esp} (U/g cel úmida) $\times 10^{-3}$	Prod. (U/L*h)
1	27	39	0,09	2,2	0,11
2	33	39	0,62	24,9	2,25
3	27	45	2,78	230,0	18,07
4	33	45	1,73	130,1	9,59
5	25,7	42	0,90	72,2	7,96
6	34,2	42	1,65	127,0	9,54
7	30	37,8	0,15	3,07	0,54
8	30	46,2	2,11	179,3	17,60
9	30	42	1,08	82,0	6,57
10	30	42	0,95	73,1	6,24
11	30	42	1,18	81,3	6,65

Os resultados apresentados na Tabela 4.1 confirmam os valores de expressão da enzima relatados na literatura para as temperaturas de 30 e 42 °C, para crescimento e choque, respectivamente. Contudo, indicam também que mais altos níveis de expressão podem ser obtidos para outros valores dessas variáveis. Os diagramas de Pareto (figuras 4.1, 4.2 e 4.3) indicam que apenas a temperatura de choque térmico tem influência significativa nas três variáveis respostas. A significância de cada variável foi analisada para uma probabilidade de significância (p-valor) de 0,05. Na produtividade, nota-se uma interação entre a temperatura de choque e de crescimento.

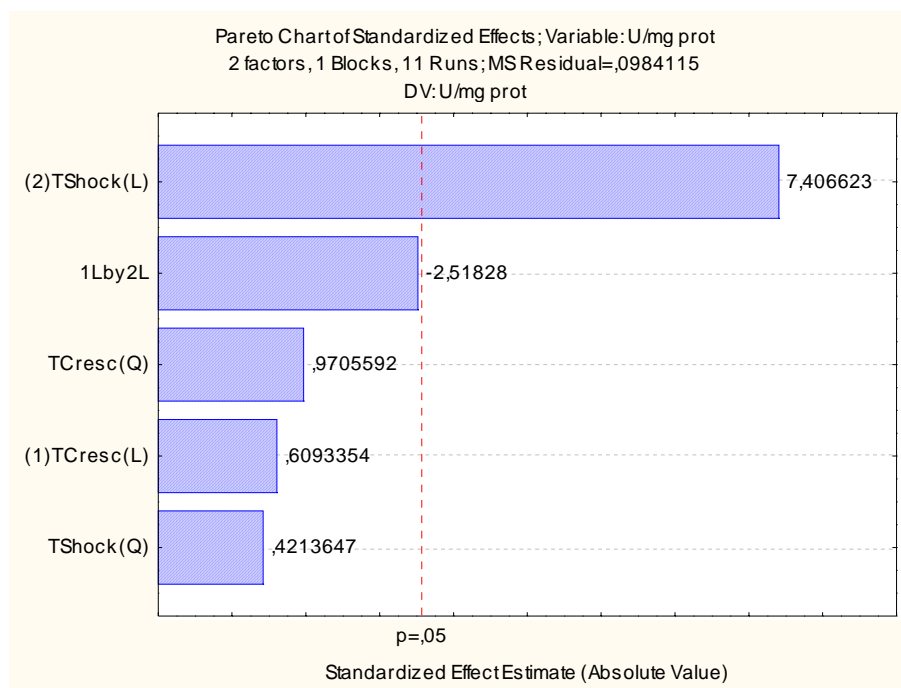


Figura 4.1 – Diagrama de Pareto da U/g de células.

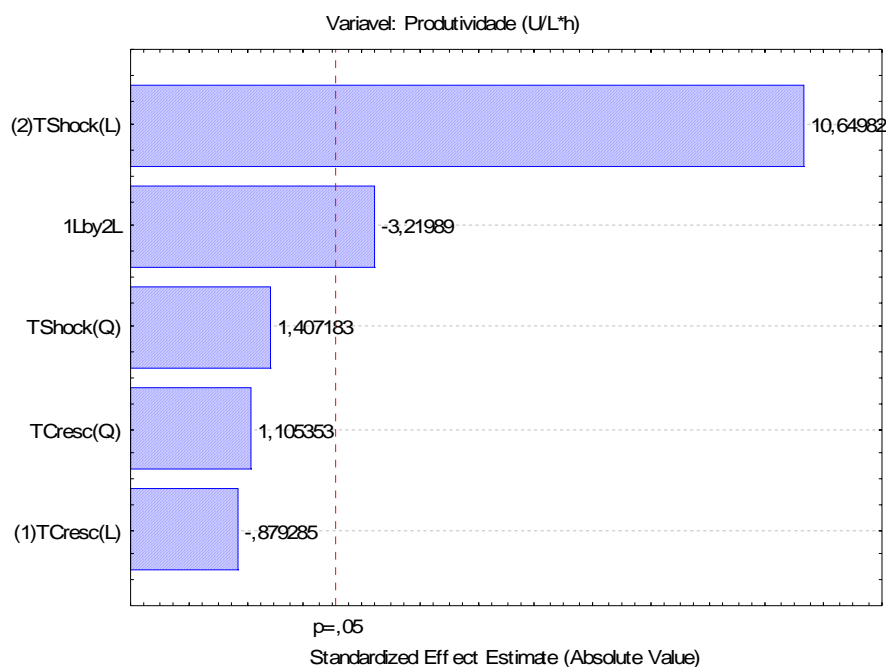


Figura 4.2 – Diagrama de Pareto U/mg prot.

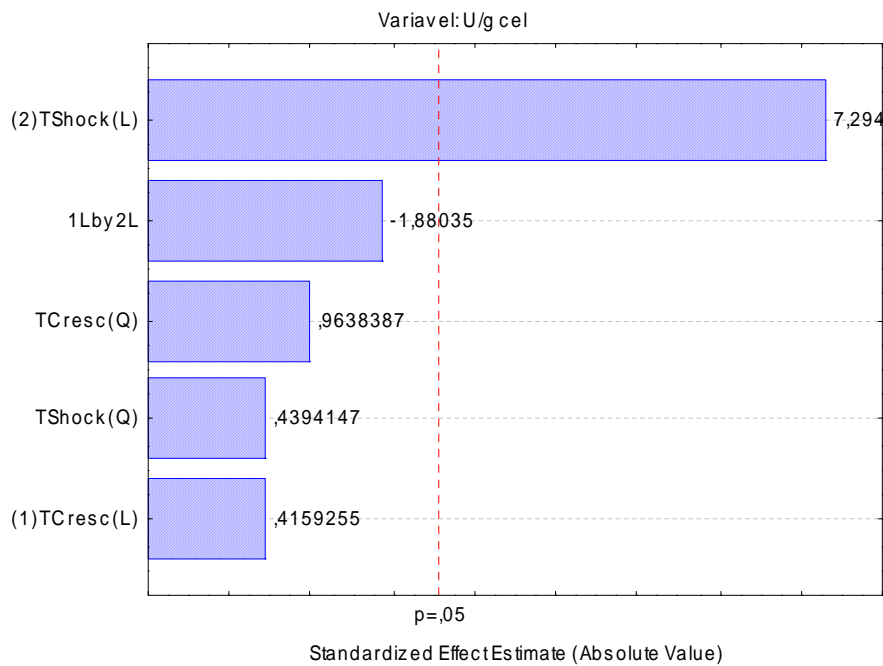


Figura 4.3 – Diagrama de Pareto da produtividade (U/L*h)

A realização de planejamento completo permite a obtenção de modelos estatisticamente confiáveis para descrever a influência de cada uma das duas variáveis testadas na expressão da enzima, bem como a interação entre essas variáveis. Torna-se possível, então, se estimarem os valores das variáveis respostas entre o valor máximo e mínimo das variáveis de entrada (temperaturas de crescimento e choque). Os seguintes modelos foram obtidos:

$$U / mgprot = 0,82x_1 + 1,20 \tag{4.1}$$

$$R^2 = 0,8127$$

$$U / gcélumi = 42,73x_1 + 53,84 \tag{4.2}$$

$$R^2 = 0,8467$$

$$Pr od(U / L * h) = 7,74 + 6,17x_1 - 2,66x_1x_2 \tag{4.3}$$

$$R^2 = 0,9378$$

Onde:

$$x_1 = \frac{T}{3} - 12 \tag{4.4}$$

$$x_2 = \frac{T}{3} - 8 \tag{4.5}$$

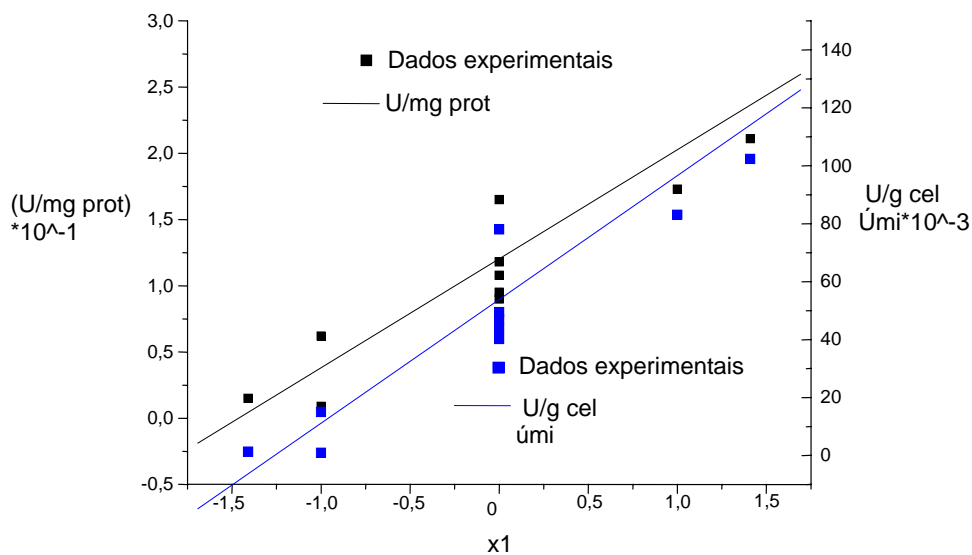


Figura 4.4 – Relação das U/mg prot e das U/g cel. Úmi com respeito à T_{choque} .

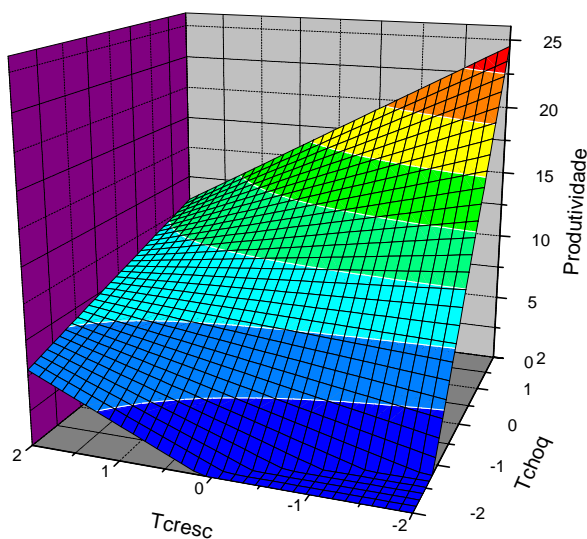


Figura 4.5 – Superfície de resposta para a variação da produtividade em BTL-2 com as temperaturas de crescimento e de choque.

A figura 4.4 mostra um bom ajuste do modelo linear aos pontos experimentais de atividades específicas (em termos de grama de célula úmida e grama de proteína) em

função da temperatura de choque. Os modelos obtidos indicam que maior a temperatura de choque mais alto o nível de expressão da enzima. A figura 4.5 mostra a superfície de resposta correspondente à influência das duas temperaturas na produtividade em BTL-2. Pode-se observar que as mais altas atividades enzimáticas são obtidas nas maiores temperaturas de choque térmico e nas mais baixas temperaturas de crescimento. O mais alto nível de expressão enzimática obtido neste estudo, para $T_{Cresc} = 27^{\circ}C$ e $T_{Choque} = 45^{\circ}C$, foi de 230000U/g cel. Úmida, um valor quatro vezes maior que o obtido na literatura, 53.000 U/g cel. Úmida), para $T_{Cresc} = 30^{\circ}C$ e $T_{Choque} = 42^{\circ}C$, (Rua *et al*, 1997).

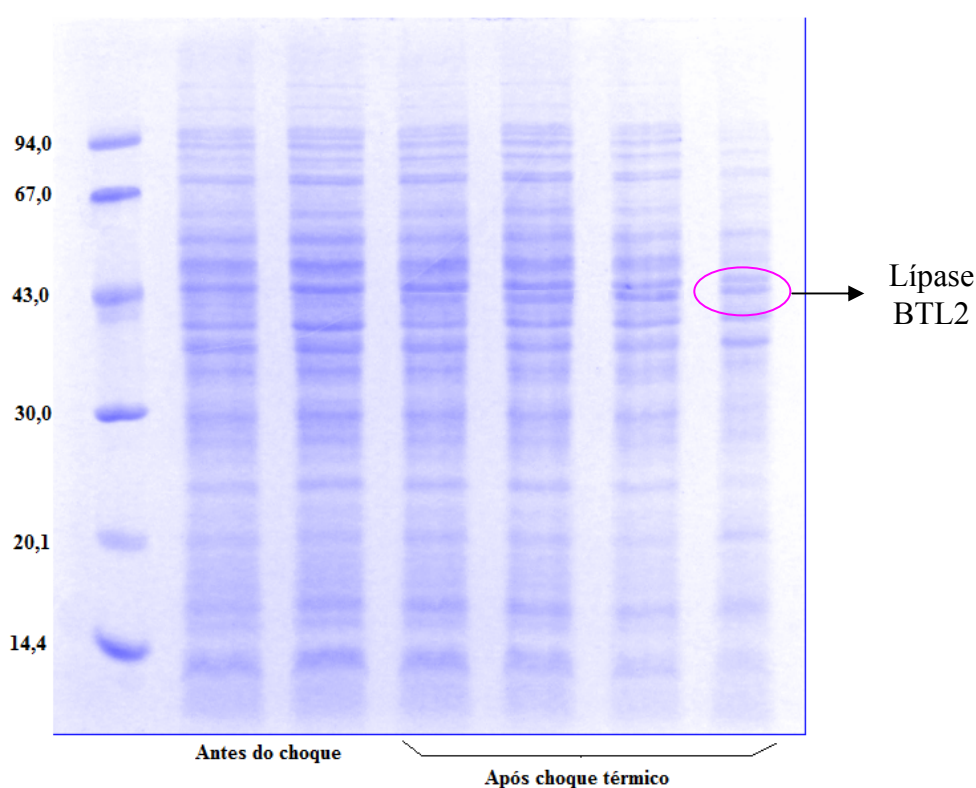


Figura 4.6 - Eletroforese SDS-PAGE das proteínas totais obtidas em cultivo para expressão de BTL2 por *E. coli* recombinante em $T_{Cresc}=33^{\circ}C$, $T_{Choque}=39^{\circ}C$. Onde: (1) Tempo inicial de cultivo, (2) Antes do choque, (3) 1 hora, (4) 4 horas, (5) 8 horas e (6) 12 horas após choque.

Como se observa na figura 4.6, a expressão da lípase BTL2 numa temperatura menor que a estabelecida para choque térmico ($T=42^{\circ}C$) é muito baixa. Esses resultados confirmam os dados reportados na literatura, onde se demonstra que para temperaturas de indução menores que $37^{\circ}C$, a desnaturação do repressor lambda cI857 é muito ineficiente e, conseqüentemente, não ocorre ativação do promotor λP_L (Villaverde *et al*, 1993).

