

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE  
PENICILINA G ACILASE**

LAURA MARINA PINOTTI

SÃO CARLOS - SP  
2003

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

## **PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PENICILINA G ACILASE**

Laura Marina Pinotti  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel de Lima Camargo Giordano

Tese de doutorado 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 Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

São Carlos  
2003

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

P657pp

Pinotti, Laura Marina.

Produção e purificação de penicilina G acilase / Laura Marina Pinotti . -- São Carlos : UFSCar, 2003.  
270 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

1. Tecnologia de enzimas. 2. Penicilina G acilase – fermentação. 3. Penicilina G acilase – purificação. 4. Bacillus megaterium. 5. Escherichia coli. I. Título.

CDD: 660.634 (20<sup>a</sup>)

“Os pescadores sabem que o mar é perigoso  
e a tormenta, terrível. Mas este conhecimento não os  
impede de fazer-se ao mar.”

Vincent Van Gogh

Dedico este trabalho aos meus pais, Danilo e Leonilda, e a minha irmã Méri por todo o apoio e incentivo durante todos esses anos.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE LAURA MARINA PINOTTI, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO CARLOS, EM 26 DE JUNHO DE 2003.

BANCA EXAMINADORA:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Raquel de Lima Camargo Giordano  
(Orientadora, PPG- EQ/UFSCar)

Prof. Dr. Carlos Osamu Hokka  
(PPG-EQ/UFSCar)

Prof. Dr. Alfredo Eduardo Maiorano  
(IPT)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Telma Teixeira Franco  
(FEQ-Unicamp)

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo  
(DCF/UFSCar)

## AGRADECIMENTOS

Ao final deste trabalho quero agradecer a todas as pessoas que foram essenciais na realização deste, em especial à minha família, que fizeram tudo para que eu chegasse até aqui.

À minha orientadora Raquel de Lima Camargo Giordano pela enorme ajuda tanto científica como pessoal, incentivo, dedicação e orientação.

Aos professores Roberto de Campos Giordano, Carlos Osamu Hokka e Teresa Zangirolami pelas sugestões apresentadas.

Aos professores Heloísa Selistre de Araújo, Luis Fonseca e Miguel Prazeres pela orientação e oportunidade de realização de estágio em seus departamentos.

Aos amigos de trabalho, Paulinho, Rosi, Andréa, Anny, Adriano, Vanessa, Kamilla, Juliana, Grezielly, Tony, Edson, Marcelo e Angélica que foram colegas e amigos ao longo de todos esses anos.

Aos queridos amigos Guto, Sidão, Denise, Fernando, Sarah, Romilda, Juan, Carlos, Karina, Érica, Fábio, Rafael e João pela amizade, carinho, compreensão e companheirismo.

Ao meu querido Andy, que há tão pouco eu conheço, mas que já foi o suficiente para me transmitir muito amor, carinho e ajuda.

À todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho.

À Fapesp pelo apoio financeiro.

Recebam todos o meu mais profundo afeto

Obrigada.

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo principal estudar o processo de produção e purificação de PGA de *B. megaterium*. A produção foi estudada em frascos agitados e/ou fermentador, abordando-se os seguintes aspectos: estudo da pureza da cultura, padronização e conservação do inóculo, otimização do tempo total de cultivo (germinação/propagação e produção), volume do inóculo, requerimentos nutricionais do *B. megaterium* para a produção da enzima, pH, concentração de oxigênio dissolvido e modo de alimentação. A partir desses ensaios concluiu-se que a conservação do microrganismo em criotubos, na presença de glicerol, mostrou ser eficiente. Tempo de germinação de 11 horas e 24 horas na etapa de produção são os suficientes para atingir máxima produção da enzima. Quanto ao volume de inóculo, 3 mL de inóculo/75 mL de meio ( $10^8$  esporos/mL de inóculo), em frascos de 500 mL, foram as condições ótimas encontradas para produção deste. Diferentes fontes de carbono e nitrogênio foram estudadas e verificou-se que glicose, glicerol e concentrações de aminoácidos acima de 10,0 g/L reprimem a síntese da enzima e que a maior produção de PGA por *B. megaterium* ocorre quando o microrganismo cresce consumindo aminoácidos livres, ácido fenil acético (indutor), na presença de algum fator presente no soro de queijo. Os diferentes componentes do soro de queijo foram investigados e verificou-se que nenhum dos macronutrientes é o responsável pelo significativo efeito do soro na produção da enzima. Este trabalho permitiu o aumento das atividades enzimáticas de 56 UI/L e 8,6 UI/g célula, obtidas no primeiro ensaio realizado com o inóculo padronizado, para 220 UI/L e 65 UI/g célula com as seguintes condições: 10 g/L de aminoácidos, 19,6 g/L de soro de queijo, 0,4 g/L de sais, 2,7 g/L de ácido fenil acético (AFA), pH inicial 8,0, ausência de controle de pH, adição de AFA no início do cultivo e controle de oxigênio dissolvido próximo de 20% da saturação.

Foi também realizado, durante estágio em Portugal, estudo de produção de PGA por *Escherichia coli*, visando estudo posterior da técnica de adsorção em leite expandido e comparação das condições de produção da enzima por *E. coli* com as utilizadas para *B. megaterium*. A máxima produção de enzima obtida foi de 400 UI/L. As mesmas condições operacionais utilizadas para *E. coli* foram testadas para *B. megaterium* e não resultaram na produção de enzima.

No estudo da concentração e purificação da enzima produzida por *B. megaterium* foi otimizada a técnica de precipitação com etanol, cujo estudo se iniciou em trabalho prévio, e estudadas as técnicas de ultrafiltração e adsorção em leito expandido (A.L.E). A ultrafiltração conseguiu concentrar a enzima até atividade final 1541UI/L. A temperatura mostrou ser uma variável importante, conseguindo-se evitar inativação térmica da enzima concentrada realizando-se a técnica a 4°C. No processo de precipitação com etanol, os melhores resultados foram obtidos com vazão de 0,03 mL/s para os 22 mL iniciais de etanol e de 0,25 mL/s para os 98 mL de etanol restantes, com ajuste do pH do caldo para 6, sem a realização prévia de diálise. Na aplicação da adsorção em leito expandido a capacidade de ligação dinâmica encontrada para a PGA em caldo clarificado foi próxima de 5 UI/ mL de gel, com recuperação global de 30 % da enzima inicial. Valor similar para a capacidade de ligação dinâmica foi encontrado para PGA de *E. coli*.

## PRODUCTION AND PURIFICATION OF PENICILLIN G ACYLASE

### ABSTRACT

The main objective of the present work was the study of PGA of *B. megaterium* production process and purification. The following production aspects were investigated in flasks and/or fermenter: the study of the purity of the culture, the standardization and the conservation of the inoculum, the optimization of the total time of cultivation (germination/propagation and production), the volume of the inoculum, the nutritional requirements of the *B. megaterium* for the production of the enzyme, the pH, the concentration of dissolved oxygen and the nutrients feeding mode. It was concluded that the conservation of the microorganism in cryovials, in presence the glycerol, showed to be efficient. The germination took 11 hours and the production, 24 hours, which is enough time for the process to reach the maximum production of the enzyme. With respect to the inoculum volume, 3 mL of inoculum/75 mL of medium ( $10^8$  espores/mL of inoculum), in flasks of 500 mL, were found to be the appropriate conditions for its production. Different sources of carbon and nitrogen were studied and it was verified that glucose, glycerol and concentrations of amino acids above 10.0 g/L repress the synthesis of the enzyme. The largest production of PGA for *B. megaterium* occurs when the microorganism grows consuming free amino acids, phenylacetic acid (inductor), in the presence of some factor present in the cheese whey. The different components of the cheese whey were investigated and it was verified that none of the macronutrients is responsible for the significant effect of the whey on the production of the enzyme. This work allowed an increase on the enzymatic activities from 56 UI/L and 8,6 UI/g cell, obtained in the first experimental run with the standard inoculum, to 220 UI/L and 65 UI/g cell with the following conditions: 10 g/L of amino acids, 19,6 g/L of cheese whey, 0,4 g/L of salts, 2,7 g/L phenylacetic acid (AFA), initial pH 8,0, absence of pH control, addition of AFA in the beginning of the cultivation and control of dissolved oxygen around 20% of the saturation.

During a research stage in Portugal, an investigation on the PGA production by *Escherichia coli* was also carried out in order to study the technique

of adsorption in expanded bed and comparison of the conditions of production of the enzyme for *E. coli* with those used for *B. megaterium*. The maximum PGA production using *E. coli* was 400 UI/L. The same operational conditions used for *E. coli* were tested for *B. megaterium* and they didn't result in the enzyme production.

In the study of the concentration and purification of the enzyme produced by *B. megaterium*, the ethanol precipitation technique was optimized. In addition, the ultrafiltration and adsorption in expanded bed (EBA) techniques were also studied. Using ultrafiltration, at 4°C, enzyme concentrations up to 1541UI/L was reached, without thermal inactivation. The optimization of the previously study conditions results in: flow rate of 0.03 mL/s for the initial 22 mL of ethanol and 0.25 mL/s for the 98 mL of remaining ethanol, with adjustment of the pH of the broth for 6, without the previous dialysis. In the application of the adsorption in expanded bed the dynamic binding capacity found for PGA in clarified broth was about 5 UI / mL of adsorbent, with recovery of 30% of the initial enzyme. A similar value for the dynamic binding capacity was found for PGA of *E. coli*.