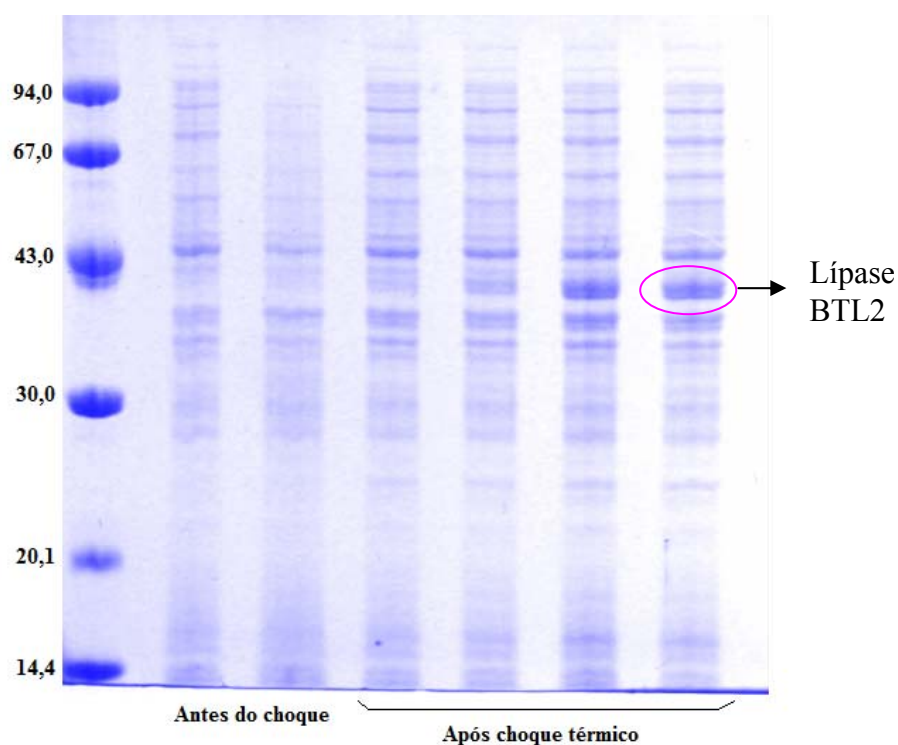


Figura 4.7 - Eletroforese SDS-PAGE das proteínas totais obtidas em cultivo para expressão de BTL2 por *E. coli* recombinante em $T_{\text{Cresce}}=30^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{Choque}}=46^{\circ}\text{C}$. Onde: (1) Tempo inicial de cultivo, (2) Antes do choque, (3) 1 hora, (4) 4 horas, (5) 8 horas e (6) 12 horas após choque.

Os resultados da eletroforese apresentados na figura 4.7 mostram todas as proteínas expressadas no cultivo de *E. coli* recombinante, com temperatura de choque de 46°C , onde se observa uma boa expressão de lípase BTL2. Contudo, segundo Villaverde *et al*, 1993, em temperaturas maiores que 45°C a bactéria ainda tem uma boa expressão da proteína recombinante, mas as células hospedeiras já se vêm afetadas pelas altas temperaturas, que não são as habituais para a fisiologia de *E. coli*. Em consequência, os níveis de expressão obtidos podem ser menores do que para uma temperatura de choque menor. Essa hipótese foi confirmada pelo cultivo realizado a 27°C , com temperatura de choque de 45°C , cujos resultados apresentados na figura 4.8 mostram maiores níveis de expressão de BTL2 nessa condição que com temperatura de choque de 46°C .

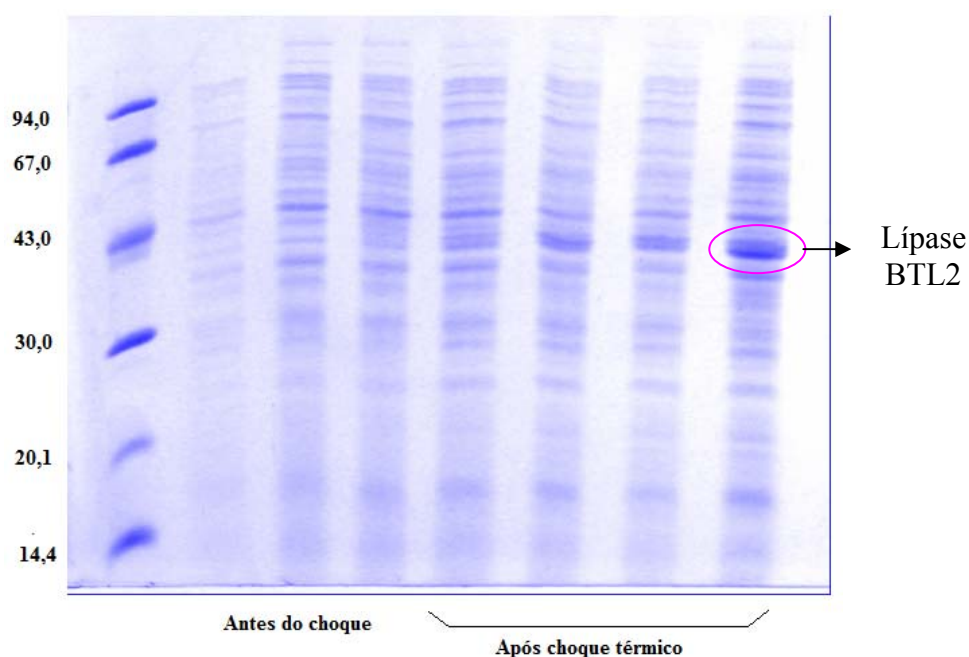


Figura 4.8 - Eletroforese SDS-PAGE das proteínas totais obtidas em cultivo para expressão de BTL2 por *E. coli* recombinante nas melhores condições encontradas, $T_{\text{Cresc}} = 27^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{Choque}} = 45^{\circ}\text{C}$. Onde: (1) Tempo inicial de cultivo, (2) Antes do choque, (3) 1 hora, (4) 4 horas, (5) 8 horas e (6) 12 horas após choque.

Os resultados da figura 4.8 confirmam assim que uma maior quantidade de lipase BTL2 é obtida nas melhores condições de cultivo indicadas pelo planejamento experimental, ou seja, $T_{\text{choque}} = 45^{\circ}\text{C}$. Essa temperatura é uma solução de compromisso entre a alta temperatura de choque requerida pelo promotor para expressão da enzima e a fisiologia da célula hospedeira, cujo sistema enzimático tende a colapsar a temperaturas mais altas.

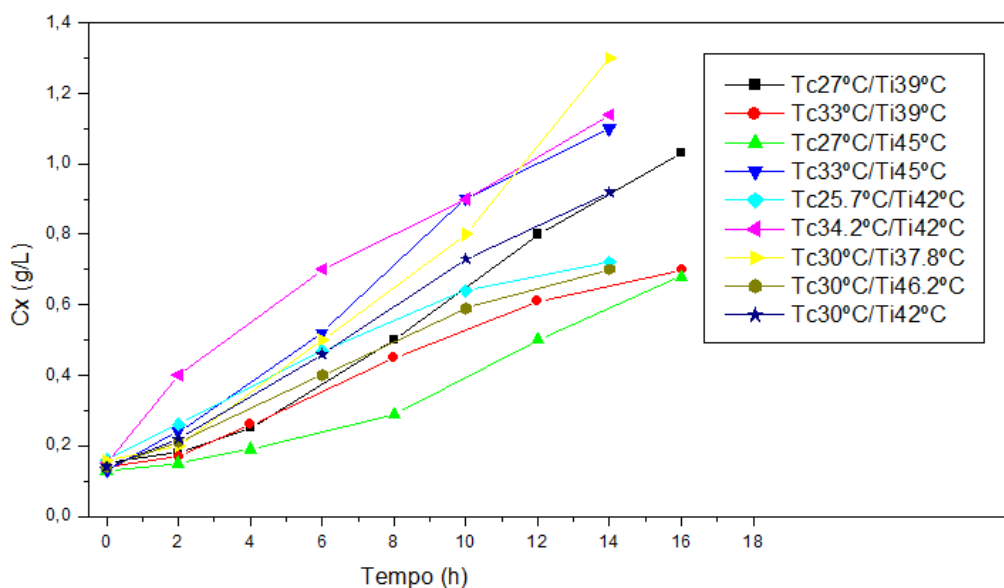


Figura 4.9 - Concentração celular em função do tempo para cultivos de *E.coli* recombinante realizados a diferentes temperaturas.

Na figura 4.9 observam-se as concentrações celulares em função do tempo de cultivo, para diferentes temperaturas de crescimento e choque térmico. Os resultados mostram que nos ensaios onde a temperatura de choque térmico é menor, o crescimento celular é maior, devido a que a célula não sofre um stress físico tão alto e consegue aumentar sua massa celular e não gastar tanto sua fonte de carbono em processos de manutenção celular.

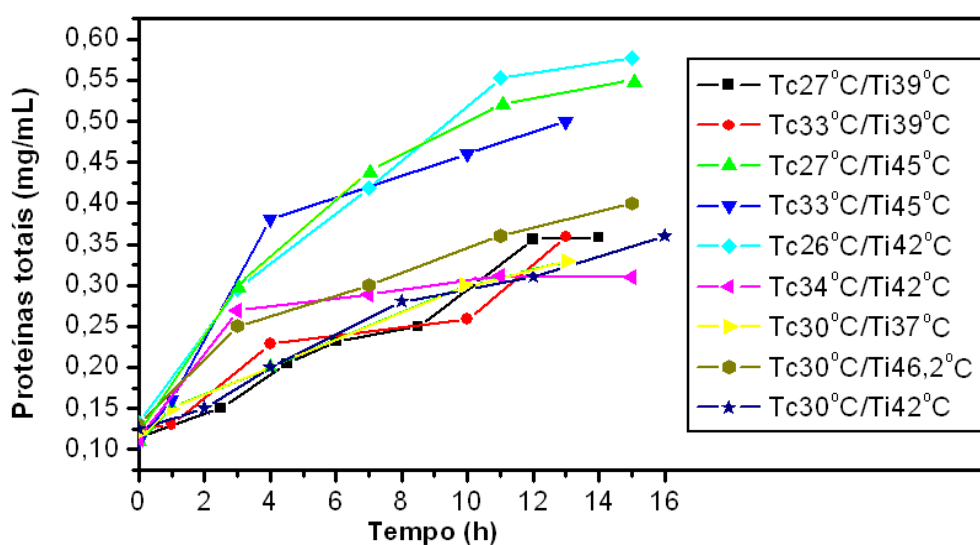


Figura 4.10 - Concentração de proteínas em função do tempo para cultivo de *E.coli* recombinante a diferentes temperaturas.

Como se observa na figura 4.10 à medida que aumenta a temperatura de choque térmico a concentração de proteínas também aumenta, já que ocorre aumento na expressão da proteína heteróloga produzida pelo microorganismo recombinante. Embora, conforme mostrado na Figura 4.9., a concentração celular quase dobre entre os cultivos da menor para a maior temperatura, a concentração de proteínas quase quintuplica, para as mesmas condições. Em conseqüência, as maiores produtividades são atingidas nas maiores temperaturas de choque, conforme mostrado na Figura 4.11. Essa Figura também indica aumento na produtividade com o tempo de cultivo. Contudo, esse estudo visava apenas determinar as temperaturas ótimas de crescimento e cultivo, para serem utilizadas no cultivo em biorreator, quando então o cultivo será acompanhado por tempos mais longos que 12 horas.

O estudo da influência da temperatura nos níveis de expressão de BTL2 foi realizado sempre se aumentando a temperatura quando a concentração celular estava entre $DO_{578\text{ nm}}=0,4-0,5$, o que correspondia ao início da fase exponencial de crescimento. Uma vez encontradas as melhores temperaturas, decidiu-se a seguir investigar a influência da fase de crescimento em que se encontrava o microrganismo no momento do choque térmico nos níveis de expressão de BTL2.

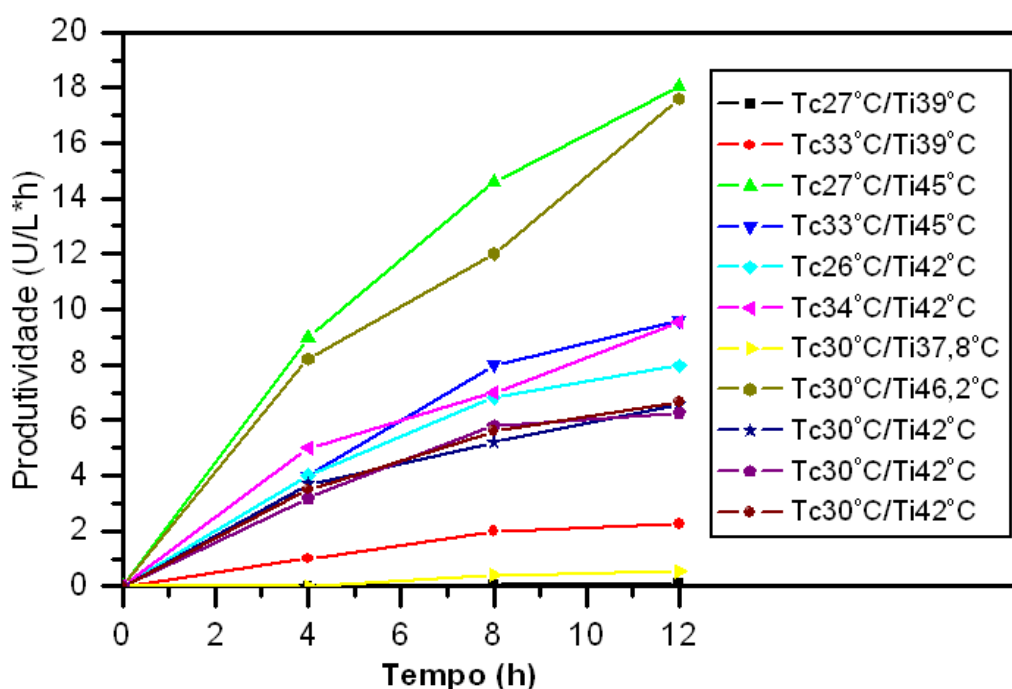


Figura 4.11 - Produtividade em BTL2 obtida nos cultivos de *E.coli* recombinante em diferentes temperaturas de crescimento e de choque térmico.

4.2 Determinação da melhor fase de crescimento para a realização do choque térmico

Após a determinação das temperaturas mais adequadas para crescimento e choque térmico, através do planejamento experimental, realizaram-se ensaios variando a fase de crescimento onde era feito o choque térmico.

E. coli foi cultivada a 27°C, melhor temperatura para crescimento, inoculando-se 50 mL de inóculo em 450 mL de meio LB em frasco de 1000 mL. O inóculo foi obtido a partir do crescimento de uma colônia até DO entre 1,2-1,3. Foi possível assim identificarem-se as densidades óticas correspondentes à fase inicial do crescimento exponencial, final da fase exponencial e fase estacionária, obtendo-se $DO_{578\text{ nm}} = 0,4-0,5$, ($DO_{578\text{ nm}}=0,8-0,9$ e $DO_{578\text{ nm}}=1,1-1,2$, respectivamente. Nesse crescimento a 27°C, essas densidades óticas foram atingidas, após 6 horas, 8 horas e 12 horas, respectivamente. Rua et al, 1997, atingiram o final da fase exponencial em 5 horas, o crescimento foi realizado a 30°C. A figuras 4.12-4.13 mostram os resultados obtidos nos três cultivos.

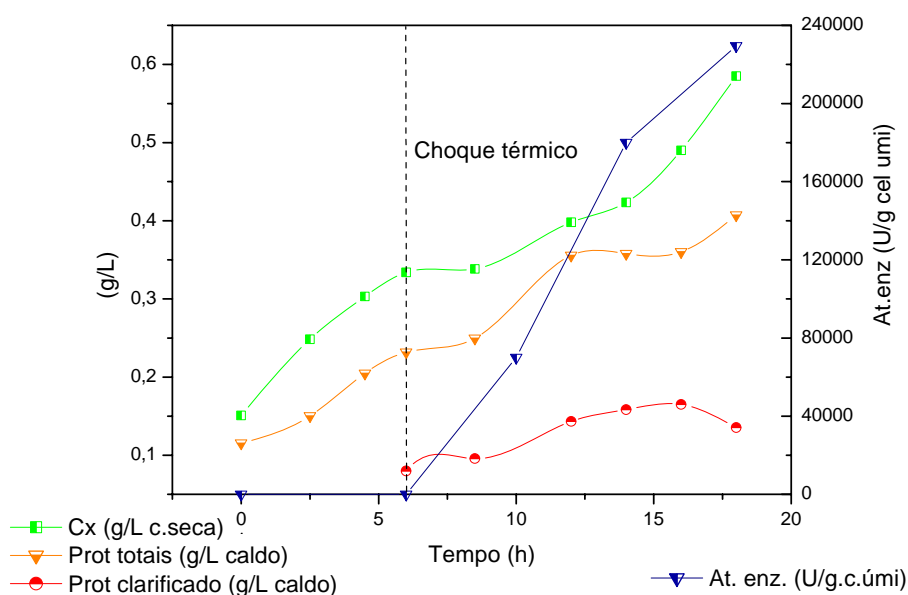


Figura 4.12 - Concentração celular – Cx, concentração de proteínas –Prot e atividade enzimática –At. enz. ao longo do tempo durante cultivo de *E. coli* recombinante para expressão de BTL2. Tc=27°C; Tchoque=45°C. Choque térmico no início da fase exponencial ($DO_{578\text{ nm}} = 0,4-0,5$).

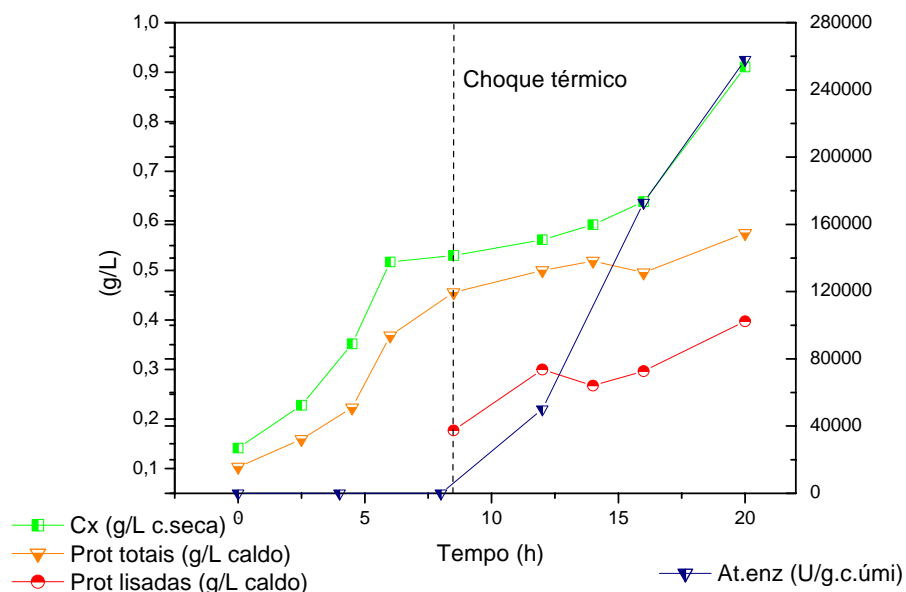


Figura 4.13 - Concentração celular – Cx, concentração de proteínas –Prot e atividade enzimática –At.enz. ao longo do tempo durante cultivo de *E.coli* recombinante para expressão de BTL2. Tc=27°C; Tchoque=45°C. Choque térmico no final da fase exponencial (DO_{578 NM} = 0,8-0,9).

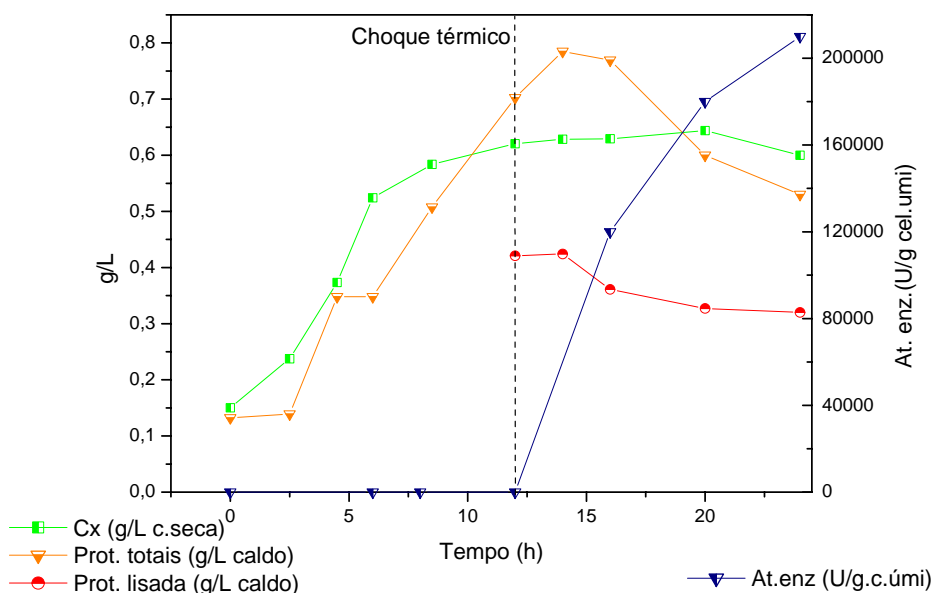


Figura 4.14 - Concentração celular – Cx, concentração de proteínas –Prot e atividade enzimática –At.enz. ao longo do tempo durante cultivo de *E.coli* recombinante para expressão de BTL2. Tc=27°C; Tchoque=45°C. Choque térmico na fase estacionaria (DO_{578 NM} = 1,1-1,2).

Conforme pode ser observado nas figuras 4.12 - 4.14, a atividade enzimática máxima atingida aumentou de 230.000 U/cel úmida ($DO_{578\text{ nm}}=0,4-0,5$) para 258.000 U/g cel úmida com o choque realizado em $DO_{578\text{ nm}}=0,8-0,9$ e diminuiu para 210.000 U/g cel úmida com o choque em $DO_{578\text{ nm}}=1,1-1,2$. A figura 4.15 mostra eletroforese das proteínas expressadas com o choque realizado em $DO_{578\text{ nm}}=0,8-0,9$ e em $DO_{578\text{ nm}}=1,1-1,2$. Os resultados obtidos confirmam os menores níveis de expressão da enzima com o choque realizado na DO mais alta. Possivelmente, o nível de expressão cai por que as células já não são tão novas e precisam gastar muita energia para manutenção, tendo ainda que suportar o “stress” de um choque térmico, que causa morte celular, a qual pode ser observada realmente ocorrer 12 horas após choque térmico, na figura 4.14.

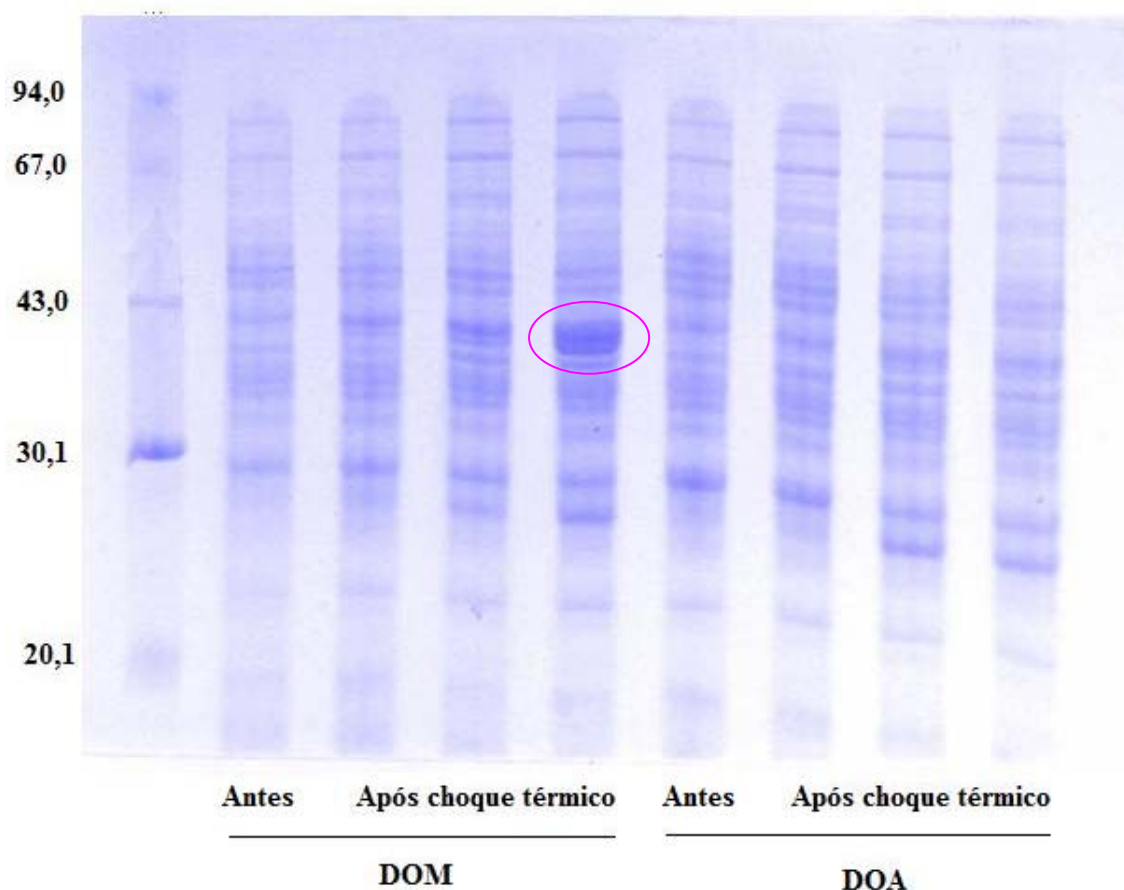


Figura 4.15 - Eletroforese SDS-PAGE de proteínas totais antes e depois do choque térmico para fases de crescimento (DOM : $DO_{578\text{ NM}}=0,8-0,9$) e (DOA : $DO_{578\text{ NM}}=1,1-1,2$). Cultivo de *E.coli* recombinante para expressão de BTL2. $T_c=27^\circ\text{C}$; $T_{\text{choque}}=45^\circ\text{C}$

Tabela 4.2 - Concentração de aminoácidos não consumidos durante ensaios de expressão de BTL2 por *E. coli* recombinante (Tc=27°C; Tchoque=45°C), com indução realizada em diferentes fases de crescimento.

Amino ácidos	DOB		DOM		DOA	
	Conc. Inicial (mM)	Conc. Media* (mM)	Conc. Inicial (mM)	Conc. Media* (mM)	Conc. Inicial (mM)	Conc. Media* (mM)
Gly	1,012±0,11	1,1383	0,922±0,11	1,2454	1,02±0,11	1,17242
His	0,501±0,03	0,5483	0,49±0,03	0,55074	0,5±0,03	0,56
Arg	1,831±0,09	1,7833	1,759±0,09	1,8084	1,75±0,09	1,7058
Ala	2,966±0,14	3,16	2,841±0,14	3,1784	2,95±0,14	3,0962
Pro	0,51±0,06	0,4983	0,492±0,06	0,46308	0,48±0,06	0,4804
Tyr	0,485±0,03	0,4567	0,462±0,03	0,4515	0,46±0,03	0,4464
Val	2,477±0,19	2,6117	2,38±0,19	2,757	2,4±0,19	2,764
Met	0,939±0,03	1,055	0,91±0,03	1,0228	0,92±0,03	1,052
Cys	0,609±0,04	0,015	0,888±0,04	0,1454	0,09±0,04	0,1896
Ile	1,729±0,03	1,7517	1,64±0,03	1,816	1,62±0,03	1,812
Leu	5,503±0,31	5,555	5,235±0,31	5,6392	5,38±0,31	5,493
Phe	2,191±0,09	2,15	2,07±0,09	2,1678	2,1±0,09	2,13
Lys	2,459±0,16	1,63	2,363±0,16	2,5184	2,52±0,16	2,4886

*Valores médios entre as concentrações medidas em diferentes tempos de cultivo, no ensaio correspondente.

Após a realização de cultivos com o choque em diferentes estágios do crescimento celular, foram quantificadas as concentrações de aminoácidos no início e no final dos três cultivos. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.2 e na figura 4.16 (a,b,c). Os resultados da Tabela 4.2 mostram resultados de aminoácidos que não foram consumidos em nenhum dos três ensaios. Conforme pode ser comprovado pelos dados mostrados, não ocorre variação significativa entre valores iniciais e finais de Gly, His, Arg, Ala, Pro, Tyr, Val, Met, Cys, Ile, Leu e Phe, para os três cultivos. Já na figura 4.2.5 observa-se haver consumo de Asp, Glu, Ser e Thr, com padrões diferentes para cada DO de choque.

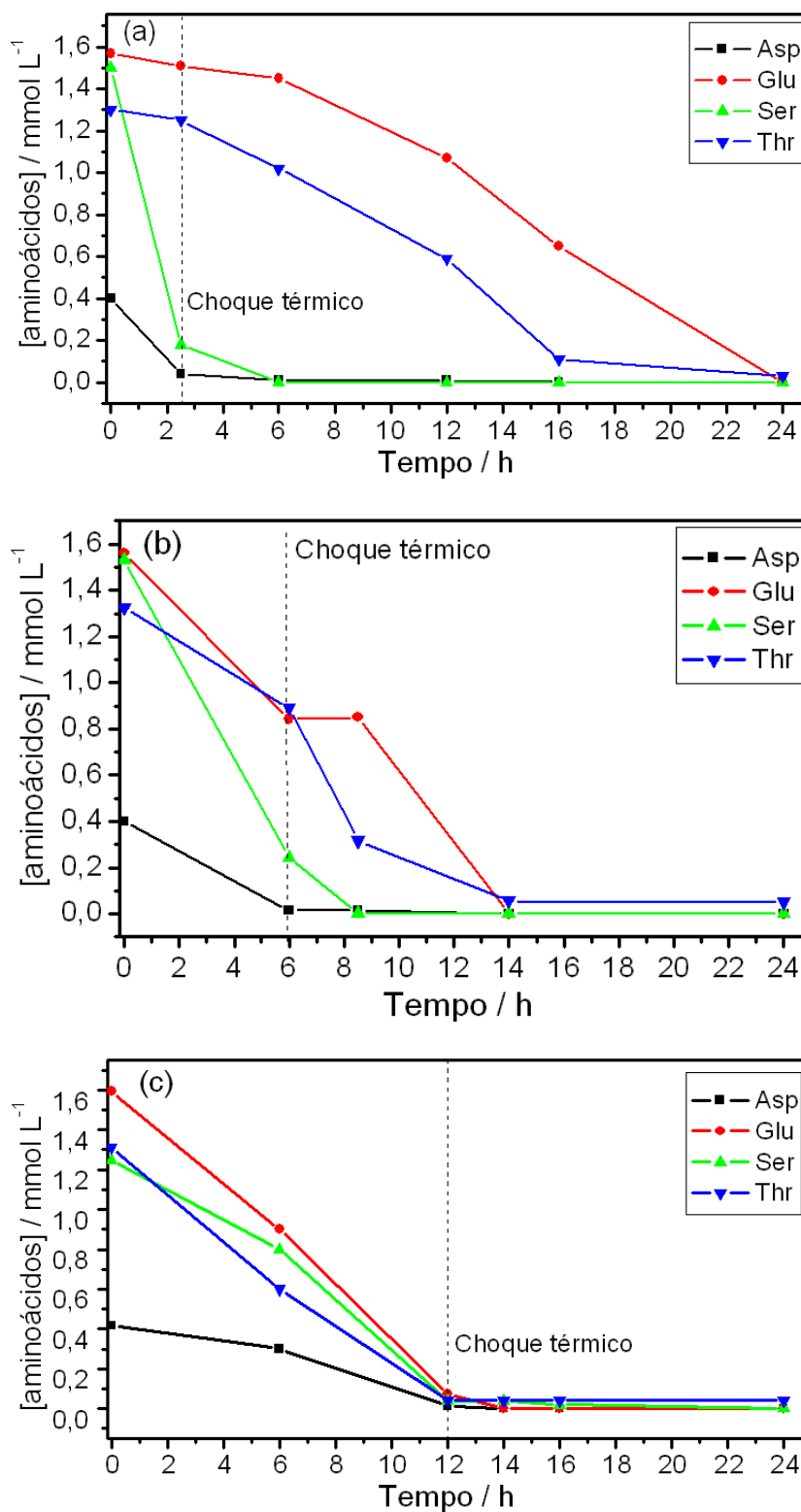


Figura 4.16 - (a) Concentração de aminoácidos consumidos ao longo do tempo durante cultivo de *E.coli* recombinante para expressão de BTL2 ($T_c=27^{\circ}\text{C}$; $T_{\text{choque}}=45^{\circ}\text{C}$) Para ensaios com choque térmico: (a) no começo da fase exponencial. (b) final da fase exponencial (c) Fase estacionária