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
ÍNDICE DE TABELAS.....	xvi
NOMENCLATURA.....	xxvi
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Penicilina G Acilase.....	3
2.2. <i>Bacillus megaterium</i> .....	7
2.2.1. Esporulação e Germinação de <i>B. megaterium</i> .....	8
2.3. Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> .....	11
2.3.1. Requerimentos nutricionais dos microrganismos no meio de cultivo.....	17
2.4. Produção de PGA por linhagens mutantes ou clonadas.....	32
2.4.1. Trabalhos encontrados na literatura relacionados com a produção de PGA com linhagens mutantes ou clonadas.....	32
2.5. Purificação de enzimas.....	43
2.5.1. Diálise.....	47
2.5.2. Precipitação com Solventes Orgânicos.....	48
2.5.3. Ultrafiltração.....	49
2.5.4. Adsorção por troca iônica.....	53
2.5.4.1. Adsorção em leito expandido (ALE).....	54
CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
3.1. Materiais.....	59
3.1.1. Produção de enzima PGA por <i>B. megaterium</i> .....	59
3.1.1.1. Microrganismo.....	59
3.1.1.2. Nutrientes/Reagentes.....	59
3.1.2. Produção de enzima PGA por <i>E. coli</i> .....	59

3.1.2.1. Microrganismo.....	59
3.1.2.2. Nutrientes/Reagentes.....	60
3.1.3. Purificação de PGA de <i>E. coli</i> .....	60
3.1.3.1. Enzima.....	60
3.1.3.2. Suporte.....	60
3.1.4. Purificação de PGA de <i>B. megaterium</i> .....	61
3.1.4.1. Enzima.....	61
3.1.4.2. Membranas de diálise.....	61
3.1.4.3. Solvente Orgânico.....	61
3.1.4.4. Suporte.....	61
3.1.5. Principais Equipamentos.....	62
3.2. Métodos.....	63
3.2.1. Produção de Penicilina G Acilase por <i>B. megaterium</i> ATCC 14945.....	63
3.2.1.1. Preparo do Inóculo.....	63
3.2.1.2. Obtenção do Inóculo.....	63
3.2.1.3. Produção de enzima em câmara rotativa.....	65
3.2.1.4. Produção da enzima em fermentador.....	67
3.2.2. Verificação da pureza da cultura de <i>B. megaterium</i> ATCC 14945.....	67
3.2.3. Análise das amostras para acompanhamento da produção de PGA de <i>B. megaterium</i> .....	68
3.2.3.1. Análise da Concentração celular.....	68
3.2.3.2. Determinação da atividade enzimática.....	69
3.2.3.2.1. Método colorimétrico do PDAB.....	69
3.2.3.3. Métodos para determinação de proteínas.....	70
3.2.3.3.1. Método de Lowry.....	70
3.2.3.3.2. Método de Bradford.....	70
3.2.3.4. Determinação da concentração de Lactose.....	71
3.2.3.4.1. Método do Somogyi.....	7
3.2.3.4.2. Método do DNS.....	70

3.2.3.5. Determinação de glicose e lactose por cromatografia líquida de alta performance (HPLC).....	74
3.2.3.6. Determinação de aminoácidos, peptídeos e ácido fenil acético por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) .....	74
3.2.4. Hidrólise de Caseína.....	75
3.2.5. Atividade proteolítica.....	75
3.2.6. Preparo dos criotubos.....	76
3.2.7. Acompanhamento da viabilidade do microrganismo mantido em ultrafreezer.....	77
3.2.8. Produção de Penicilina G Acilase por <i>E. coli</i> ATCC 9637.....	78
3.2.8.1. Preparo do Inóculo.....	78
3.2.8.2. Obtenção do Inóculo.....	79
3.2.8.3. Produção da enzima em câmara rotativa.....	79
3.2.8.4. Produção da enzima em fermentador.....	79
3.2.9. Análise das amostras para acompanhamento da produção de PGA por <i>E. coli</i> .....	80
3.2.9.1. Concentração celular.....	81
3.2.9.2. Determinação da atividade enzimática.....	81
3.2.10. Extração de PGA de <i>E. coli</i> .....	82
3.2.10.1. Sonicação.....	82
3.2.11. Purificação de Penicilina G Acilase de <i>E. coli</i> .....	83
3.2.11.1. Processos de adsorção-desorção de modo descontínuo...	83
3.2.11.2. Processos de adsorção-desorção de modo contínuo.....	85
3.2.12. Purificação/Concentração de PGA de <i>B. megaterium</i> .....	86
3.2.12.1. Diálise.....	86
3.2.12.1.1. Tratamento das membranas.....	86
3.2.12.2. Concentração com Solventes Orgânicos.....	87
3.2.12.3. Processos de adsorção-desorção.....	87
CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	88
4.1. Produção de PGA por <i>B. megaterium</i> em câmara rotativa.....	88

4.1.1. Estudos da estabilidade do microrganismo: conservação, pureza, seleção e reativação da cultura.....	88
4.1.1.1. Verificação da pureza da cepa de <i>B. megaterium</i> .....	88
4.1.1.2. Seleção do microrganismo para padronização do inóculo..	94
4.1.1.3. Reativação do microrganismo selecionado para recuperação da capacidade produtora de penicilina G acilase.....	96
4.1.2. Estudos do inóculo: volume e tempo de germinação/propagação.....	99
4.1.3. Estudo dos requerimentos nutricionais do <i>Bacillus megaterium</i> .....	107
4.1.3.1. Meio de germinação com aminoácidos livres.....	107
4.1.3.2. Meio de produção com aminoácidos livres.....	109
4.1.3.3. Meio de germinação com caseína hidrolisada.....	112
4.1.3.4. Meio de produção com caseína hidrolisada.....	114
4.1.3.4.1. Uso de glicerol como fonte de carbono.....	118
4.1.3.4.2. Influência de diferentes fontes de nitrogênio.....	119
4.1.3.4.2.1. Uso de diferentes proteases na hidrólise de caseína.....	120
4.1.3.4.2.2. Uso de diferentes proteínas hidrolisadas: soro de queijo, peptona e triptona.....	123
4.1.3.4.2.3. Influência da adição de aminoácidos: meio de germinação e de produção.....	126
4.1.3.4.2.4. Uso de hidrolisado ácido de caseína (Difco).....	134
4.1.3.4.3. Estudos sobre o papel do soro de queijo.....	136
4.1.3.4.4. Influência do ácido fenil acético (AFA).....	142
4.2. Produção de PGA por <i>B. megaterium</i> em Biorreator.....	144
4.2.1. Influência da concentração do oxigênio dissolvido (ensaios 1,2 e 3).....	146
4.2.2. Influência do pH (ensaios 5 e 6).....	159
4.2.3. Influência de diferentes estratégias de alimentação (ensaios 4,7,8,9 e 10).....	165

4.3. Produção de PGA de <i>E. coli</i> em câmara rotativa.....	192
4.3.1. Verificação da estabilidade de <i>E. coli</i> .....	192
4.3.2. Efeito da temperatura e volume do meio no erlenmeyer na produção de PGA de <i>E. coli</i> .....	194
4.3.3. Influência do meio de crescimento na etapa de produção de PGA.....	195
4.3.4. Efeito da concentração de extrato de levedura e do ácido fenil acético na produção de PGA.....	198
4.3.5. Influência de diferentes marcas de extrato de levedura na produção de PGA.....	200
4.3.6. Seleção de colônias produtoras de <i>E. coli</i> .....	201
4.4. Produção de PGA de <i>E. coli</i> em Biorreator.....	202
4.5. Produção de PGA de <i>B. megaterium</i> em câmara rotativa utilizando as condições de cultivo de <i>E. Coli</i> .....	206
4.6. Extração e Purificação de PGA de <i>E. coli</i> ATCC 9637.....	213
4.6.1. Extração da penicilina G acilase.....	213
4.6.2. Purificação de PGA de <i>E. coli</i> .....	214
4.6.2.1. Adsorção em leito expandido.....	214
4.6.2.1.1. Influência do pH do extrato enzimático na adsorção de PGA.....	215
4.6.2.1.2. Isotermas de Adsorção.....	219
4.6.2.1.3 Seleção da força iônica.....	226
4.6.2.1.4 Adsorção contínua.....	228
4.7. Purificação e concentração de penicilina G acilase de <i>B.</i> <i>megaterium</i> ATCC 14945.....	236
4.7.1. Microfiltração.....	236
4.7.2. Ultrafiltração.....	237
4.7.3. Diálise.....	240
4.7.4. Precipitação com solventes orgânicos.....	241
4.7.5. Adsorção em leito expandido.....	246
<b>4.7.5.1. Efeito do pH do caldo de cultivo na adsorção</b>	<b>246</b>
<b>de PGA.....</b>	