Pode ser observado que o tempo para consumo total de Asp aumenta de 2 horas, para 6 horas e para 12 horas, quando o momento de choque varia de $DO_{578\text{ nm}}=0,4-0,5$, para $DO_{578\text{ nm}}=0,8-0,9$ e $DO_{578\text{ nm}}=1,1-1,2$, respectivamente. O esgotamento de Ser se deu em 6 horas, 8 horas e 12 horas; Glu e Thr tiveram padrões semelhantes de consumo, diminuindo de 24 horas, para 14 horas e para 12 horas quando o momento de choque variou de $DO_{578\text{ nm}}=0,4-0,5$, para $DO_{578\text{ nm}}=0,8-0,9$ e $DO_{578\text{ nm}}=1,1-1,2$, respectivamente. Nos ensaios onde o choque ocorreu nas duas DO mais altas, o esgotamento de Asp coincide com a parada no crescimento celular, mas para a DO menor o esgotamento em 2 horas não parece estar relacionado com nenhuma das outras variáveis acompanhadas, o que pode ser um erro experimental. O que parece claro, contudo, é que nas condições em que foram realizados os ensaios em frascos agitados, os aminoácidos não consumidos não são necessários para a expressão da enzima, nem para o crescimento celular nos níveis atingidos nesses ensaios. Possivelmente, então, ou eles podem ser obtidos a partir dos que estão sendo consumidos ou estão sendo supridos pelos di e tri-peptídeos presentes em triptona.

4.3 Determinação da concentração de glicose para o ensaio em biorreator

Nos ensaios realizados em frascos agitados a concentração celular não chegou nunca a 1 g/L, possivelmente devido ao esgotamento de aminoácidos, conforme pode ser observado na figura 4.16. No meio LB que vem sendo usado nos cultivos até agora, esses aminoácidos devem estar atuando como fontes de carbono e de nitrogênio. Contudo, o aumento na quantidade de enzima expressada por litro de biorreator irá requerer aumento na massa microbiana, o que pode ser obtido pelo fornecimento de uma fonte de carbono de fácil assimilação pelo microrganismo, preferencialmente glicose. Contudo, é sabido que a manutenção de altas concentrações de glicose pode inibir a expressão da enzima. A alimentação contínua de glicose (batelada alimentada) permite prorrogar a fase exponencial de crescimento do microrganismo, pois ocorre fornecimento contínuo da fonte de carbono, mas mantém baixa concentração dela no meio. A literatura relata ensaio em batelada realizado com *E. coli* recombinante em meio LB com glicose, mas apenas com 1 g/L (Rua *et al*, 1997). Nesse ensaio a concentração celular foi na ordem de 2,2 g/L de massa seca, com atividade enzimática máxima de 53.000 U/gcel. Úmida.

Tornava-se importante, assim, estudar o crescimento de *E.coli* e expressão de BTL2 na presença de diferentes concentrações iniciais de glicose como fonte de carbono. Esses ensaios permitiram cálculo da velocidade específica de crescimento e do fator de conversão glicose/células, parâmetros esses importantes para orientar na estratégia adequada de alimentação de glicose. Assim, utilizando-se as temperaturas de crescimento e de choque e a fase para indução escolhidas nos estudos descritos nos itens anteriores foram realizados cultivos com meio LB, na presença de 0, 5, 10 e 20 g/L de glicose. As figuras 4.17 a 4.20 mostram os resultados obtidos.

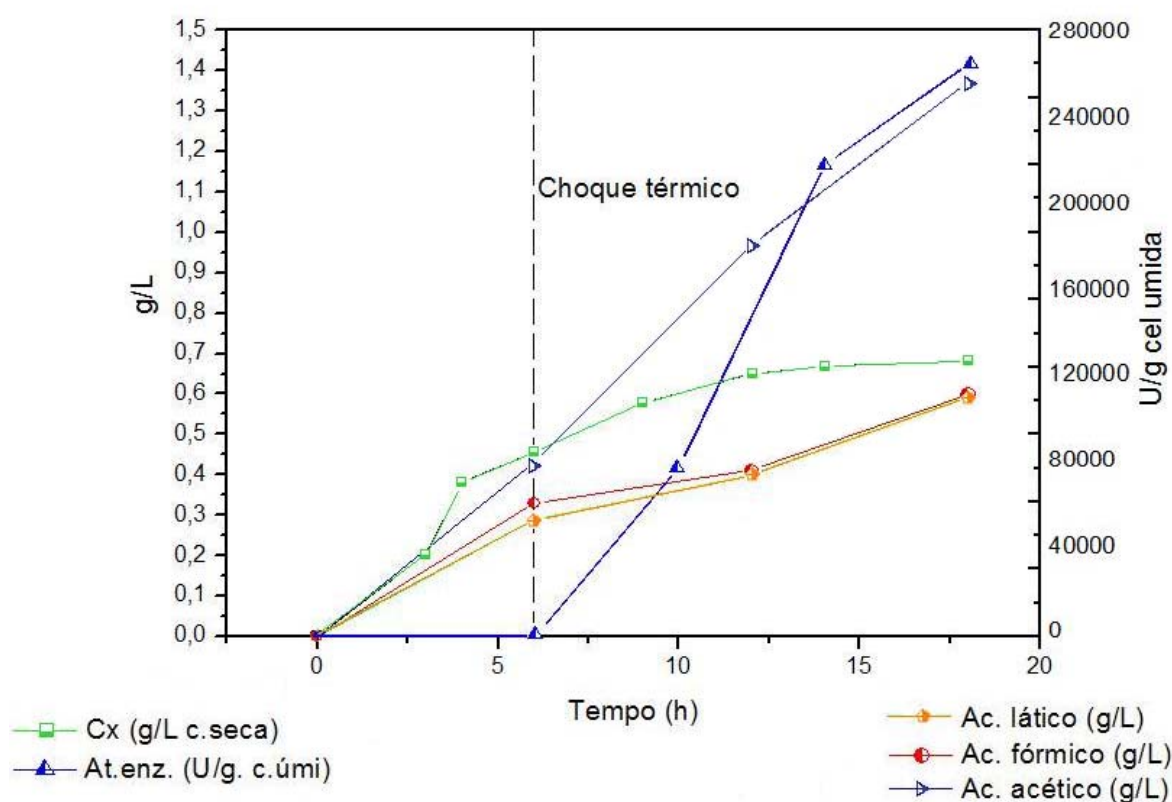


Figura 4.17 - Concentração celular (Cx), atividade enzimática (At Enz.) e metabólitos gerados no cultivo de *E.coli* para expressão de BTL2 em meio LB (0 g/L de glicose).

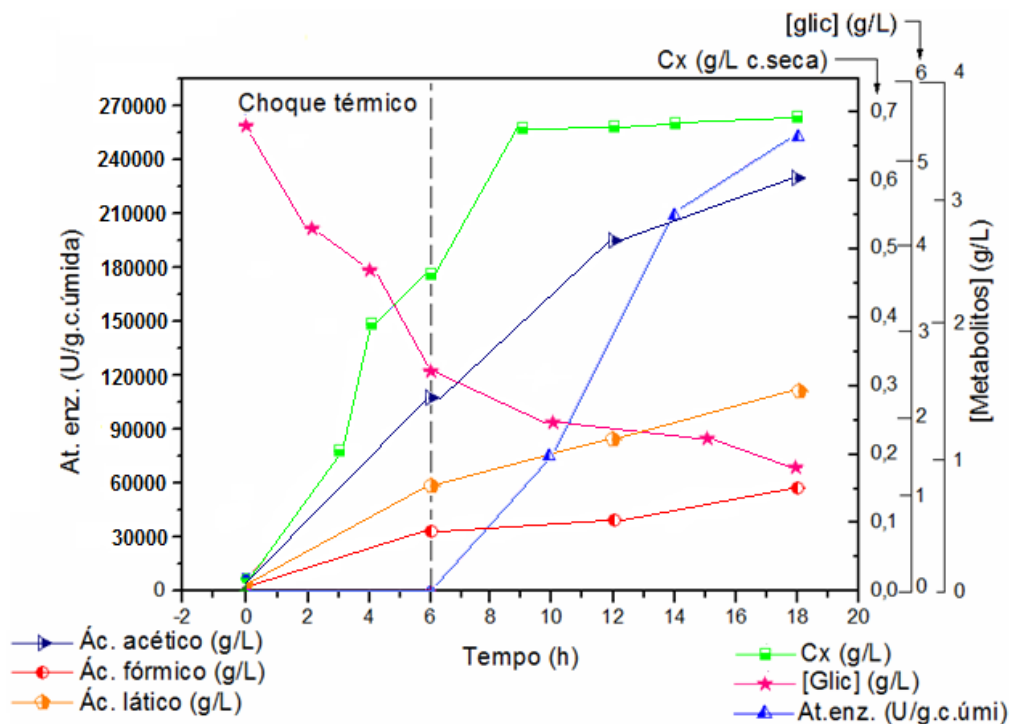


Figura 4.18 - Concentração celular (Cx), atividade enzimática (At. Enz.), concentração de glicose e de metabólitos gerados no cultivo de *E.coli* para expressão de BTL2 em meio LB (5,0 g/L de glicose) de glicose

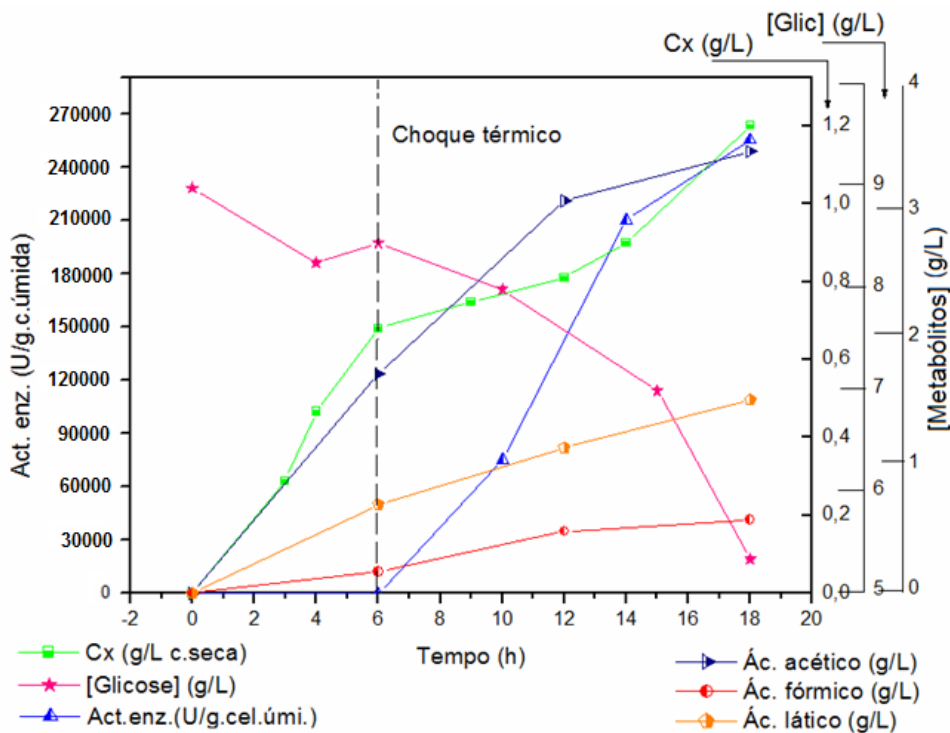


Figura 4.19 - Concentração celular (Cx), atividade enzimática (At. Enz.), concentração de glicose e de metabólitos gerados no cultivo de *E.coli* para expressão de BTL2 em meio LB (10,0 g/L de glicose).

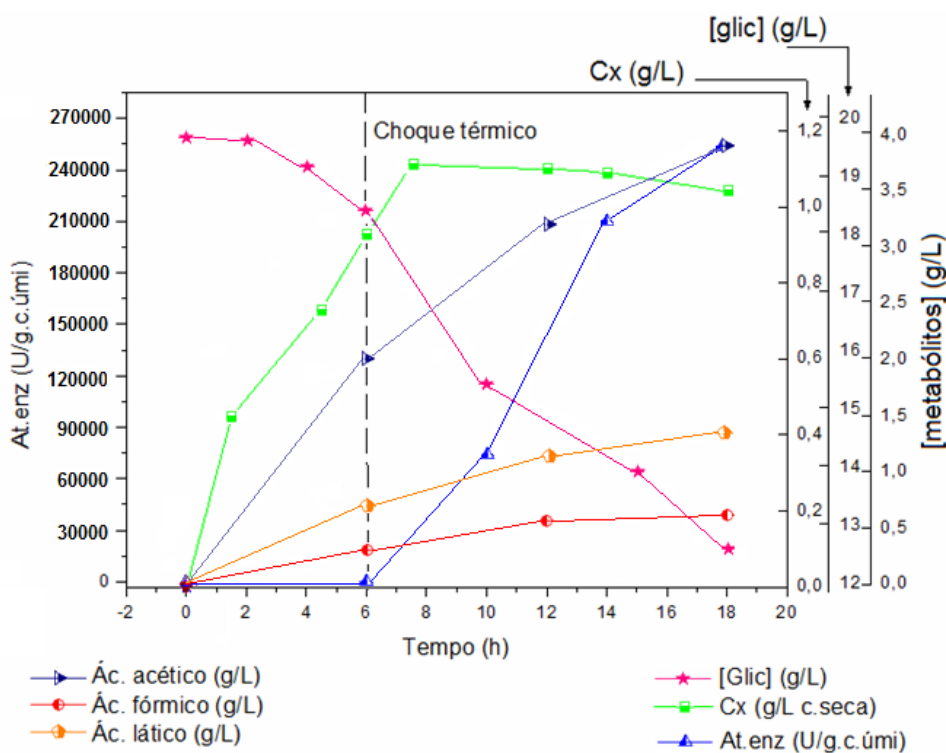


Figura 4.20 - Concentração celular (Cx), atividade enzimática (At Enz.), concentração de glicose e de metabólitos gerados no cultivo de *E.coli* para expressão de BTL2 em meio LB (20,0 g/L de glicose).

Os resultados mostrados nas Figuras 4.17-4.20 indicam que *E. coli* recombinante nunca consome toda a quantidade de glicose adicionada no meio. A concentração celular máxima atingida nesses ensaios foi de 1,2 g/L, quando a concentração inicial de glicose era de 10,0 g/L. A Tabela 4.3 apresenta valores de parâmetros cinéticos e de concentrações de glicose consumida e metabólitos produzidos nos ensaios a diferentes concentrações de glicose inicial.

Tabela 4.3 - Resumo dos parâmetros cinéticos com glicose

Concentração glicose (g/L)	μ_{max} (h ⁻¹)	μ após choque térmico (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g cel seca/g glic)	DO máx. (578 nm)	Biomassa máxima (g/L)	Quantidade de glicose consumida (g/L)	Quantidade de ácido acético produzido (g/L)
0	0,140	0,0020	-	1,34	0,68	0	0,6
5	0,143	0,0022	0,1613	1,58	0,694	4	3,21
10	0,162	0,0039	0,1846	1,734	1,2	3,9	3,49
20	0,181	0,0049	0,2022	2,12	1,04	7,1	3,94

Os resultados mostrados nas figuras 4.17 a 4.20 indicam ainda aumento da massa celular à medida que se aumenta a concentração inicial de glicose. Contudo, conforme pode ser visto na Tabela 4.3, esse aumento não é proporcional ao aumento de glicose consumida. Possivelmente, isso se deve à limitação no fornecimento de oxigênio, pois a relação entre volume do frasco e volume de meio era desfavorável (500 mL de meio em frasco de 1000 mL). A baixa oxigenação celular também pode explicar a grande quantidade de ácido acético obtidas nos ensaios com diferentes concentrações de glicose (ver tabela 4.3). O ácido acético inibe o crescimento celular e a síntese da proteína recombinante (Seeger et al, 1995).

O acetato é produzido quando *E. coli* é crescida sob condições anaeróbicas ou em condições limitantes de oxigênio, porém cultivos de *E. coli* com excesso de glicose, mesmo em condições de aerobiose podem produzir acetato (Holms & El-mansi, 1988).

Concentrações de acetato acima de 5 g/L reduzem a taxa de crescimento, o rendimento em biomassa e a máxima concentração atingível em cultivos com altas densidades celulares (Luli e Strohl, 1990). A literatura também reporta que acetato tem efeito deletério maior em culturas recombinantes que em culturas selvagens e a produção de proteínas recombinantes é significativamente reduzida pelo seu acúmulo (Shimizu *et al*, 1992).

Observa-se pelos dados apresentados na Tabela 4.3 que μ_{\max} para a concentração de 0 g/L de glicose é muito similar ao valor calculado para 5g/L, atingindo-se também nesses dois ensaios concentrações celulares muito parecidas (0,68 e 0,694 g/L respectivamente). O consumo de glicose foi similar para 5 e 10 g/L. Para 20 g/L de glicose o consumo desse nutriente foi praticamente o dobro, mas atingiu-se concentração celular inferior à obtida com 10g/L. Com relação à expressão da proteína heteróloga, a adição de glicose no meio LB não influenciou, obtendo-se para todas as concentrações atividades enzimáticas similares à obtida na ausência de glicose.

A partir dos resultados obtidos nesses ensaios, decidiu-se realizar ensaio em biorreator, iniciado com batelada com meio LB contendo 10 g/L de glicose, condição onde se obteve a máxima concentração celular, 1,2 g/L. Ao se atingir esgotamento da glicose se passaria a alimentar exponencialmente o meio. Com relação à temperatura de cultivo, o planejamento experimental descrito no item 4.1 havia indicado 27°C como temperatura que conduziu à máxima atividade enzimática, Contudo, essa não era uma variável altamente relevante e a baixa temperatura iria aumentar o tempo de cultivo. Além disso, 30°C foi a

temperatura utilizada na literatura (Rua et al., 1997) e na qual o grupo já havia realizado outros cultivos de *E.coli* em biorreator, o que daria uma base para a escolha dos parâmetros nas simulações do cultivo. Assim, decidiu-se operar o biorreator a 30°C.

4.4 Ensaio no biorreator $T_{Cresc} = 30^{\circ}C$, $T_{Choque} = 45^{\circ}C$

O objetivo deste ensaio é realizar uma exploração preliminar do desempenho do cultivo em biorreator, em batelada alimentada, de forma a aumentar a quantidade de células recombinantes expressando a proteína heteróloga e obter maior quantidade de enzima por litro de reator. O ensaio foi realizado no biorreator Aplikon de 2.0 L, com $T_{Choque} = 45^{\circ}C$, choque no final da fase exponencial, meio LB com 10 g/L de glicose e mantendo-se concentração de oxigênio dissolvido de 30%, alimentando-se inicialmente ar e depois oxigênio puro.

Como já analisado anteriormente, os dados cinéticos obtidos em shaker, apresentados na tabela 4.3, representam um crescimento com provável limitação de oxigênio, o que se refletiu em altas concentrações de ácidos orgânicos (principalmente acético) nos produtos. Para projetar a estratégia de operação do biorreator, foram utilizados parâmetros cinéticos de outros cultivos de *E. coli* recombinante realizados no grupo. Para tanto, utilizou-se uma rotina computacional programada em Matlab 6.5, desenvolvido pelo doutorando Antônio Carlos Luperni Horta durante seu mestrado (Horta,2007)

Um modelo simplificado do cultivo foi utilizado, não considerando a produção e posterior consumo dos ácidos orgânicos e assumindo cinética de Monod simples, sem efeitos inibitórios e desprezando a morte celular e o termo de manutenção. Por se tratar de um ensaio exploratório, optou-se por essa abordagem simplificada, que demanda número menor de parâmetros. As equações do modelo são então dadas por:

$$\mu = \mu_M \cdot \frac{C_s}{K_s + C_s} \quad (4.1)$$

$$\frac{dC_x}{dt} = -\frac{F}{V} \cdot C_x + \mu \cdot C_x \quad (4.2)$$

$$\frac{dC_s}{dt} = \frac{F}{V} (C_f - C_s) - \frac{\mu}{Y_{XS}} \cdot C_x - m \cdot C_x \quad (4.3)$$

Os valores empregados para os parâmetros μ_M , K_s , Y_{xs} e m se encontram na tabela 4.4.

Tabela 4.4 Parâmetros do modelo cinético utilizados nas simulações do cultivo de *E.coli* recombinante para expressão de BTL2.

Parâmetro	μ_M	K_s	Y_{xs}	M
Valor (antes da indução)	0,45	0,7	0,3	1.0×10^{-3}
Valor (depois da indução)	$6,8 \times 10^{-2}$	$6,4 \times 10^{-4}$	0,4	1.2×10^{-1}

A estratégia do experimento está resumida na tabela 4.5

Tabela 4.5 Parâmetros operacionais do cultivo em batelada alimentada.

Alimentação de meio suplementar	Perfil exponencial: $F = C1 \cdot \exp(C2 \cdot t)$
Cultivo feito em três etapas	Batelada, seguida de dois períodos de alimentação exponencial (antes e após a indução térmica)
Concentração de glicose residual	Próxima de zero
Velocidade específica crítica de crescimento durante a fase de alimentação de meio suplementar (μ_c)	$0,13 \text{ h}^{-1}$

Assumindo que a velocidade específica de crescimento é dependente apenas da concentração do substrato limitante, ao se impor que a concentração desse substrato seja constante e igual a C_s^0 chega-se à expressão a seguir para um perfil teórico de alimentação (vide, por exemplo, Nielsen et al., 2003, pg. 367 em diante)

$$F = \frac{\left(\frac{\mu_c}{Y_{xs}} + m \right) \cdot C_x^0 \cdot V_0}{C_f - C_s^0} \cdot \exp(\mu_c \cdot t) \quad (4.4)$$

A concentração de células (C_x^0) no início da alimentação de meio suplementar é dada pela resolução do balanço de massa da etapa de operação em batelada, e tem solução analítica – embora, aqui, o perfil de crescimento celular tenha sido obtido pela solução numérica das equações do modelo, por facilidade. A concentração de substrato nesse momento (C_s^0), que se

pretende manter constante, e o volume do reator ao final da etapa em batelada, V^0 , são parâmetros operacionais a serem definidos a partir dos resultados das simulações.

São mostrados aqui, a título de ilustração, os resultados de duas simulações. Na primeira, foi utilizada a alimentação exponencial obtida a partir da equação 4.4. As entradas necessárias ao programa estão indicadas na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 Parâmetros e variáveis iniciais para simulação do cultivo de *E.coli* recombinante em batelada alimentada, utilizando alimentação exponencial calculada a partir da equação 4.4.

C_f	240 g/L
C_1 (antes da indução)	0,003 L/h
C_1 (após a indução)	0,014 L/h
$C_2 = \mu c$	$0,12 \text{ h}^{-1}$
Início da alimentação	6 h
Indução (choque térmico)	16 h
$C_x (t=0)$	0,13 g/L
$C_s (t=0)$	10 g/L

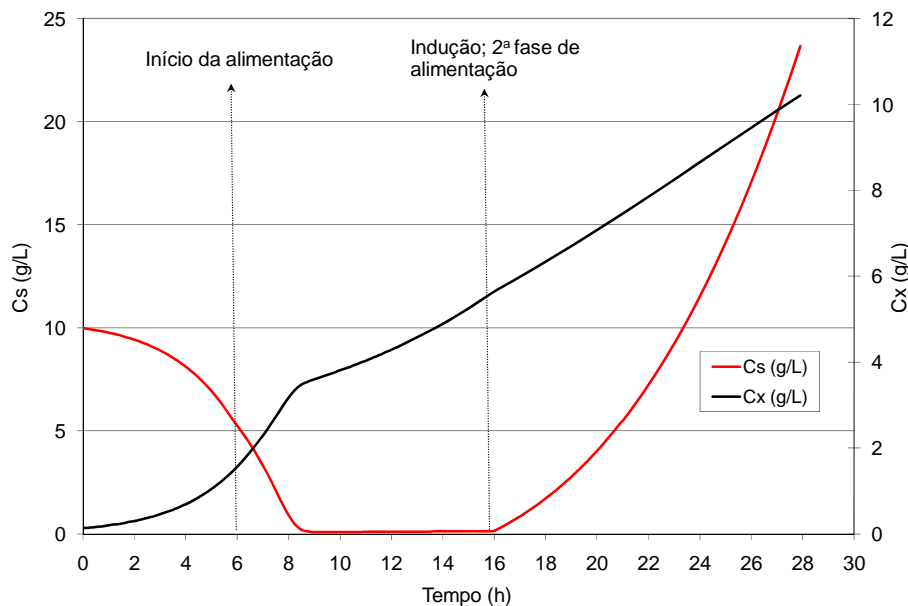


Figura 4.21 - Resultado da simulação da batelada alimentada no cultivo de *E.coli* recombinante a 30°C, com os parâmetros da Tabela 4.6.

Várias simulações foram realizadas a seguir, alterando-se variáveis operacionais, e finalmente optou-se por utilizar as condições indicadas na Tabela 4.7 no ensaio real. O valor da velocidade crítica específica de crescimento, μ_c , foi assumido igual a $0,13 \text{ h}^{-1}$. Os valores da vazão de alimentação de partida (C1) e de μ_c (C2) foram assumidos maiores que os valores da Tabela 4.6. Com esses valores, obteve-se perfil simulado de crescimento mais favorável, como mostra a figura 4.22.

Tabela 4.7 - Parâmetros da simulação utilizando maior vazão de alimentação de meio suplementar e $\mu_c = 0,2 \text{ h}^{-1}$.

Cf	240 g/L
C1 (antes da indução)	0,010 L/h
C1 (após a indução)	0,019 L/h
C2 = μ_c (antes da indução)	$0,13 \text{ h}^{-1}$
C2 = μ_c (após a indução)	$0,05 \text{ h}^{-1}$
Início da alimentação	6 h
Indução (choque térmico)	16 h
Cx (t=0)	0,13 g/L
Cs (t=0)	10 g/L

Assim, realizou-se um ensaio experimental com um período de batelada de 6 horas, tempo previsto pela simulação para esgotamento da glicose no meio. Iniciou-se, então, a alimentação com os parâmetros indicados na Tabela 4.6. A figura 4.22 mostra os resultados experimentais obtidos nesse ensaio, comparando-os com a simulação.

Observou-se um crescimento celular nas primeiras 4 horas de cultivo maior do que o previsto pela simulação, com alta velocidade de consumo de substrato, que se esgotou em 6 horas. Apesar disso, o comportamento qualitativo do sistema foi bem descrito pela simulação, principalmente tendo-se em conta o grande grau de simplificação do modelo utilizado.

Em 22 horas, ocorreu queda de energia, a qual afetou os sensores de oxigênio, o que não permitiu controle da concentração de oxigênio dissolvido por algum tempo. Devido à baixa solubilidade do oxigênio na água, é essencial a transferência contínua deste para o meio líquido de crescimento. Essa transferência se dá pela aeração do meio de cultura. Devido ao transtorno operacional, observa-se ter ocorrido queda na concentração celular nesse tempo de cultivo.

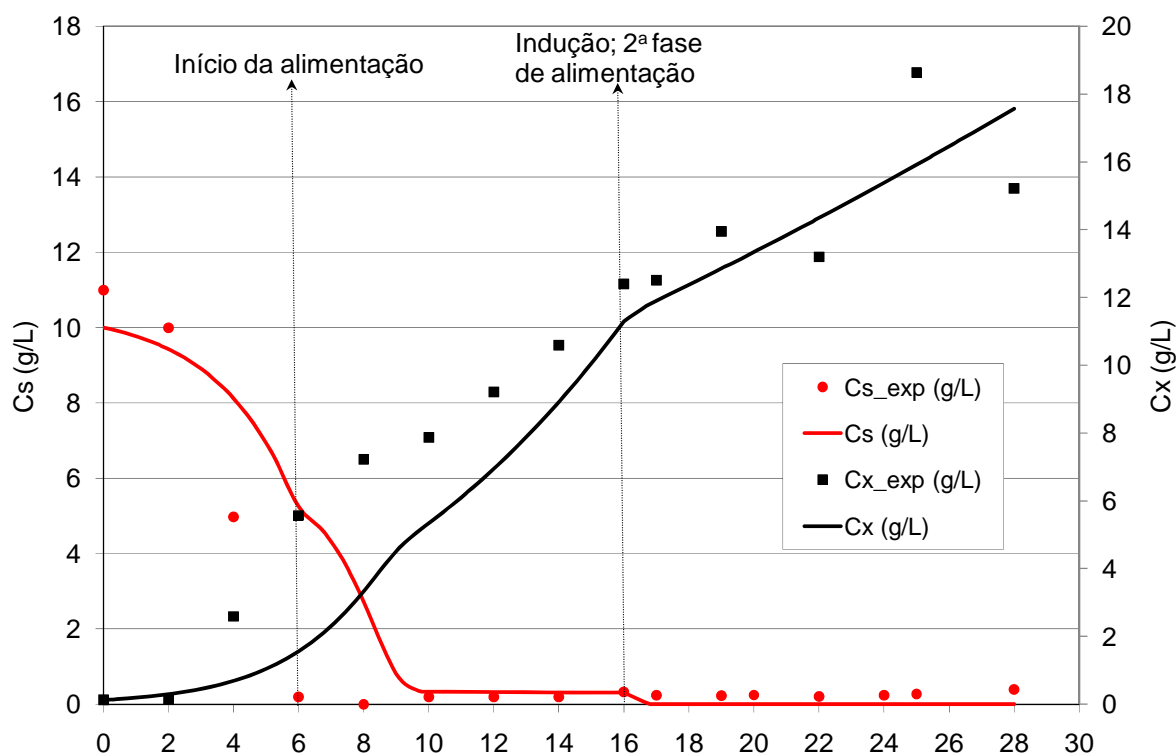


Figura 4.22 Concentração celular (C_x) e concentração de glicose (C_s) ao longo do tempo de cultivo de *E. coli* recombinante para expressão de BTL2 em ensaio em biorreator, com os parâmetros da Tabela 4.7. Valores experimentais e simulados.

Após 25 h de ensaio, atingiu-se concentração celular de 15,4 g/L. Em 28 h observa-se uma queda na massa celular, talvez reflexo de morte e lise, mas esse comportamento precisa ser confirmado por outros ensaios de maior duração.