<b>4.7.5.2.</b>	<b>Adsorção</b>	<b>256</b>
<b>contínua.....</b>		
<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>		<b>259</b>
5.1. Conclusões.....		259
5.2. Sugestões.....		262
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>		<b>263</b>

## Índice de Figuras

Figura 2.1. Hidrólise enzimática da Penicilina G.....	3
Figura 2.2. Ciclo vegetativo e de esporulação em bactérias capazes de esporular (Black, 1996).....	10
Figura 2.3. Sequência nucleotídica e dos aminoácidos do gene PGA de <i>Bacillus megaterium</i> (Martín et alli, 1995). Dados apresentados no GenBank número Z37542.....	41
Figura 2.4. Comparação entre um processo de purificação convencional e o processo integrado de adsorção em leite expandido (Calado et al.,2001).....	55
Figura 3.1. Procedimento experimental de seleção do microorganismo.....	68
Figura 3.2. Representação do procedimento utilizado para o teste da viabilidade celular.....	78
Figura 3.3 – Etapas usadas na adsorção em leite expandido (ALE).....	85
Figura 4.1. Placas após o aparecimento de colônias em ordem crescente para as três diluições ( $10^{-4}$ , $10^{-5}$ e $10^{-6}$ ).....	89
Figura 4.2. Placa com diluição de $10^{-6}$ .....	89
Figura 4.3. “Slants” com as colônias A e B.....	90
Figura 4.4. Visualização no microscópio das colônias A e B.....	90
Figura 4.5. Procedimento experimental para estudo da influência do volume inicial de esporos e do tempo de germinação na produção de PGA.....	100
Figura 4.6. Cromatograma da caseína hidrolisada com diferentes proteases.	122
Figura 4.7. Consumo de aminoácidos (10g/L) durante o cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> .....	132
Figura 4.8. Consumo de aminoácidos (20g/L) durante o cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> .....	132
Figura 4.9. Resultados experimentais do primeiro ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO <sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O <sub>2</sub> , (E) concentração de oxigênio dissolvido, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	148

Figura 4.10. Resultados experimentais do segundo ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO <sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O <sub>2</sub> , (E) concentração do oxigênio dissolvido, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	151
Figura 4.11. Resultados experimentais do terceiro ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO <sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O <sub>2</sub> , (E) concentração do oxigênio dissolvido, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	154
Figura 4.12. Cromatograma da caseína hidrolisada com alcalase <sup>®</sup> e quatro peptídeos de peso molecular conhecidos.....	157
Figura 4.13. Cromatograma do soro de queijo.....	157
Figura 4.14. Cromatograma do soro de queijo e do ácido fenil acético.....	158
Figura 4.15. Cromatograma de amostras de cultivo de <i>B. megaterium</i> .....	158
Figura 4.16. Resultados experimentais do quinto ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO <sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O <sub>2</sub> , obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	161
Figura 4.17. Acompanhamento do consumo do ácido fenil acético ao longo do quinto cultivo.....	161
Figura 4.18. Resultados experimentais do sexto ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO <sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O <sub>2</sub> , (E) concentração do oxigênio dissolvido, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	164
Figura 4.19: Resultados experimentais do quarto ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO <sub>2</sub> nos gases de	

saída; (D) concentração de O <sub>2</sub> , (E) concentração do oxigênio dissolvido, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	168
Figura 4.20. Comportamento da concentração de AFA no quarto ensaio de cultivo do <i>B. megaterium</i> .....	169
Figura 4.21. Resultados experimentais do sétimo ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular, AFA e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO <sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O <sub>2</sub> , (E) concentração do oxigênio dissolvido, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	172
Figura 4.22. (A): Aminoácidos consumidos mais rapidamente; (B) Aminoácidos consumidos mais lentamente .....	174
Figura 4.23. Resultados experimentais do oitavo ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática e AFA obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO <sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O <sub>2</sub> , (E) concentração do oxigênio dissolvido e agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	177
Figura 4.24. (A): Aminoácidos consumidos mais rapidamente; (B) Aminoácidos consumidos mais lentamente.....	179
Figura 4.25. Resultados experimentais do nono ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO <sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O <sub>2</sub> , (E) concentração do oxigênio dissolvido e agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	183
Figura 4.26. (A): Aminoácidos consumidos mais rapidamente; (B) Aminoácidos consumidos mais lentamente.....	185
Figura 4.27. Resultados experimentais do décimo ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO <sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O <sub>2</sub> , (E) concentração do oxigênio dissolvido e agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.....	188
Figura 4.28. (A): Aminoácidos consumidos mais rapidamente; (B) Aminoácidos consumidos mais lentamente.....	190

Figura 4.29. Evolução da atividade (■) e de proteínas (▲) no sobrenadante e a atividade de células no sedimento (●) durante a sonicação de suspensão celular .....	214
Figura 4.30. Isoterma de adsorção de PGA de <i>E. coli</i> (T. ambiente, pH = 4,8) .....	221
Figura 4.31. Comparação das isotermas de adsorção determinadas para a PGA de <i>E. coli</i> contida em 3 soluções diferentes.....	225
Figura 4.32. Comportamento da atividade versus volume total do processo (caso 1).....	231
Figura 4.33. Comportamento da atividade versus volume total do processo (caso 2).....	233
Figura 4.34. Comportamento da atividade versus volume total do processo (caso 3).....	235

## Índice de Tabelas

Tabela 2.1. Algumas empresas e seus respectivos microrganismos produtores de enzima penicilina G acilase e forma da enzima intra ou extra celular (Savidge,1984).....	4
Tabela 2.2. Comparação dos valores de Km das penicilinas G acilase de diferentes microrganismos (Savidge e Cole,1975).....	5
Tabela 2.3. Comparação das constantes cinéticas das penicilinas G acilases produzida por <i>E. coli</i> e <i>B. megaterium</i> , onde os dados da <i>E. coli</i> foram obtidos a pH 8,0 e 37° C e os do <i>B. megaterium</i> foram obtidos a pH 8,7 e 37°C (Savidge e Cole, 1975). .....	5
Tabela 2.4. Produção de Penicilina Acilase em meio complexo e definido (Illanes et alli., 1994).....	14
Tabela 2.5. Elementos principais, suas fontes e funções nas células bacterianas.....	18
Tabela 2.6. Composição elementar da massa seca de <i>E. coli</i> B, <i>E. coli</i> MRE 600 e <i>E. coli</i> K13-3300 (Bauer et al, 1976, apud Castillo, 1997).....	19
Tabela 2.7. Concentrações dos elementos nutricionais relativas ao nitrogênio em células bacterianas e em meios de cultivo comumente utilizados (Cooney, 1981, apud Castillo,1997).....	20
Tabela 2.8. Fatores de conversão de <i>E. coli</i> B, <i>E. coli</i> MRE 600 e <i>E. coli</i> K12-3300 (Bauer et al, 1976 apud Castillo, 1997).....	21
Tabela 2.9. Vitaminas comuns requeridas na nutrição de certas bactérias.....	22
Tabela 2.10. Atividade acilase em linhagens de <i>E. coli</i> e <i>Kluyvera citrophila</i> .....	35
Tabela 2.11. Atividade de Penicilina G Acilase em várias linhagens e subclones (kang et alli.,1991).....	38
Tabela 2.12. Operações de purificação e separação das proteínas (Leser e	

Asenjo, 1992).....	44
Tabela 2.13. Isolamento da penicilina amidase de <i>E. coli</i> ( 10kg ) (Balasingham et alli., 1972).....	45
Tabela 2.14. Atividade de Penicilina G acilase em diferentes operações de purificação ( Senthilvel e Pai,1996).....	46
Tabela 3.1. Composição dos meios de germinação com caseína hidrolisada....	64
Tabela 3.2. Composição dos meios de germinação com aminoácidos livres....	64
Tabela 3.3 a. Composição dos meios de produção com caseína hidrolisada.....	65
Tabela 3.3 b. Composição dos meios de produção com caseína hidrolisada....	66
Tabela 3.4 a. Composição dos meios de produção com aminoácidos livres.....	66
Tabela 3.4 b. Composição dos meios de produção com aminoácidos livres.....	67
Tabela 4.1. Resultados obtidos na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> ATCC 14945.....	88
Tabela 4.2. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando as colônias A e B (ensaio 2 e 3 respectivamente ).....	92
Tabela 4.3. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando novo “slant” de <i>B. megaterium</i> ATCC 14945.....	92
Tabela 4.4. Resultados na produção de PGA utilizando soro de queijo líquido e em pó.....	93
Tabela 4.5. Resultados na produção de PGA utilizando lotes diferentes de caseína e após prévia ativação do microrganismo.....	94
Tabela 4.6. Resultados obtidos nos ensaios de produção de PGA utilizando diferentes lotes da mesma linhagem de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945.....	95
Tabela 4.7. Parâmetros calculados a partir de dados obtidos na produção de PGA.....	95
Tabela 4.8. Influência da adição de sais a diferentes pHs na produção de PGA utilizando inóculo padrão (criotubos).....	97
Tabela 4.9. Influência da adição de sais na produção de PGA com <i>B.</i> <i>megaterium</i> oriundo de diferentes formas de conservação.....	98
Tabela 4.10. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando meio de	