Na figura 4.23 são apresentados os resultados de viabilidade celular (UFC/mL), realizado por meio de plaqueamento, os quais são comparados com os obtidos para concentração celular obtida por massa seca e com os de viabilidade obtidos pela sonda de permissividade (mA) que está sendo calibrada com diferentes condições de cultivo e microorganismos. O objetivo dessa sonda é o acompanhamento das células viáveis em tempo real. Pode-se observar que há muito ruído no começo, até o tempo de 7 h, onde ocorre ainda uma grande dispersão. Abstraindo-se dos ruídos, observa-se que os dados da sonda estão razoavelmente proporcionais aos obtidos pela curva de UFC e de crescimento celular em g/L de célula seca, embora, diferentemente do esperado, pareça acompanhar mais os de massa seca. O erro na determinação de UFC é grande e talvez isso explique esses resultados. Segundo a literatura, devido às altas temperaturas de choque térmico, o microorganismo

deveria apresentar uma grande queda nas células vivas por volume de caldo de cultivo após o choque. Contudo, isso não parece ter acontecido nesse ensaio, pois embora não haja dados da sonda após 19 horas devido a problemas de energia. Os dados de UFC parecem acompanhar os de massa seca.

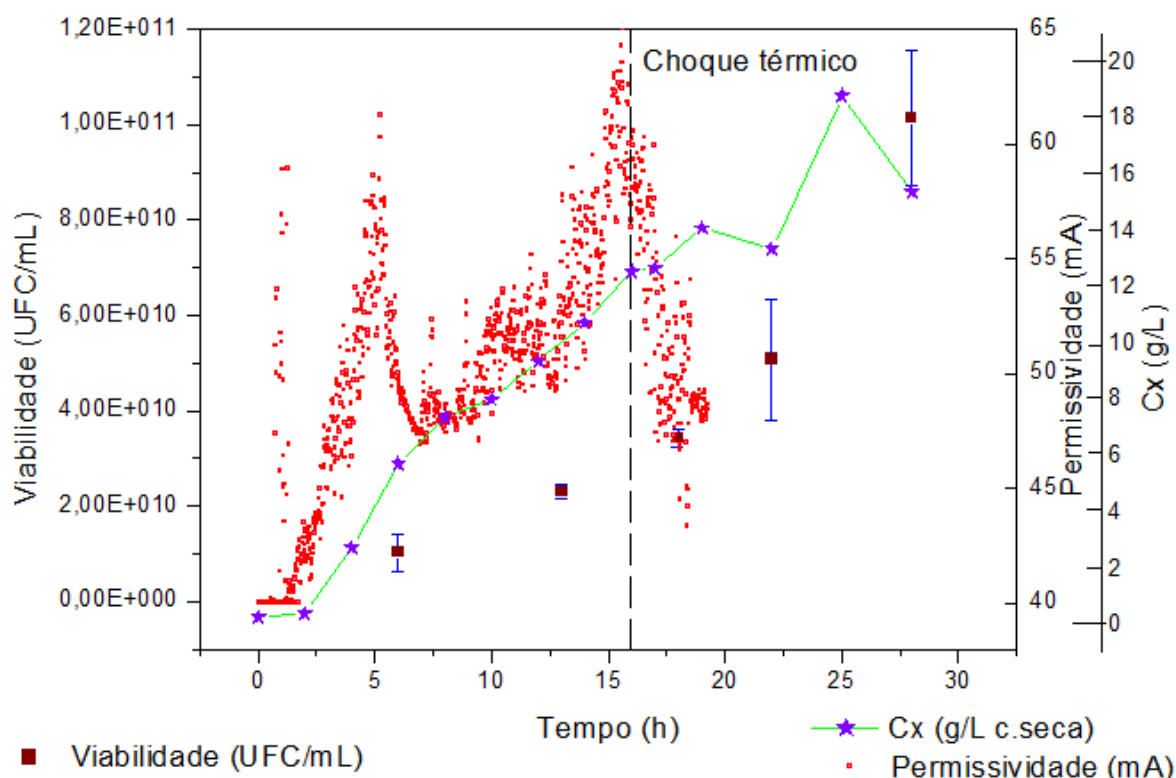


Figura 4.23 - Comparação entre dados de viabilidade celular obtidos por contagem de células em placas (UFC/mL) e a sonda de permissividade (mA) com os de concentração celular obtidos por massa seca (g cel.seca/L)

Na figura 4.24 são mostrados todos os resultados obtidos na fermentação. O processo de batelada alimentada atingiu o objetivo de aumento da concentração de microrganismo, com transformação de glicose em massa celular ao invés de ácidos orgânicos. Conforme pode ser observado na figura 4.23, as concentrações de ácido acético e outros ácidos orgânicos foram reduzidas ao máximo. Em 6 horas, obteve-se a maior quantidade de ácido acético no processo, 1,71 g/L, o qual já é uma baixa concentração de ácido acético comparado ao que foi produzido nos ensaios em frasco agitado, onde as eram em torno de 4 g/. Esses resultados confirmam a hipótese de que não estava ocorrendo oxigenação eficiente

nos cultivos em frascos. E, em um comportamento típico nesse tipo de cultivo, esses ácidos foram novamente metabolizados pelo microrganismo durante a batelada alimentada. térmico, mas sem acúmulo apreciável até o final do cultivo.

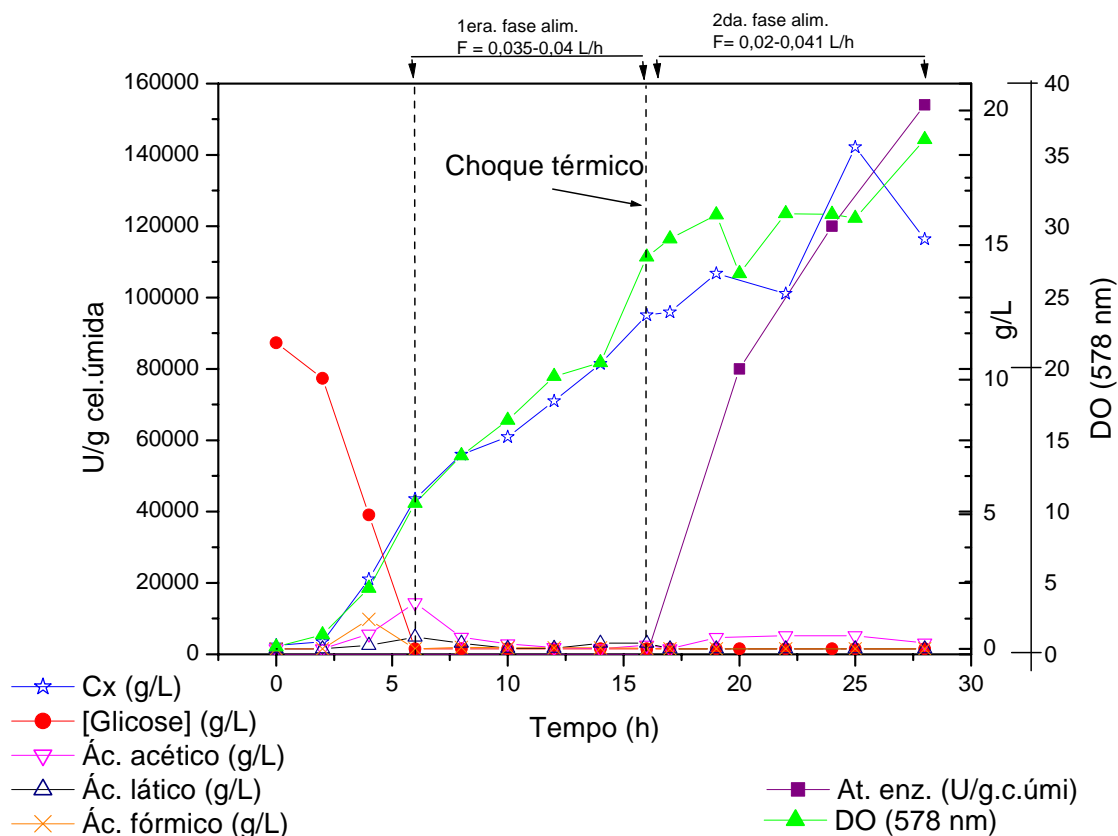


Figura 4.24 - Resultados do processo em batelada alimentada para *E. coli* recombinante com $T_{Cres} = 30^{\circ}C$ e $T_{Choque} = 45^{\circ}C$.

A atividade enzimática atinge níveis de expressão um pouco menores que os obtidos nos ensaios em frasco agitado, chegando a 230.000 U/g cel úmida. Contudo, uma vez que se atingiu concentração celular 25 vezes maior que a obtida no cultivo em frasco agitado, num volume quatro vezes maior, obteve-se no biorreator 100 vezes mais enzima que no cultivo em frasco. Evidentemente, o cultivo em biorreator pode ser ainda muito melhorado, pois estamos muito longe do limite de densidade celular no cultivo de *E.coli*. O mais importante, contudo, foi ter-se obtido níveis de expressão da enzima no biorreator similares aos obtidos no frasco, o que mostrou que, desde que se consiga aumentar a densidade celular, será possível aumento proporcional da quantidade de enzima expressada.

Na figura 4.25 se apresentam os valores de velocidade específica de crescimento (μ) atingidos durante a fermentação, obtendo-se μ_{\max} de $0,383 \text{ h}^{-1}$, valor esse próximo do reportado na literatura para *E. coli* recombinante, $0,38 \text{ h}^{-1}$ e 0,54% de oxigênio (De-León, 2003).

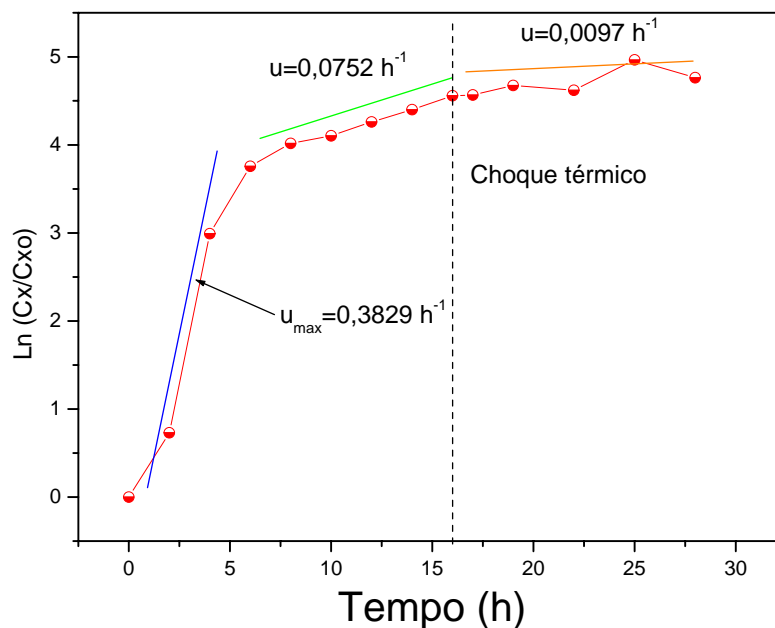


Figura 4.25 - Velocidades específicas de crescimento celular ao longo do cultivo de *E. coli* recombinante em biorreator.

Na figura 4.26 observa-se o consumo de todos os aminoácidos ao longo do cultivo, com uma mudança nesse padrão após o choque térmico. A partir do choque, nota-se que os aminoácidos que ainda não foram totalmente consumidos até esse momento, como lisina, valina, leucina e fenilalanina, deixam de ser consumidos, devido possivelmente ao crescimento celular quase nulo ($\mu=0,009\text{h}^{-1}$). Essa hipótese é reforçada pelo padrão de consumo que foi observado no cultivo em frascos agitados, onde havia baixo crescimento celular e apenas alguns aminoácidos eram consumidos. Possivelmente, os aminoácidos que não eram consumidos nos ensaios em frascos só importantes como fonte de nitrogênio para crescimento celular, não sendo necessários para produção de energia.

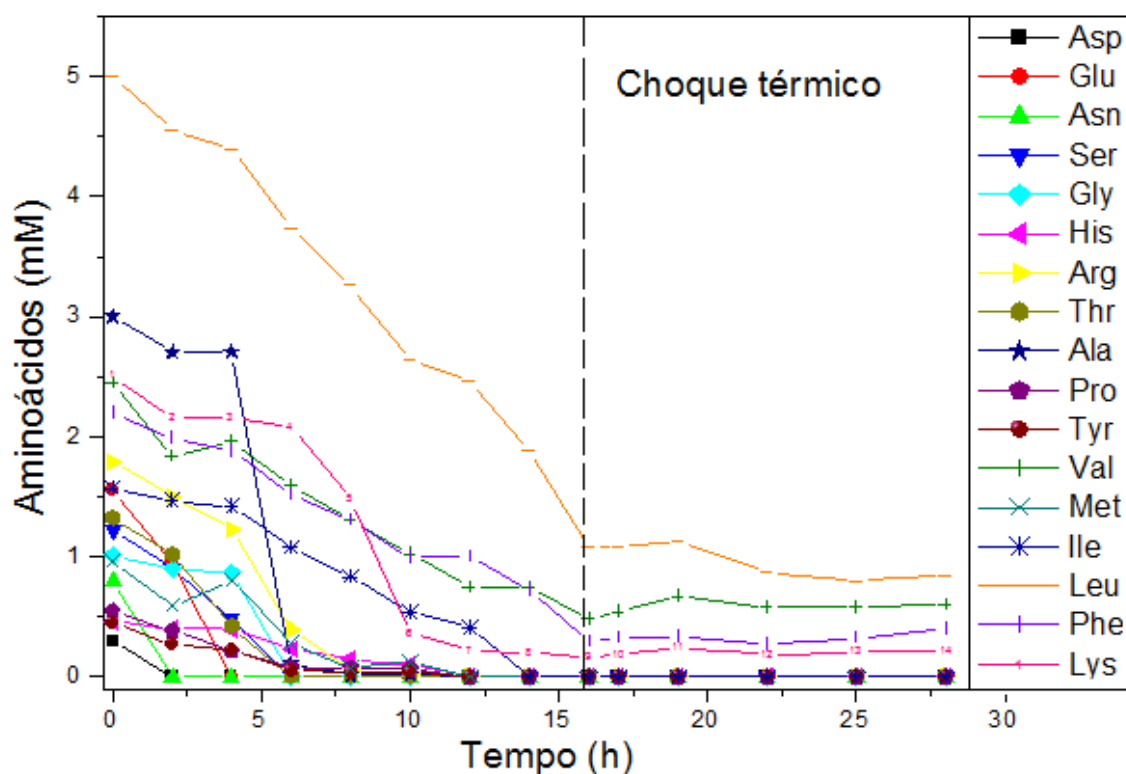


Figura 4.26 - Concentração de aminoácidos ao longo do tempo de cultivo de *E.coli* recombinante em biorreator.

4.4.1 Recuperação da enzima: sonicação x French Press

O rompimento celular até o momento vinha sendo realizado apenas por sonicação de amostras de 40 mL de caldo de cultivo, com concentração celular da ordem de 1 g/L, pois a sonda disponível era pequena. Contudo, a recuperação da enzima expressada em 2 L de caldo, com concentração celular de 15 g/L iria requerer métodos mais robustos. Assim, foi realizada uma ruptura celular por meio de French Press, obtendo-se atividade enzimática específica de 272.000 U/g cel úmida com p-NPP a 60°C. Na melhor condição de ensaio em frasco agitado, obteve-se por sonicação 230.000 U/g cel úmida. Uma possível explicação seria ocorrer maior perda de atividade enzimática durante ruptura (por aquecimento ou ação de proteases intracelulares) quando é utilizada sonicação para a lise celular. Contudo, é possível também que tenha ocorrido um rompimento mais eficiente com a prensa do que na sonicação.

Decidiu-se assim investigar se o protocolo que vinha sendo usado para a sonificação realmente estava liberando toda a enzima produzida intracelularmente. Foi

inicialmente realizada uma eletroforese de amostras do “pellet” e do clarificado após rompimento celular e centrifugação do lisado após um ciclo de sonicação, segundo protocolo utilizado até agora. A figura 4.26 mostra os resultados obtidos.

Como se observa na figura 4.27 a lipase BTL2 é a única enzima solúvel (presente no sobranante) na faixa de 94,0-14,4 kDa. Note-se que nos corpos de inclusão que estão contidos no pellet após ruptura celular, ainda tem lipase BTL2. O que pode significar que o processo de ruptura está sendo ineficiente. A partir deste resultado decidiu-se estudar o processo de ruptura, submetendo amostra de 40 mL de caldo contendo 1 g/L de célula seca a sucessivos ciclos de sonicação.

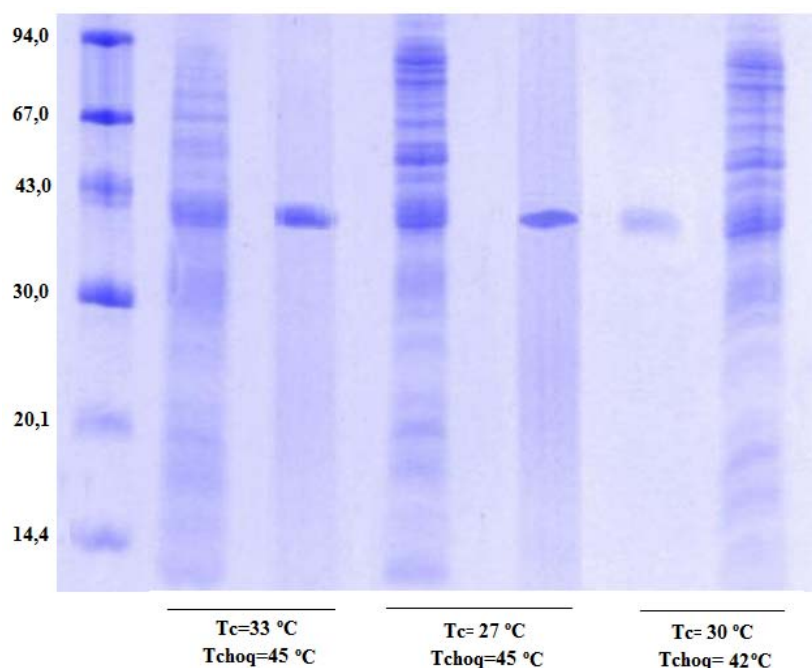


Figura 4.27 - Lipase BTL2 de *E. coli* recombinante no pellet e no clarificado após ruptura celular e centrifugação para diferentes temperaturas de crescimento e indução.

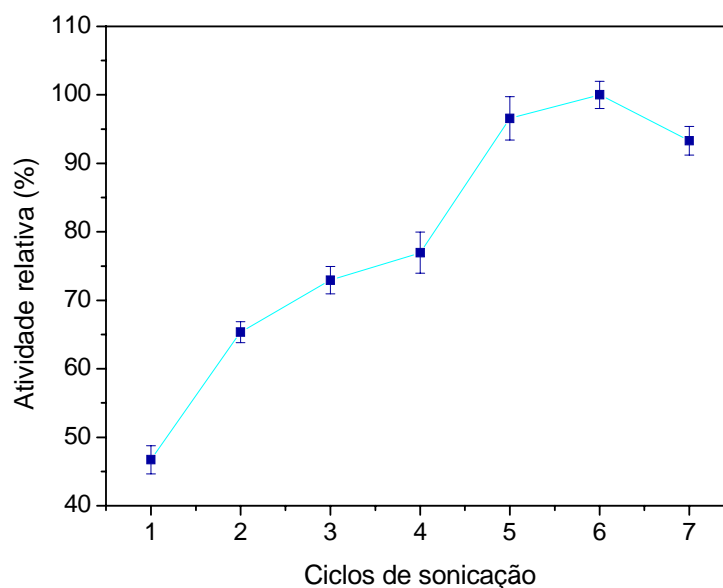


Figura 4.28 - Ciclos de ruptura celular

A partir dos resultados mostrados na figura 4.28, observa-se que realmente o uso de apenas um ciclo somente liberou cerca de 50% da enzima produzida, sendo que a máxima quantidade de enzima ativa é obtida somente após 6 ciclos sucessivos de sonicação. Esse resultado indica que a atividade real obtida foi de 460.000 U/g cel úmida no biorreator e uma atividade de 516.000 U/g cel úmida em frasco agitado.

4.5 Caracterização cinética de BTL2

4.5.1 Influência da temperatura na atividade de BTL2

A figura 4.29 mostra que a temperatura de máxima atividade enzimática é para temperaturas de 65°C o qual concorda com o mostrado na literatura por Schmidt-Dannert, 1996. A energia de ativação, calculada pelo gráfico de Arrhenius, foi 142,3 kJ/mol, um valor similar ao obtido para lipase produzida pelo *Bacillus megaterium*, 198,5 kJ/mol (Lima, 2004).

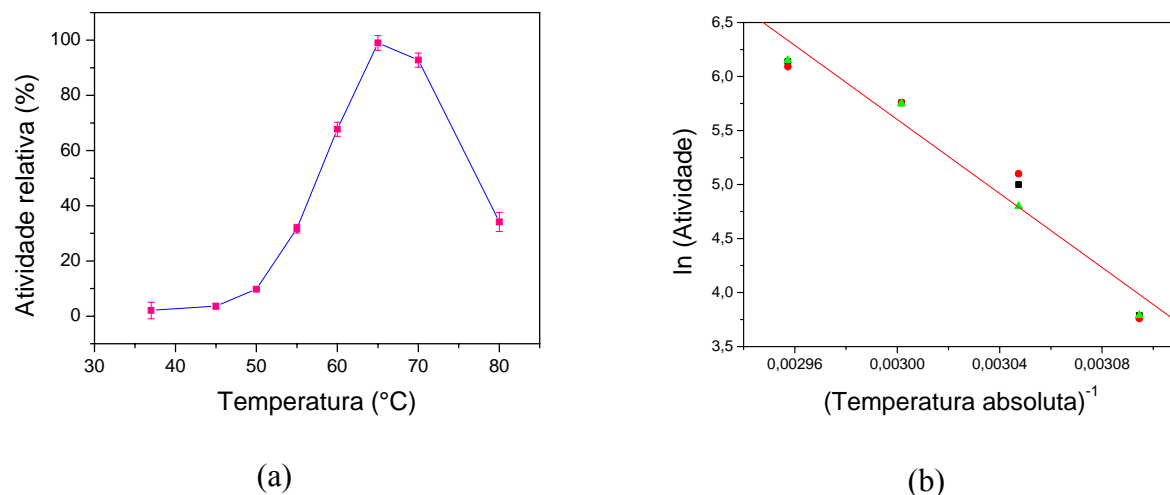


Figura 4.29 - (a) Efeito da temperatura na atividade da lipase BTL2. Condições do ensaio: 40-80°C, tampão fosfato 0,1 M, pH 8, p-NPP 0,03 mg/mL. (b) Gráfico de Arrhenius.

O uso de co-solventes nas soluções contendo lípases é importante para evitar agregação da enzima, pois embora seja solúvel essa proteína tem grande afinidade por substratos hidrofóbicos. Essa especificidade implica presença de largos trechos de superfície da enzima também de natureza hidrofóbica para permitir a formação do complexo enzima-substrato. Em meio aquoso é comum a tendência de moléculas de enzima se unirem por esses trechos, o que pode impedir a ligação do substrato, resultando em perda de atividade enzimática. Contudo, embora evite a agregação, a conservação da enzima na presença desse solvente pode levar a perda de atividade. Resultados reportados na literatura indicam que a presença de 2-propanol na solução enzimática evita que a enzima se agregue, permanecendo na forma monomérica ativa. Decidiu-se assim investigar a estabilidade de BTL2 na presença de 2-propanol. A figura 4.29 mostra os resultados obtidos.

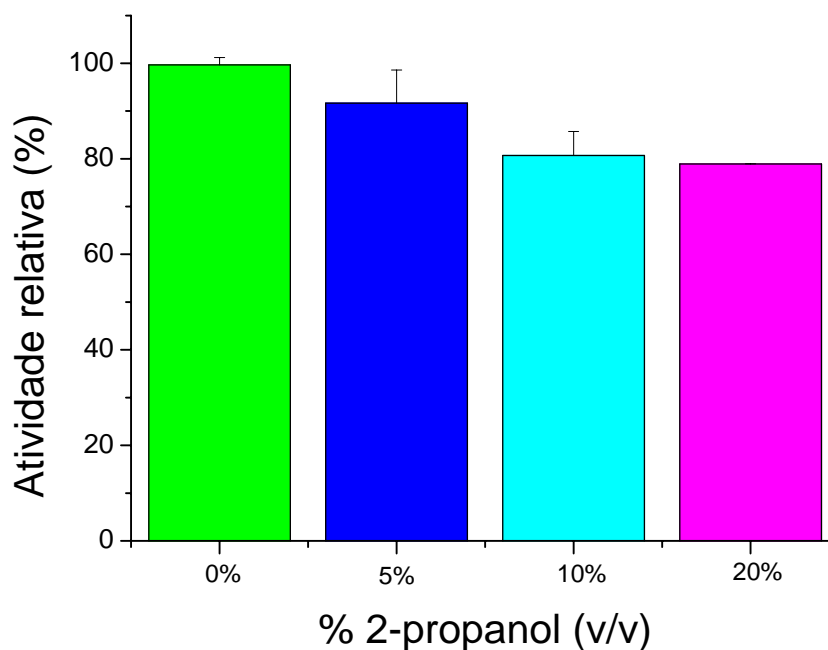


Figura 4.30 - Estabilidade da lipase BTL2 com diferentes concentrações de 2-propanol ((1)-0%, (2)-5%, (3)-10%, (4)-20% de 2-propanol (v/v)).

As atividades residuais de BTL2 na presença de diferentes concentrações desse solvente, mostradas na figura 4.30, indicam que a enzima tem boa estabilidade na presença de diferentes concentrações de 2-propanol, confirmando-se resultados relatados por Schlieben *et al*, 2004.

5 CONCLUSÕES

Investigou-se, inicialmente, neste trabalho, a influência de diferentes variáveis no crescimento celular e na expressão da lipase BTL2 por *E.coli* recombinante, através de experimentos realizados em frascos agitados, com meio LB.

5.1 Primeiramente, estudou-se a influência da temperatura de crescimento (entre 27°C e 34,2°C) e da temperatura de choque térmico (entre 37,8°C e 46,2°C) na expressão de BTL2 por *E.coli* recombinante, usando planejamento estatístico de experimentos. Os resultados desse estudo, onde o choque era realizado no início da fase exponencial, indicaram como as melhores temperaturas $T_c=27^\circ\text{C}$ e $T_{\text{choque}}=45^\circ\text{C}$, obtendo-se concentração celular de 0,6 g massa seca/L e atividade enzimática de 230.000U/gcél.úmida.

5.2 A seguir, foi investigada a influência da fase de crescimento do microrganismo no momento do choque, através de cultivos com $T_c=27^\circ\text{C}$ e $T_{\text{choque}}=45^\circ\text{C}$, com o choque ocorrendo no início da fase exponencial, no final da fase exponencial e na fase estacionária. Os resultados desses experimentos indicaram como melhor condição choque térmico no final da fase exponencial, obtendo-se nessa condição atividade de BTL2 de 258.000 U/gcél. Úmida. Foi também quantificado o consumo de aminoácidos nesses ensaios, verificando-se que havia consumo de apenas quatro aminoácidos: Asp, Glu, Ser e Thr.

5.3 A próxima variável estudada foi a presença de glicose no meio. Investigou-se assim a influência de diferentes concentrações iniciais de glicose no meio de cultivo no crescimento celular e expressão da enzima. Os melhores resultados de massa celular foram obtidos com 10g/L de glicose, obtendo-se 1,2 g/L de massa seca, $\mu_{\text{max}} = 0,162 \text{ h}^{-1}$, $Y_{x/s}=0,185 \text{ g/g}$ e atividade enzimática em torno de 258.000 U/gcél, úmida. Concentrações de glicose menores e maiores conduziram a menores concentrações celulares, mas não influenciaram na atividade enzimática final. Na presença de glicose, observou-se produção de ácidos orgânicos, sendo que a produção de ácido acético (o mais produzido)

passou de 0,6g/L a 3,2g/L, 3,5 g/L e 3,94 g/L, para 5, 10 e 20g/L de glicose, respectivamente.

5.4 Baseando-se em cultivos anteriores de *E.coli* foram realizadas simulações para cálculo de alimentação de meio em ensaio em batelada alimentada. O ensaio experimental foi realizado com 10g/L de glicose no início do cultivo, $T_c=30^\circ\text{C}$, $T_{\text{choque}} 45^\circ\text{C}$. Nesse ensaio, conseguiu-se atingir 15 g/L de massa seca, com $\mu_{\text{max}} = 0,38 \text{ h}^{-1}$ e com atividade enzimática de 230.000U/gcel.úmida, obtendo-se 100 vezes mais enzima nesse ensaio do que no cultivo em frasco agitado na melhor condição. Os resultados da simulação, obtidos usando modelo de Monod, previram bastante bem os obtidos experimentalmente. Não se observou acúmulo significativo de ácidos orgânicos e todos os aminoácidos eram consumidos até o momento do choque. A partir do choque térmico, aqueles que não estavam esgotados permaneceram com concentração constante.

5.5 A enzima produzida no ensaio em batelada foi recuperada rompendo-se as células em uma prensa francesa, obtendo-se com essa metodologia 272.000 U/g cel úmida, enquanto que os resultados das amostras, que eram rompidas por sonicação resultaram em valor muito menor. Investigou-se então a eficiência do protocolo de sonicação que vinha sendo utilizado, submetendo-se as células a sucessivos ciclos de sonicação. Os resultados mostraram que realmente no primeiro ciclo apenas 50% da enzima era liberada, o que indica que a máxima produção obtida estava na verdade em torno de 460.000U/gcél.úmida.

5.6 Estudo de caracterização cinética da enzima mostrou que a temperatura de máxima atividade é 65°C , com energia de ativação igual a 142,3 kJ/mol. Estudo de estabilidade em solvente mostrou que a enzima mantém atividade na presença de 2-propanol.