germinação com concentração inicial de 1,7 mL de solução esporos/ 75 mL de meio. ....	101
Tabela 4.11. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando meio de germinação com concentração inicial de 5 mL de solução de esporos / 75 mL de meio.....	102
Tabela 4.12. Produtividade e produtividade específica utilizando meio de germinação com concentração inicial de 1,7 mL de solução esporos / 75 mL de meio.....	104
Tabela 4.13. Produtividade e produtividade específica utilizando meio de germinação com concentração inicial de 5,0 mL de solução de esporos / 75 mL de meio.....	105
Tabela 4.14. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando meio de germinação com concentração inicial de 3,0 mL de solução esporos/ 75 mL de meio. 2ª batelada de esporos.....	106
Tabela 4.15. Resultados obtidos na produção de PGA variando-se o meio de germinação. 1ª batelada de esporos.....	108
Tabela 4.16. Atividade enzimática (UI/L) e concentração celular (g/L) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> utilizando meio sintético na etapa de germinação e de produção. 1ª batelada de esporos.....	111
Tabela 4.17. Consumo de nutrientes e concentração celular (g/L) após 24 horas de cultivo de <i>B. megaterium</i> em meios complexos na etapa de germinação. 2ª batelada de esporos.....	112
Tabela 4.18. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando diferentes meios complexos. 2ª batelada de esporos.....	115
Tabela 4.19. Influência da presença de glicerol no cultivo de <i>B megaterium</i> para produção de PGA.....	118
Tabela 4.20. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando caseína hidrolisada com diferentes proteases, em diferentes condições de reação.....	121
Tabela 4.21. Produção de PGA utilizando soro de queijo líquido hidrolisado..	124
Tabela 4.22. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de PGA....	126
Tabela 4.23. Efeito da adição de aminoácidos no meio PC12 (com caseína	

hidrolisada) na produção de PGA.....	127
Tabela 4.24. Influência da concentração de aminoácidos em meio sintético na produção de PGA.....	128
Tabela 4.25. Influência da concentração de aminoácidos, na presença de soro de queijo, na produção de PGA.....	129
Tabela 4.26. Influência da concentração de aminoácidos na produção de PGA .....	131
Tabela 4.27. Influência do uso de caseína hidrolisada ácida no meio de cultivo.....	135
Tabela 4.28. Concentrações de nutrientes utilizadas nos ensaios simulando a composição do soro de queijo. Concentrações baseadas em Berazaín, 1997.	137
Tabela 4.29. Efeito da substituição do soro por seus componentes e verificação da omissão individual de cada componente na produção de PGA..	138
Tabela 4.30. Influência da adição de $\text{KH}_2\text{PO}_4$ e cálcio na produção de PGA...	139
Tabela 4.31. Influência da diminuição do sal de fósforo e potássio e da adição dos lipídios na produção de PGA.....	140
Tabela 4.32. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando o dobro de soro de queijo no meio padrão (PA10) .....	141
Tabela 4.33. Influência do ácido fenil acético e da glicose na produção de PGA em meio contendo aminoácidos livres.....	143
Tabela 4.34. Condições utilizadas nos diferentes ensaios realizados em biorreator.....	145
Tabela 4.35. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado a 20% de oxigênio dissolvido nas primeiras 8 horas e depois controlado em 10%, ausência de controle de pH e adição de AFA após 8 horas de cultivo. Ensaio 1.....	147
Tabela 4.36. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado a uma agitação de 300 rpm nas primeiras 10 horas e depois controle em 20% de oxigênio dissolvido, ausência de controle de pH e adição de AFA no início do cultivo. Ensaio 2.....	150
Tabela 4.37. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado a 20% de oxigênio dissolvido nas primeiras 12 horas e depois controlado em 10%, ausência de controle de pH e adição de AFA no início do cultivo.	

Ensaio 3.....	153
Tabela 4.38. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado a 450 rpm nas primeiras 8 horas e depois em 600 rpm, controle de pH em 8 e adição de AFA no início do cultivo. Ensaio 5.....	160
Tabela 4.39. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado a 450 rpm nas primeiras 8 horas e depois em 600 rpm, controle de pH em 8 e adição de AFA no início do cultivo. Ensaio 6.....	163
Tabela 4.40. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado em 20% de oxigênio em todo o cultivo, ausência de controle de pH, adição de AFA no início do cultivo e alimentação de AFA. Início e término da alimentação = 8 e 48 horas. Ensaio 4.....	167
Tabela 4.41 Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado em 20% de oxigênio em todo o cultivo, ausência de controle de pH , adição de AFA no início do cultivo e uso dos novos meios padrões (GA8 e PA10). Ensaio 7.....	171
Tabela 4.42. Resultados obtidos na produção de PGA em shaker realizado em paralelo com o biorreator - uso dos mesmos meios (GA8 e PA10).....	171
Tabela 4.43. Consumo dos aminoácidos em g/L ao longo do ensaio 7.....	174
Tabela 4.44. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado em 20% de oxigênio em todo o cultivo, ausência de controle de pH , adição de AFA no início do cultivo e uso dos novos meios padrões (GA8 e PA10) com alimentação de aminoácidos. Início e término da alimentação = 8 e 17 horas. Ensaio 8.....	176
Tabela 4.45. Resultados obtidos na produção de PGA em shaker realizado em paralelo com o biorreator - uso dos mesmos meios (GA8 e PA10) porém sem alimentação.....	176
Tabela 4.46. Consumo dos aminoácidos em g/L ao longo do ensaio 8 (batelada alimentada).....	179
Tabela 4.47. Concentração de aminoácidos no meio inicial e no meio de alimentação.....	180

Tabela 4.48. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado em 20% de oxigênio em todo o cultivo, ausência de controle de pH , adição de AFA no início do cultivo e uso dos novos meios padrões (GA8 e PA10) com alimentação de aminoácidos (concentração baseada na velocidade de consumo).Início e término da alimentação = 5 e 14 horas. Ensaio 9.....	181
Tabela 4.49. Resultados obtidos na produção de PGA em shaker realizado em paralelo com o biorreator - uso dos mesmos meios (GA8 e PA10) porém sem alimentação.....	182
Tabela 4.50. Consumo dos aminoácidos em g/L ao longo do ensaio 9 (batelada alimentada).....	185
Tabela 4.51. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado em 20% de oxigênio em todo o cultivo, ausência de controle de pH , adição de AFA no início do cultivo e uso dos novos meios padrões (GA8 e PA10) com alimentação de aminoácidos (concentração baseada na velocidade de consumo) e de soro de queijo. Início e término da alimentação a.a. = 5 e 14 horas. Início e término da alimentação soro de queijo = 8 e 11 h. Ensaio 10....	187
Tabela 4.52. Resultados obtidos na produção de PGA em shaker realizado em paralelo com o biorreator - uso dos mesmos meios (GA8 e PA10) porém sem alimentação.....	187
Tabela 4.53. Consumo dos aminoácidos em g/L ao longo do ensaio 10 (batelada alimentada).....	189
Tabela 4.54. Resultados obtidos no meio de crescimento de diferentes lotes de <i>E. coli</i> (tempo de cultivo = 5 a 7 horas).....	193
Tabela 4.55. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando diferentes lotes de <i>E. coli</i> (temperatura = 26°C, volume de meio = 100mL).....	193
Tabela 4.56. Resultados obtidos no meio de crescimento de diferentes lotes de <i>E. coli</i> (tempo de cultivo = 5 horas).....	194
Tabela 4.57. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando diferentes lotes de <i>E. coli</i> (temperatura = 24°C, volume de meio = 80mL).....	195

Tabela 4.58. Resultados obtidos no meio de crescimento de <i>E. coli</i> em diferentes tempos.....	196
Tabela 4.59. Influência do tempo de cultivo de <i>E. coli</i> na produção de PGA...	197
Tabela 4.60. Efeito da concentração dos nutrientes do meio na produção de PGA por <i>E. coli</i> .....	199
Tabela 4.61. Influência de diferentes marcas de extrato de levedura na produção de PGA por <i>E. coli</i> .....	201
Tabela 4.62. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando duas colônias aparentemente diferentes (YE1 pequena e YE1 maior respectivamente).....	202
Tabela 4.63. Resultados obtidos na produção de PGA de <i>E. coli</i> realizado em biorreator operado a uma agitação de 200 rpm, ausência de controle de oxigênio e controle de pH na faixa de 6,5 a 8,5. Ensaio 1.....	203
Tabela 4.64. Resultados obtidos na produção de PGA de <i>E. coli</i> realizado em biorreator operado a 5% de oxigênio dissolvido e controle de pH na faixa de 6,5 a 8,5. Ensaio 2.....	204
Tabela 4.65. Resultados obtidos na produção de PGA de <i>E. coli</i> realizado em biorreator operado a 5% de oxigênio dissolvido e controle de pH na faixa de 6,5 a 8,5. Ensaio 3.....	205
Tabela 4.66. Resultados obtidos na produção de PGA de <i>E. coli</i> realizado em biorreator operado a uma agitação de 400 rpm, ausência de controle de oxigênio e controle de pH na faixa de 6,5 a 8,5. Ensaio 4 e 5.....	206
Tabela 4.67. Resultados obtidos no meio de crescimento de <i>B. megaterium</i> utilizando todas as condições de cultivo de <i>E. coli</i> .....	207
Tabela 4.68. Resultados obtidos na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> utilizando todas as condições de cultivo de <i>E. coli</i> .....	207
Tabela 4.69. Resultados obtidos no meio de crescimento de <i>B. megaterium</i> utilizando composição do meio de <i>E. coli</i> e as condições operacionais do <i>B. megaterium</i> ( pH inicial = 8,2 ; temperatura de 30°C, agitação = 300 rpm).....	208
Tabela 4.70. Resultados obtidos na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> utilizando composição do meio de <i>E. coli</i> e as condições operacionais do <i>B. megaterium</i> ( pH inicial de aproximadamente 8,0 ; temperatura = 30°C ,	