6 REFERÊNCIAS

- ARPIGNY JL e JAEGER KE. Bacterial lipolytic enzymes: Classification and properties. **Biochem J.** v.343, p.177-183, 1999.
- BANEYX F, Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current opinion in biotechnology**, v.10, p.411-421, 1999.
- BARON, A.M. Biocatálise em ambientes aquo-restritos: comparação de diferentes sistemas reacionais. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, 2003.
- BAUER S, SHILOACH J. Maximal exponential growth rate and yield of E coli obtainable in a bench-scale fermentor. **Biotechnol Bioeng.** v.16, p. 933– 41, 1974.
- BAUER S, ZIV E. Dense growth of aerobic bacteria in a bench-scale fermentor. **Biotechnol Bioeng.** v.18, p.81– 94, 1975.
- BORNSCHEUER UT. Lípase-catalyzed syntheses of monoacylglycerols. **Enzyme and microbial technology.** v.17, p.578-586, 1995.
- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for a quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- CAMMAROTA, M.C.; TEIXEIRA, G.A.; FREIRE, D.M.G. Enzymatic prehydrolysis and anaerobic degradation of wastewaters with fat contents. **Biotechnol. Lett.**, v. 23, p. 1591-1595, 2001.
- CARRASCO-LÓPEZ C, GODOY C, DE LAS RIVAS B, FERNÁNDEZ-LORENTE G, PALOMO JM, GUISÁN JM, FERNÁNDEZ-LAFUENTE R, MARTÍNEZ-RIPOLL M, HERMOSO JA. Activation of bacterial thermoalkalophilic lípases is spurred by dramatic structural rearrangements. **The journal of biological chemistry.** v.284, p4365-4372, 2009.
- CASPETA L, FLORES N, PEREZ NO, BOLIVAR F, RAMIREZ OT. The effect of heating rate on *Escherichia coli* metabolism, physiological stress, transcriptional response and production of temperature-induced recombinant protein: A scale-down study. **Biotechnology and bioengineering.** v.102, p.468-482, 2009.
- CASTILLO, I. D. S. Cultivo de *Escherichia Coli* Recombinante: Desenvolvimento de Estratégia Para O Crescimento e Indução À Síntese de Troponinac. Dissertação

- (Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica) - Universidade de São Paulo, 1997.
- COCA J, HERNÁNDEZ O, BERRIO R, MARTÍNEZ S, DÍAZ E, DUSTET JC. Producción y caracterización de *Aspergillus niger* y *A. fumigatus*. **Biotecnología aplicada**. v.18, p.216-220, 2001.
- DE LEON, A. R.; GARCIA, B., BARBA DE LA ROSA; A. P., VILLASEÑOR, F., ESTRADA, A., LOPEZ, R. Periplasmic Penicillin G Acylase Activity In Recombinant *Escherichia Coli* Cells Permeabilized With Organic Solvents. **Process Biochemistry**, vol. 39, p. 301-305, 2003.
- DEMIRJIAN DC, MORÍS-VARAS F, CASSIDY C. Enzymes from extremophiles. **Current opinion in chemical biology**. v.5, p.144-151, 2001.
- ERTURUL S., DÖNMEZ G, TAKAÇ. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of hazard materials**, v. 149 p.720-724, 2007.
- FERNANDES M.L.M. Produção de Lípases por Fermentação no Estado Sólido e sua Utilização em Biocatalise. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Paraná, 2007.
- GUPTA R, GUPTA N, RATHI P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.64, p.763-781, 2004.
- HEITZER A., MASON C.A., HAMER G. Heat shock gene expression in continuous cultures of *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**. v.22, p.153-169, 1992
- HERBERT D, PHIPPS PJ, TEMPEST DW. The chemostat: design and instrumentation. **Lab Pract** ; v.14 p.1150– 61, 1965.
- HOLMS W.H., EL-MANSI E.M. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. **J. Gen. Microbiol**. v.11, p.2875-2883, 1988.
- HORTA, A.C.L. Técnicas Computacionais Inteligentes para a Inferência de Estado e a Otimização de Cultivos de *Streptococcus pneumoniae*. Dissertação (Mestrado em biotecnologia) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.
- JAEGER, K.E., DIJKSTRA, B.W., REETZ, M. T. Bacterial Biocatalist: molecular biology, three dimensional structures and biotechnological applications os lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315-351, 1999.
- JAEGER K.E., EGGERT T. Lipases for biotechnology. **Current opinion in biotechnology**. v.13, p.390-397, 2002.

- JAEGER, K.E.; RANSACK, S.; KOCH, H. B.; FERRATO, F.; DIJKSTRA, B.W. Bacterial lipases. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.15, p. 29-63, 1994.
- JAEGER K.E. & REETZ M.T., Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **TIBTECH**, v.16, p.396-403, 1998.
- JAEGER K.E., SCHNEIDINGER B., ROSENAU F., WERNER M., LANG D., DIJKSTRA B.W., SCHIMOSSEK K., ZONTA A., REETZ M.T. Bacterial lipases for biotechnological applications. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**. v.3, p.3-12, 1997.
- KADEMI, A.; AÏT-ABDELKADER, N.; FAKHREDDINE, L.; BARATTI, J.C. Characterization of a new thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium *Bacillus circulans*. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v. 10, p. 395-401, 2000.
- KAMBOUROVA, M.; KIRILOVA, N.; MANDEVA, R., DEREKOVA, A. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC 7. **J. Mol. Catal. B: Enzymatic**, v.22, p. 307-313, 2003.
- KARJIBAN RA, BASYARUDDIN M, RAHMAN A, BASRI M, SALLEH AB, JACOBS D, WAHAB HA. Molecular dynamics study of the structure, flexibility and dynamics of thermostable L1 lipase at high temperatures. **Protein J.** v 28, p.14-23, 2009.
- KIM, H.K.; SUNG, M.H.; KIM, H.M.; OH, T.K. Occurrence of thermostable lipase in thermophilic *Bacillus* sp. strain 398. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v.58, p. 961-962, 1994.
- KIM, HK; CHOI, HJ; KIM, MH; SOHN, CB; OH, TK. Expression and characterization of Ca²⁺-independent lipase from *Bacillus pumilus* B26. **Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Biol. Lipids**, v. 1583, p. 205 – 212, 2002.
- KIM, M.H., KIM., H.K., LEE, J.K., PARK, S.Y., OH, T.K. Themostable lipase of *Bacillus stearothermophilus*: high-level production, purification, and calcium dependent thermostability. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 64, n. 2, p. 280-286, 2000.
- KUMAR P.K.P, MASHKE H.E., FRIEHS K., SCHUGERL K., Strategies for improving plasmid stability in genetically modified bacteria in bioreactors. **Tibtech**, v.9, p.279-284, 1991.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEE, D.W.; KOH, Y.S.; KIM, K.J.; KIM, B.C.; CHOI, H.J.; KIM, D.S.; SUHARTONO, M.T.; PYUN, Y.R. Isolation and characterization of a thermophilic lipase from *Bacillus thermoleovorans* ID-1. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 179, p. 393-400, 1999.
- LEE SY. High cell density culture of *Escherichia coli*. **TIBTECH** v.14, p. 98-105,1996.

- LEOW T.C., RAHMAN R.N.Z.R.A., BASRI M., SALLEH A.B. A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp T1. **Extremophiles**. v.11, p.527-535, 2007.
- LESUISSE, E.; SCHANK, K.; COLSON, C. Purification and preliminary characterization of the extracellular lipase of *Bacillus subtilis* 168, an extremely basic pH-tolerant enzyme. **Eur. J. Biochem.**, v. 216, p.155-160, 1993.
- LI H., ZHANG X. Characterization of thermostable lipase from thermophilic *Geobacillus* sp. TW1. **Protein expression and purification**. v. 42, p.153-159, 2005.
- LIMA, W.J.M. Produção de proteínas recombinantes utilizando *Escherichia coli* em cultivos em alta densidade celular. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade estadual de Campinas, 2004.
- LIMA, V.M.G. Produção e Purificação de *Bacillus megaterium* CCOC-P2637 e sua Aplicação em Biocálise em Solventes Orgânicos. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal do Paraná, 2004.
- LIMA VMG, KRIEGER N, MITCHELL DA, FONTANA JD. Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. **Biochemical Engineering Journal**. v.18, p.65-71, 2004.
- LIN H, Cellular responses to the induction of recombinant genes in *Escherichia coli* fed-batches cultures. Tese (Doutorado) – Martin-Luther Universität, 2000.
- LOTFY WA, Production of a thermostable uricase by a novel *Bacillus thermocatenuatus* strain. **Bioresource technology**. v.99, p.699-702, 2008
- MARTIN J.R., NUS M., GAGO J.V.C., SANCHEZ-MONTERO J.M. Selective esterification of phthalic acids in two ionic liquids at high temperatures using a thermostable lipase of *Bacillus thermocatenuatus*: A comparative study. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**. v.52-53, p.162-167, 2008.
- MAQBOOL QA, JOHRI S, VERMA L, RIYAZ-UL-HASSAN S, VERMA V, KOUL S, TANEJA SC, PARSHAD R, QAZI GN. Purification and characterization of a novel enantioselective hydrolase from *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and applied biochemistry**. v.36, p.227-234, 2002.
- NAMBOODIRI, V.M.H.; CHATTOPADHYAYA, R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. **Lipids**, v. 35, p. 495 - 502, 2000.
- NIELSEN J, VILLADSEN J, LIDÉN G, **Bioreaction Engineering Principles**, 2nd Ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2003.
- NTHANGENI, M.B.; PATTERTON, H.G.; TONDER, A.; VERGEER, W.P.; LITTHAUER, D. Over-expression and properties of a purified recombinant *Bacillus licheniformis*

- lipase: a comparative report on *Bacillus* lipases. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 28, p. 705-712, 2001.
- OGINO, H. NAKAGAWA, S.; SHINYA, K.; MUTO, T.; FUGIMURA, N.; YASUDA, M.; ISHIKAWA, H. Purification and characterization of organic solvent stable lipase from organic solvent tolerant *Pseudomonas aeruginosa* LST-03. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 89, p. 451-457, 2000.
- OLEMPSKA-BEER Z.S. □, MERKER R.I., DITTO M.D., DINOVI M.J. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms—a review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v.45, p.144-158, 2006.
- PALOMO JM, FERNÁNDEZ-LORENTE G, RUA ML, GUISÁN JM, FERNANDEZ-LAFUENTE R. Evaluation of the lipase from *Bacillus thermocatenulatus* as an enantioselective biocatalyst. **Tetrahedron: Asymmetry**. v.14, p.3679-3687, 2003.
- PALOMO JM, ORTIZ C, FERNÁNDEZ-LORENTE G, FUENTES M, GUISÁN JM, FERNANDEZ-LAFUENTE. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. **Journal of chromatography**. v.1038, p.267-273, 2004.
- PALOMO JM, ORTIZ C, FERNÁNDEZ-LORENTE G, FUENTES M, GUISÁN JM, FERNANDEZ-LAFUENTE. Lípase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and microbial technology**. v.36, p.447-454, 2005.
- PAQUES FW, MACEDO GA. Lipases de latex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. **Química nova**, v.29, n.1, p.93-99, 2006.
- PENCREAC'H, G.; LEULIER, M.; BARATTI, J.C. Properties of free and immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia*. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 56, p.181-189, 1997.
- PENCREAC'H, J.; BARATTI, J.C. Comparison of hydrolytic activity in water and heptane for thirty-two commercial lipase preparations. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 28, p. 473 - 479, 2001.
- POUDEROYEN, G.; EGGERT, T.; JAEGER, K.E.; DIJKSTRA B.W. The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal a/b Hydrolase Fold Enzyme. **J. Mol. Biol.**, v. 309, p. 215 - 226, 2001.
- QUYEN DT, SCHMIDT-DANNERT C, SCHMID RD. High-level expression of a lipase from *Bacillus thermocatenulatus* BTL2 in *Pichia pastoris* and some properties of the recombinant lipase. **Protein Expression and Purification**. v.28, p.102-110, 2003.
- RODRIGUES M.I., IEMMA A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Casa de Pão Editora, 2005

- RUA M.L., ATOMI H., SCHMIDT-DANNERT C. High-level expression of the thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus* in *Escherichia coli*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.49, p.405-410, 1998.
- RUA ML, SCHMIDT-DANNERT C, WAHL S, SPRAUER A, SCHMID RD. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. Large scale production, purification and properties: Aggregation behaviour and its effect on activity. **Journal of biotechnology**. v.56, p. 89-102, 1997.
- RUIZ, C., BLANCO, A., PASTOR, J., DIAZ, P. Analysis of *Bacillus megaterium* lipolytic system and cloning of Lip A, a novel subfamily I.4 bacterial lipase. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 217, p. 263 - 267, 2002.
- RUIZ, C.; JAVIER PASTOR, F.I.; DIAZ, P. Isolation and characterization of *Bacillus* sp. BP-6 LipA, a ubiquitous lipase among mesophilic *Bacillus* species. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 37, p.354–359, 2003.
- SARDA, L. E DESNUELLE, P. Action de la lipase pancréatique sur les esteres en emulsion. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 30, p. 513 - 521, 1958.
- SAWERS G. & JARSCH M. Alternative regulation principles for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Ann N.Y. Acad. Sci.**, v.721, p.257-267, 1996.
- SCHLIEBEN NH, NIEFIND K, SCHOMBURG D. Expression, purification and aggregation studies of His-tagged thermoalkalophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. **Protein expression and purification**. v. 34, p. 103-110, 2004.
- SCHMIDT-DANNERT C. Recombinant microbial lipases for biotechnology applications. **Bioorganic & medicinal chemistry**. V.7, p 2123-2130, 1999.
- SCHMIDT-DANNERT C, PLEISS J, SCHMID RD. A toolbox of recombinant lipases for industrial applications. **Annals of the New York academy of sciences**. v.864, p.14-22, 1998.
- SCHMIDT-DANNERT C, RUA ML, ATOMI H, SCHMID RD. Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenulatus*. I. Molecular cloning, nucleotide sequence, purification and some properties. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1301, p.105-114, 1996.
- SCHMIDT-DANNERT C, RUA ML, SCHMID RD. Two novel lipases from thermophile *Bacillus thermocatenulatus*: Screening, purification, cloning, overexpression and properties. **Methods enzymol**. v. 284, p. 194-220. 1997
- SCHMIDT-DANNERT C, SZTAJER H, STÖCKLEIN W, MENGE U, SCHMID RD. Screening, purification and properties of a thermophilic lipase from *Bacillus thermocatenulatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1214, p.43-53, 1994.

- SHILOACH J, BAUER S. High yield growth of *E coli* at different temperatures in a bench scale fermentor. **Biotechnol. Bioeng** v.17, p. 227– 39, 1975.
- SHILOACH,J., FASS,R. -Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development - **Biotechnology advances**, v. 23, p. 345-357, 2005
- SHIMIZU N., FUKUSONO S., FUJIMORI K., NISHIMURA N., ODAWARA Y., Fed-batch cultures in recombinant *Escherichia coli* with inhibitory substance concentration monitoring. **J. ferm. Technol.**, v.66, p.187-191, 1988.
- SUMMERS D.K., Kinetics of plasmid loss. **Tibtech**, v.9, p.273-278, 1991.
- SEEGER A., SCHNEPPE B., MCCARTHY J, DECKWER W., RINAS U. Comparison of temperature- and isopropyl- β -D -thiogalacto-pyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. **Enzyme microb. Technol.**, v.10, p.947-953, 1995.
- SUÁREZ DC, KILIKIAN BV. Acid acetic accumulation in aerobic growth of recombinant *E. coli*. **Process Biochemistry** v. 35, p. 1051-1055, 2000.
- SUGIHARA, A.; TANI, T.; TOMINAGA, Y. Purification and characterization of a novel thermostable lipase from *Bacillus* sp. **J. Biochem.**, v. 109, p. 211 - 216, 1991.
- SWARTZ J.R., *Escherichia coli* recombinant DNA technology. In *Escherichia coli* and salmonella: cellular and molecular biology. **ASM press**, p.1693-1711, 1996.
- VAN DE WALLE M. & SHILOACH J. Proposed mechanism of acetate accumulation in two recombinant *Escherichia coli* strains during high density fermentation. **Biotechnology and bioengineering**, v.57(1), p.71-78, 1998.
- VICENTE M., CHATER K.F., DE LORENZO V. Bacterial transcription factors involved in global regulation. **Mol microbiol.** v.33, p.8-17, 1999.
- VILLAVERDE A., BENITO A., VIAPLANA E., CUBARSI R. Fine regulation of cI857-controlled gene expression in continuous culture of recombinant *Escherichia coli* by temperature. **Applied and environmental microbiology**. v.59, p.3485-3487, 1993.
- WATSON J.D. Molecular biology of the gene. Segunda edição. Philadelphia, PA:Saunders, 1972.
- WEICKERT MJ, DOHERTY DH, BEST EA, OLINS PO. Optimization of heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Current opinion in biotechnology**. v.7, p.494-499, 1996.

-
- WINKLER UK e STUCKMANN M. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v.138, p.663-670, 1979.
- YAMAMORI T & YURA T. Temperature-induced synthesis of specific proteins in *Escherichia coli*: Evidence for transcriptional control. **Journal of bacteriology**. v.142, p.843-851, 1980.
- ZABRISKIE DW e ARCURI EJ. Factors influencing productivity of fermentations employing recombinant microorganisms. **Enzyme Microb. Technol.** v.8, p.706-717, 1986.
- ZHANG, J. AND GREASHAM, R. Chemically defined media for commercial fermentations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v.51, p. 407-421, 1999.