agitação = 300 rpm).....	209
Tabela 4.71. Resultados obtidos no meio de crescimento de <i>B. megaterium</i> utilizando o meio de cultivo otimizado do <i>B. megaterium</i> (GA8) .....	210
Tabela 4.72. Resultados obtidos na produção de PGA de <i>B. megaterium</i> para os diferentes tempos de inoculação utilizando meio de cultivo otimizado do <i>B. megaterium</i> (PA8).....	211
Tabela 4.73. Resultados obtidos na produção de PGA após sucessivos repiques de <i>B. megaterium</i> .....	212
Tabela 4.74. Resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de <i>E. coli</i> na resina Streamline-SP nos diferentes pH's estudados. Clarificado = solução enzimática no tempo zero; extrato = solução enzimática após passar pelo gel; lavagem = tampão utilizado para lavar o gel; eluído = tampão com NaCl utilizado para eluir a enzima.....	216
Tabela 4.75. Efeito do pH nos parâmetros de adsorção quantificados.....	217
Tabela 4.76. Resultados obtidos no segundo processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de <i>E. coli</i> na resina Streamline-SP nos diferentes pH's estudados. Clarificado = solução enzimática no tempo zero; extrato = solução enzimática após passar pelo gel; lavagem = tampão utilizado para lavar o gel; eluído = tampão com NaCl utilizado para eluir a enzima.....	218
Tabela 4.77. Efeito do pH nos parâmetros quantificados para o segundo processo de adsorção-desorção.....	219
Tabela 4.78. Resultados obtidos na determinação da isoterma de adsorção de PGA de <i>E. coli</i> (Temperatura ambiente, pH = 4,8).....	220
Tabela 4.79. Resultados obtidos na determinação da isoterma de adsorção de PGA de <i>E. coli</i> (homogenato + precipitado do ajuste do pH).....	222
Tabela 4.80. Resultados obtidos na determinação da isoterma de adsorção de PGA de <i>E. coli</i> (extrato enzimático + precipitado do ajuste do pH).....	223
Tabela 4.81. Resultados obtidos na determinação da isoterma de adsorção de PGA de <i>E. coli</i> (extrato enzimático).....	224
Tabela 4.82. Condições utilizadas nos ensaios de seleção da força iônica.....	226
Tabela 4.83. Resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de <i>E. coli</i> na resina Streamline-SP em diferentes	

condutividades.....	227
Tabela 4.84. Resultados obtidos na adsorção contínua em leito expandido de PGA de <i>E. coli</i> em solução clarificada.....	230
Tabela 4.85. Resultados obtidos na adsorção contínua em leito fixo de PGA de <i>E. coli</i> em solução clarificada.....	232
Tabela 4.86. Resultados obtidos na adsorção contínua em leito expandido de PGA de <i>E. coli</i> em solução não clarificada (homogenato).....	234
Tabela 4.87. Resultados obtidos na etapa de microfiltração.....	237
Tabela 4.88. Resultados obtidos na ultrafiltração realizada a temperatura ambiente.....	238
Tabela 4.89. Resultados obtidos na ultrafiltração realizada em banho de gelo.	239
Tabela 4.90. Resultados obtidos na ultrafiltração realizada a 4°C .....	239
Tabela 4.91. Resultados obtidos na diálise do caldo de cultivo micro/ultrafiltrado.....	240
Tabela 4.92. Resultados obtidos na precipitação com solventes orgânicos para caldos de cultivos oriundos após a aplicação de diferentes técnicas (M = microfiltrado; M/U = micro/ultrafiltrado e M/U/D = micro/ultrafiltrado/dialisado).....	242
Tabela 4.93. Efeito das variáveis nos parâmetros de precipitação quantificados.....	243
Tabela 4.94. Resultados obtidos na precipitação com solventes orgânicos para caldos de cultivo sem ajuste de pH ( M= microfiltrado; M/U = micro/ultrafiltrado).....	244
Tabela 4.95. Efeito das variáveis nos parâmetros de precipitação quantificados.....	245
Tabela 4.96. Resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de <i>B. megaterium</i> na resina Streamline-SP nos diferentes pH's estudados. Clarificado = solução enzimática no tempo zero; extrato = solução enzimática após passar pelo gel; lavagem = tampão utilizado para lavar o gel; eluído = tampão com NaCl utilizado para eluir a enzima.....	247
Tabela 4.97. Efeito do pH nos parâmetros de adsorção quantificados.....	248

Tabela 4.98. Resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de <i>B. megaterium</i> na resina Streamline-SP utilizando diferentes tampões eluentes Clarificado = solução enzimática no tempo zero; extrato = solução enzimática após passar pelo gel; lavagem = tampão utilizado para lavar o gel; eluído = tampão com NaCl utilizado para eluir a enzima.....	249
Tabela 4.99. Efeito do tampão eluente nos parâmetros de adsorção quantificados.....	249
Tabela 4.100. Verificação da estabilidade de PGA de <i>B. megaterium</i> em pH = 4,5 e 4,9 (temperatura ambiente e a – 4°C).....	250
Tabela 4.101. Influência do NaCl na estabilidade da enzima. Concentração final de NaCl na solução = 1,5M.....	251
Tabela 4.102. Resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de <i>B. megaterium</i> na resina Streamline-SP utilizando diferentes molaridades de NaCl no tampão eluente. Clarificado = solução enzimática no tempo zero; extrato = solução enzimática após passar pelo gel; lavagem = tampão utilizado para lavar o gel; eluído = tampão com NaCl utilizado para eluir a enzima.....	252
Tabela 4.103. Efeito da molaridade do NaCl no tampão eluente nos parâmetros de adsorção quantificados.....	253
Tabela 4.104. Resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de <i>B. megaterium</i> na resina Streamline-SP em diferentes condições de lavagem e eluição Clarificado = solução enzimática no tempo zero; extrato = solução enzimática após passar pelo gel; lavagem = tampão utilizado para lavar o gel; eluído = tampão com NaCl utilizado para eluir a enzima.....	255
Tabela 4.105. Efeito de diferentes condições de lavagem e eluição nos parâmetros de adsorção quantificados.....	256
Tabela 4.106. Resultados obtidos na adsorção contínua em leito expandido	

de PGA de *B. megaterium* em solução clarificada..... 257

## Nomenclatura

a.a.	Aminoácidos
A.E.	Atividade enzimática
A.Esp.	Atividade específica
AFA	Ácido fenil acético
ALE	Adsorção em leite expandido
6-APA	Ácido 6-aminopenicilânico
CHE	Caseína hidrolisada enzimaticamente
C <sub>x</sub>	Concentração celular
F.P	Fator de purificação
HPLC	“High Pressure Liquid Cromatograph”
Kb	Kilobases
Ki	Constante de inibição
Km	Constante de Michaelis-Menten
MG	Meio de germinação
MP	Meio de produção
PDAB	p-dimetilaminobenzaldeído
PGA	Penicilina G Acilase
SQL	Soro de queijo líquido
SQP	Soro de queijo em pó
Streamline <sup>®</sup> SP	Streamline <sup>®</sup> Sulfapropil
Streamline <sup>®</sup> DEAD	Streamline <sup>®</sup> Dietilaminoetil
UI	Unidade Internacional
Y <sub>X/S</sub>	Fator de rendimento células/substrato
YCO <sub>2</sub>	Fração molar de CO <sub>2</sub> (%)
YO <sub>2</sub>	Fração molar de O <sub>2</sub> (%)
μ <sub>máx</sub>	Velocidade máxima específica de crescimento celular

## 1. Introdução

As enzimas têm sido usada em sua forma nativa há séculos na indústria de alimentos, e mais recentemente, graças a avanços tecnológicos, nas indústrias farmacêuticas e química. O desenvolvimento das modernas técnicas biotecnológicas aliadas à grande oferta de recursos computacionais nos coloca diante da chamada “revolução biotecnológica”, na qual prevê-se um crescimento do mercado de enzimas industriais de \$395 milhões em 1997 para \$731 milhões em 2004 (Frost e Sullivan – [www.frost.com](http://www.frost.com)). A Penicilina G Acilase é um eloquente exemplo de substituição progressiva de processo químico por enzimático, sendo a segunda enzima mais usada industrialmente no mundo na forma imobilizada, abaixo somente da glicose isomerase (Ospina, 1992).

A principal aplicação da penicilina G acilase (PGA) é na hidrólise da penicilina G e cefalosporina para a produção dos ácidos 6-aminopenicilânico (6-APA) e 7-aminocefalosporânico (7-ACA), que são compostos chave na produção industrial de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos, tais como ampicilina, amoxicilina e cefalexina. Esses antibióticos têm ampla aplicação como agentes terapêuticos, o que faz com que continue crescendo a produção mundial de 6-APA (Shewale e Sivaraman, 1989).

Dentre os microrganismos produtores desta enzima, *Bacillus megaterium* é um dos poucos que a produz de modo extracelular, o que torna particularmente interessante o estudo do processo de produção dessa enzima utilizando este microrganismo, pois os procedimentos de purificação tornam-se sobremaneira simplificados, e, conseqüentemente menos caros.

Há algum tempo, a área de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar possui uma linha de estudo voltada para a produção da enzima penicilina G acilase por *Bacillus megaterium*, visando ao entendimento do processo. Essa linha faz parte do projeto integrado financiado pelo PADCT-94, quando se iniciou o estudo da engenharia global dos processos relacionados com penicilina G acilase (produção, purificação, imobilização e aplicação). O primeiro trabalho nessa linha

foi desenvolvido por Hojo, 1997, que realizou estudos preliminares de produção (definição do tempo de incubação, armazenamento da enzima, concentrações iniciais do meio de cultura) e o efeito dos vários componentes do meio simultaneamente na produção da enzima. Trabalhos subsequentes estudaram o uso do soro de queijo como fonte de carbono (Berazaín,1997), a influência da concentração de oxigênio dissolvido (Visnardi,1997), a concentração de nutrientes chave (Inocêncio, 2002) e a influência da composição dos aminoácidos na produção da enzima (Souza, 2003). Também foram desenvolvidos trabalhos que utilizaram técnicas computacionais com o intuito de simular variáveis do processo de produção de PGA por *B. megaterium* (Nucci, 2003 e Silva, 2003).

Pinotti,1999, ao desenvolver o trabalho de dissertação de mestrado, que tinha como objetivo imobilizar e comparar os derivados obtidos de PGA de *B. megaterium* com os já estudados de PGA de *E. coli*, precisou realizar um extenso trabalho exploratório na produção de PGA para obter concentrações suficientes para imobilizar a enzima. As conclusões obtidas nesse trabalho exploratório, juntamente com a importância da enzima motivaram a realização desta tese.

Uma das principais constatações foi a limitação do crescimento do microrganismo por um ou mais nutrientes, que se acreditava não ser nem a fonte de nitrogênio e nem a fonte de carbono, uma vez que se atingiu baixa concentração celular com grandes concentrações residuais dessas fontes. Foi também conclusão do trabalho exploratório que o uso da lactose presente no soro de queijo como fonte de carbono conduziu aos melhores resultados na produção da enzima, tanto por evitar o efeito repressivo da glicose, como pela presença de algum outro nutriente no soro de queijo.

Tomando como base essas constatações, esse trabalho teve como objetivo determinar as condições mais adequadas para se atingir altas produções de PGA no meio de fermentação e posteriores fatores de concentração da enzima na solução final a ser utilizada. Para isso, planejou-se estudar diferentes composições do meio de cultura e condições operacionais de cultivo em frascos agitados e fermentador. Na etapa de purificação/concentração programou-se otimizar a técnica de precipitação com etanol, cujo estudo se iniciou no mestrado, e estudar a técnica de ultrafiltração. Posteriormente incluiu-se também neste programa o

estudo da técnica de adsorção em leito expandido, bem como estudos de clonagem do gene PGA de *B. megaterium*.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. Penicilina G Acilase

A Penicilina G Acilase (penicilina amidase ou penicilina amino hidrolase E.C 3.5.1.11) é uma enzima de grande importância comercial, usada amplamente na produção industrial de ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) a partir da hidrólise de Penicilina G (Shewale e Sivaraman,1989). Embora a conversão microbiana da penicilina G em 6 APA seja conhecida por quase 5 décadas, a aplicação industrial da Penicilina G Acilase (PGA) foi introduzida com sucesso somente nos últimos 8 anos, devido ao fato que a produção eficiente da enzima e sua recuperação não era disponível há uma década atrás (Bruggink et al, 1998). A Figura 2.1 mostra a hidrólise da penicilina G catalisada pela PGA para a produção de 6-APA.

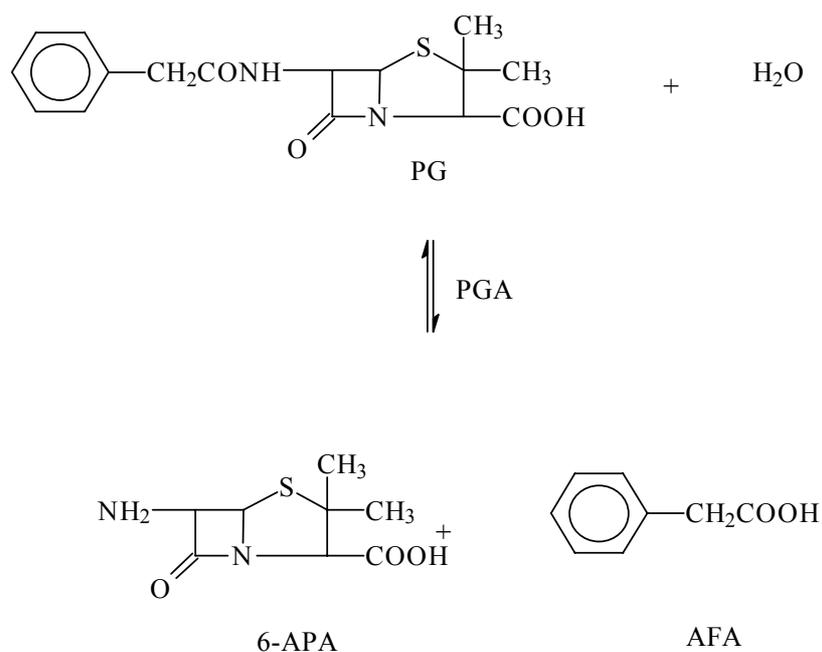


Figura 2.1. Hidrólise enzimática da Penicilina G.

O 6-APA oriundo desta reação é o componente chave para a síntese de numerosas penicilinas semi-sintéticas, sendo que estas apresentam maior estabilidade, melhor adsorção e apresentam também menor número de reações laterais que as penicilinas naturais, encontrando, portanto, uma maior aplicação como agentes terapêuticos. Mais de 15 penicilinas semi-sintéticas derivadas do 6-APA são comercializadas atualmente, porém a ampilicina e amoxicilina são de maior importância comercial (Illanes et alli., 1994).

Esse componente intermediário (6-APA) também pode ser obtido da hidrólise da penicilina V, mas nesse caso a enzima preferencialmente utilizada é a penicilina V acilase. Dentre as penicilinas acilases existentes, a penicilina G e V acilases são as mais importantes e dependendo da fonte a partir da qual a enzima foi isolada, esta pode ser classificada em dois tipos: 1) as penicilinas acilases provenientes de bactérias, que tem maior afinidade para hidrolisar a Penicilina G e; 2) as enzimas provenientes de actinomicetos e fungos, que preferencialmente hidrolisam penicilina V (Chiang e Bennett, 1967; Savidge,1984; ). A diferença dessas enzimas na especificidade ao substrato se deve à natureza da cadeia lateral ligada ao 6-APA. A escolha de produção de uma penicilina acilase recai geralmente em Penicilina G acilase, que é mais comumente encontrada.

A Penicilina G acilase pode ser obtida de vários microrganismos, ocorrendo principalmente em bactérias e, somente como exceção, em fungos e leveduras (Shewale e Sivaraman, 1989). As bactérias mais conhecidas produtoras são a *Escherichia coli*, *Proteus rettgeri*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus megaterium* e espécies de *Pseudomonas* e *Micrococcus* (Senthilvel e Pai,1996; Ospina,1992). Na Tabela 2.1 é apresentado algumas empresas que utilizam diferentes microrganismos para a produção de PGA.

Tabela 2.1. Algumas empresas e seus respectivos microrganismos produtores de enzima penicilina G acilase e forma da enzima intra ou extra celular (Savidge,1984).

Empresa	microrganismo	tipo de enzima
BAYER	<i>Escherichia coli</i>	intracelular
SQUIBB	<i>Bacillus megaterium</i>	extracelular

PFIZER	<i>Proteus rettgeri</i>	intracelular
KYOWA HAKKO	<i>Kluyvera citrophila</i>	intracelular

Devido ao fato da enzima ser produzida por diferentes microrganismos, esta apresenta características e propriedades diferentes. Trabalhos encontrados na literatura caracterizam parâmetros cinéticos e certas propriedades, tais como pH da reação, temperatura, tipo de reator, tempo de meia vida e produtividade dessas diferentes enzimas. A Tabela 2.2 apresenta valores de Km das penicilinas G acilases de diferentes fontes. O substrato utilizado foi a Penicilina G.

Tabela 2.2. Comparação dos valores de Km das penicilinas G acilase de diferentes microrganismos (Savidge e Cole,1975).

Microrganismo	Km (mM)
<i>E. coli</i> ATCC 9637	7,7
<i>E. coli</i> NCIB 8743 <sup>A</sup>	0,62
Enzima cristalina de <i>E. coli</i>	0,02
<i>E. coli</i> NCIB 8743A imobilizada	30,0
<i>B. megaterium</i>	4,5

Também pode-se observar na Tabela 2.3 comparações das constantes cinéticas de penicilinas G acilases produzidas por *B. megaterium* e *E. coli*.

Tabela 2.3. Comparação das constantes cinéticas das penicilinas G acilases produzida por *E. coli* e *B. megaterium*, onde os dados da *E. coli* foram obtidos a pH 8,0 e 37° C e os do *B. megaterium* foram obtidos a pH 8,7 e 37° C (Savidge e Cole, 1975).

Parâmetro	<i>E. coli</i> NCIB 8743	<i>B. megaterium</i> ATCC 14945
V <sub>máx</sub> ( $\mu$ ols 6APA/min/mg)	7,1	1,1
Km (mM )	0,67	4,5
Ki 6APA (mM)	7,1	26

Ki ácido fenil acético (mM)	4,8	450
Ki benzil penicilina (mM)	270	não inibe

Com relação às penicilinas G acilases provenientes do *B. megaterium* e da *E. coli*, elas são inibidas pelo produto, competitivamente pelo ácido fenil acético e não competitivamente pelo ácido 6-aminopenicilânico. Deve-se observar também que a penicilina G inibe a enzima produzida por *E. coli* (Ryu et alli; Littly et alli. apud Suga et alli,1990 ; Savidge e Cole, 1975).

Quanto à temperatura e pH ótimos de reação, os valores estão comumente na faixa de 35-37° e pH 7,8-8, dependendo da penicilina acilase utilizada (Shewale e Sivaraman,1989). Esses valores foram encontrados utilizando penicilinas acilases imobilizadas.

Pesquisas mais recentes concernentes à análise da estrutura da penicilina G acilase proveniente de *E. coli* revelam que a enzima é produzida como um precursor de cadeia única consistindo de 846 resíduos de aminoácidos no citoplasma. O precursor é então processado pela remoção de uma sequência de sinais de 26 aminoácidos e um espaçador com 54 aminoácidos, resultando numa enzima “madura” que é um heterodímero de cadeias A e B (209 e 557 resíduos de aminoácidos respectivamente) (Done et alli, 1998). Seu papel “in vivo” permanece não esclarecido, porém o fato que a expressão da enzima seja regulada pelo ácido fenil acético faz com que haja especulações que a enzima possa estar envolvida na assimilação de componentes aromáticos como fonte de carbono (Duggleby et alli,1995 ; Done et alli,1998).

Outra aplicação da penicilina acilase é como catalisador na produção industrial de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. A PGA é um biocatalisador adequado para a síntese cineticamente controlada de antibióticos semi-sintéticos em meios aquosos, sendo que a amoxicilina e a ampicilina são obtidos pela condensação do 6-APA com amida ou éster de D(-)-4-hidroxifenilglicina e D(--fenilglicina, respectivamente (Bruggink et alli,1998).

A preparação desses antibióticos pelos métodos químicos tradicionais vem sendo substituída por métodos enzimáticos, já que estes apresentam grandes vantagens, tais como condições amenas de reação e a não utilização de solventes

altamente tóxicos. Porém, no processo enzimático ocorre hidrólise do produto formado bem como do éster/amida. Com o intuito de melhorar o rendimento de síntese e diminuir a velocidade das reações paralelas vêm sendo realizado diversos trabalhos (Cardias et alli,1998 ; Gonçalves et alli, 1998 ; Bruggink et alli,1998 ; Gonçalves et alli, 2000 ; Ferreira et alli, 2000 ; Gonçalves et alli, 2002 a e b).

## **2.2. *Bacillus megaterium***

O *Bacillus megaterium* é um microrganismo aeróbio que apesar de ser considerado um microrganismo proveniente do solo, pode ser encontrado em alimentos desidratados, água marinha, sedimentos, peixes e até mesmo em mel de abelha (Vary,1994; Bergey,1974).

*B. megaterium* tem capacidade de esporulação e destaca-se dentro do gênero bacilos pelo grande tamanho de suas células vegetativas e dos esporos, daí a origem do seu nome. As células vegetativas mostram-se como cilindros com extremidades arredondadas, apresentando diferentes dimensões dependendo do meio de cultura. Em ágar nutriente variam de 1 a 1,3 $\mu$  por 2,5 a 6 $\mu$ . Os esporos apresentam-se elipsoidais ou centrais com dimensões de 0,8 a 1,2 por 1,5 a 2 $\mu$  (Murao et alli., 1964).

O *Bacillus megaterium* em ágar nutriente cresce de forma ordenada, abundante, liso, aparência gordurosa, translúcido para opaco, branco leitoso para amarelado, sem escurecimento com o tempo. O crescimento em placas mostra formação de colônias circulares, superfície rugosa, margens levemente onduladas, aspecto macio, não espalhada, branco leitoso para amarelado e levemente aderente. Quando cultivado em caldo nutriente por 24horas a 30°C apresenta uma ligeira turvação no meio com pouco sedimento (Murao et alli., 1964), e se cultivado em meio de cultura por tempo prolongado sua coloração pode variar desde uma tonalidade marrom até preta (Bergey, 1974).

Quanto às propriedades fisiológicas, sabe-se que a temperatura ótima de crescimento está em torno de 28° a 35°C, não ocorrendo nenhum crescimento a 45°C ou maior. O pH ótimo está entre 7 a 8,5, e nenhum crescimento ocorre a pH 5 ou menor. Possui, também, forte capacidade para reduzir nitrato em nitrito,

produz amônia, forma ácidos porém não forma gases em glicose, frutose, galactose, maltose, sacarose e amido. Nenhum ácido é formado quando utilizado arabinose, xilose, lactose, sorbitol, e inositol (Murao et alli,1964). Pode facilmente digerir caseína, podendo se reproduzir em meios sem fatores de crescimento, contando apenas com sais de amônia ou nitrato e glicose como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente (Bergey, 1974).

Segundo Vary,1994, sua importância econômica se deve ao fato de produzir penicilina acilase, amilases, glicose desidrogenase, antibióticos (emimicina, oxitanocina ), esteróide hidrolase, e é o microrganismo aeróbio maior produtor de vitamina B12. Além disso é usado crescentemente como hospedeiro para expressão de DNAs recombinantes, devido às diversas vantagens que apresenta. A primeira delas é pelo fato de apresentar as características dos *Bacillus*, ou seja, secreta proteínas facilmente, não tem endotoxina na parede celular e é industrialmente provado como um organismo que dá excelentes rendimentos com substratos baratos. A segunda delas é que não apresenta proteases alcalinas, pois estas interferem nas clonagens em *Bacillus* (Vary, 1994).

O *Bacillus megaterium* tem fascinado microbiologistas desde que foi descrito há mais de 100 anos atrás, especialmente pela sua fisiologia e sua ampla extensão de habitat ecológico. O tamanho grande das células vegetativas e dos esporos o tornam adequados para análises morfológicas, sendo que o *B. megaterium* é uma das poucas linhagens de bacilos que tem a largura maior que 1µm.

### **2.2.1. Esporulação e Germinação de *B. megaterium***

As bactérias que formam endosporos o fazem geralmente durante a fase estacionária em resposta às condições ambientais e metabólicas. Quando nutrientes tais como carbono ou nitrogênio tornam-se limitantes, endosporos altamente resistentes são formados dentro da célula mãe. Com muito pouca frequência, algumas bactérias formam endosporos até mesmo quando nutrientes estão disponíveis. Embora endosporos não sejam metabolicamente ativos, eles

podem sobreviver a longos períodos de escassez e são mais resistentes a altas temperaturas, radiação e algumas substâncias químicas tóxicas (Black, 1996).

A formação do endosporo se inicia pela replicação do DNA formando um material nuclear (axial nucleoid) longo, compacto, como mostrado na Figura 2.2. Os dois cromossomos formados pela replicação separam-se e movem-se para locais diferentes na célula. Em algumas bactérias o endosporo é formado no meio da célula e em outras no final. A maior parte do RNA celular e algumas moléculas de proteína citoplasmática juntam-se em torno do DNA para fazer o núcleo (core) ou a parte viva do endosporo. O núcleo contém ácido dipicolínico e íons cálcio que provavelmente contribuem na resistência ao calor. O septo do endosporo, formado pela membrana celular, cresce ao redor do centro fechando este em uma espessura dupla de membrana celular. Ambas as camadas dessa membrana sintetizam peptoglicano e o liberam no espaço entre as membranas, formando uma camada laminada chamada de córtex. Essa estrutura protege o centro contra mudanças de pressão osmótica, tais como aquelas resultantes de secagem. Uma outra camada, formada de proteína queratina e chamada de capa (impenetrável para muitas substâncias químicas), é colocada em torno do córtex pela célula mãe. Finalmente, em alguns endosporos um exosporio, uma membrana proteica-lipídica, é formada fora da capa pela célula mãe.

Uma vez retornado às condições favoráveis, um endosporo desenvolve uma célula vegetativa, num processo chamado de germinação, que ocorre em três estágios. O primeiro estágio, que é a ativação, usualmente requer algum agente traumático, tais como baixo pH ou calor, que danifica a capa. Sem a danificação, alguns endosporos podem germinar lentamente. O segundo estágio, que é a germinação propriamente, requer água e um agente de germinação (tais como alanina ou certos íons inorgânicos) que penetram a capa danificada. Durante este processo, muito do peptoglicano cortical é rompido e seus fragmentos são liberados no meio. A célula viva agora contém grandes quantidades de água e perde sua resistência ao calor como também a sua refringência (capacidade de brilhar muito com a luz do microscópio). E, finalmente, ocorre o crescimento em um meio com nutrientes adequados. Proteínas e RNA são sintetizados, e em torno

de 1 hora começa a síntese de DNA. A célula agora é uma célula vegetativa e sofre divisão binária (Black, 1996).

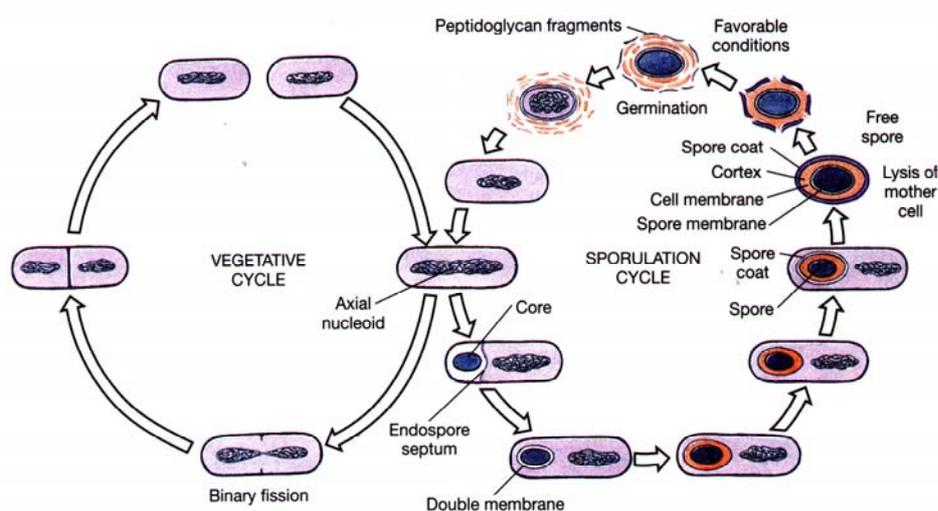


Figura 2.2. Ciclo vegetativo e de esporulação em bactérias capazes de esporular (Black, 1996).

Em bacilos, houve um grande esforço em estudar a esporulação por duas razões. Primeiro, para melhor entender as doenças causadas por esporos, tais como intoxicação gastrointestinal e botulismo, e segundo para usar a diferenciação da célula de *Bacillus* como um sistema modelo para entender o desenvolvimento da célula. Muitos estudos bioquímicos em esporulação foram feitos usando *B. megaterium* por causa do seu tamanho, sua habilidade para esporular em diversos meios e germinar sincronizadamente em uma ampla variação de germinantes.

De acordo com Vary, 1994, o estudo de esporulação em *B. megaterium* foi possível por causa de sofisticadas técnicas moleculares e genéticas, mutantes e mudanças morfológicas observáveis, porém a germinação é mais difícil de entender. Germinação é muito rápida e não é facilmente acompanhada sequencialmente uma vez que eventos iniciais ocorrem no esporo com poucas mudanças morfológicas nesta etapa. Um fato intrigante é que os esporos respondem somente a poucos componentes que conseguem penetrar através de diversas camadas da capa do esporo, a membrana externa, o córtex até o receptor

localizado na membrana interna. Uma vez superadas as diversas camadas, os efeitos são dramáticos e rápidos, utilizando enzimas e outros componentes já presentes no esporo. O resto da germinação é uma sequência de eventos biosintéticos pobremente entendidos, chamado crescimento, que resulta na liberação de uma célula nova metabolicamente ativa dentro de 90min. A sequência desses eventos são: ativação, aumento da sensibilidade ao calor, inchaço, liberação de ácido dipicolínico e hexosamina, início do metabolismo, geração de ATP, síntese de RNA e DNA, síntese de proteínas e finalmente o aparecimento da célula e divisão.

Foi concluído por Vary, 1994, a partir dos dados encontrados em literatura, que existem pelo menos 2 tipos de esporos de *B. megaterium*, determinados não só pela morfologia do esporo, mas também pela resposta aos agentes germinantes. Analisando os esporos das linhagens KM e QM B1551 verifica-se que são morfologicamente distintos. O esporo de QM B1551 apresenta uma espessa capa externa e exospório enquanto o KM apresenta uma simples capa sem exospório. Igualmente, a germinação parece ser diferente em KM e QM B 1551. Os dados mostram que QM B1551 germina em quase todos os substratos testados enquanto KM germina somente em alanina ou alanina + inosina. A partir de uma análise de 21 linhagens de *B. megaterium* e 25 outras linhagens de 13 bacilos verificou-se que existem 2 tipos de esporos: aqueles similares ao KM que germina somente em alanina e aqueles similares ao de QM B1551 que respondem a uma ampla faixa de germinantes.

### **2.3. Produção de PGA por *Bacillus megaterium***

Dentre os microrganismos produtores de PGA, *Bacillus megaterium* é um dos poucos que a produz de modo extracelular, o que torna particularmente interessante o estudo do processo de produção dessa enzima utilizando esse microrganismo, pois o fato de não precisar ruptura das células para recuperação da enzima torna o processo menos caro.

Porém, pesquisa e desenvolvimento na produção e uso de PGA têm sido realizadas principalmente com a enzima obtida de *Escherichia coli*, de modo

intracelular (Balasingham et alli.,1972, ; Alvaro et alli.,1990, ; Guan et alli.,1992; Robas et alli., 1993), sendo que as informações sobre PGA de *B. megaterium* são dispersas e principalmente protegidas por segredo industrial (Illanes et alli., 1994).

Dentre os trabalhos encontrados na literatura, os autores demonstraram que a produção da enzima é função da composição do meio e das condições operacionais utilizadas.

Chiang e Bennett, 1967, quando realizaram o trabalho referente à purificação e propriedades de PGA por *B. megaterium*, utilizaram o método descrito por Murao et alli,1964 para a obtenção da enzima, no qual observaram que o crescimento máximo das células ocorreu após um período de incubação de 20 a 24 horas, ao mesmo tempo em que a concentração de enzima começou gradualmente aumentar e continuou durante o período de observação de 96h, não evidenciando lise das bactérias ao longo desse período de incubação.

Os mesmos constataram que a penicilina acilase de *Bacillus megaterium* é específica para benzil penicilina (penicilina G), mostrando uma atividade muito menor com relação a outras penicilinas que contêm outros grupos químicos em lugar do grupo fenil acetato.

Chiang e Bennett, 1967, verificaram também que a atividade enzimática é inibida quando uma quantidade de produtos é acumulada. Os dados dos autores indicam que os dois produtos são inibidores, sendo o ácido fenil acético um inibidor competitivo ( $K_i = 0,45M$ ) e o 6-APA um inibidor não competitivo ( $K_i=2,6 * 10^{-2} M$ ). A constante de Michaelis Menten da enzima foi estimada a partir de gráficos, dando um valor de  $4,5 * 10^{-3}M$ , tendo como substrato a benzil penicilina.

Acevedo e Cooney,1973, estudaram o efeito da limitação por nitrogênio, enxofre e fósforo na produção da enzima em culturas contínuas. Para tal propósito desenvolveram um meio definido, que continha histidina como única fonte de nitrogênio. Os resultados demonstraram que a produção da enzima é função das condições limitantes de crescimento e da concentração do ácido fenil acético, indutor da reação. A produção de enzimas por microrganismos é controlada por diversos mecanismos regulatórios que dependem das condições do meio de

cultura, enquanto que a velocidade de crescimento pode ser controlada apenas por um nutriente limitante.

Quanto ao indutor, demonstrou que a baixas concentrações estimula o crescimento e atua como indutor da síntese de PGA, porém a altas concentrações inibe o crescimento e a produção, principalmente no início, portanto o ácido fenil acético só foi incorporado ao meio após 10 horas de inoculação, encontrando-se um valor ótimo de 1g/L.

Os autores concluíram que, sob condições estáveis, a produção da enzima muda com a natureza do nutriente limitante e a velocidade de diluição, sendo que para as condições estudadas, as culturas limitadas por enxofre resultaram em atividades enzimáticas maiores que aquelas com limitação de nitrogênio e fósforo.

Illanes et alli.,1994, estudaram a produção de penicilina acilase por *Bacillus megaterium* em meios complexos e definidos, demonstrando que a secreção da enzima é muito dependente do meio, sendo que um elevado nível de fósforo inorgânico favorece a produção. Verificaram, ainda, que para altos níveis de fósforo, a maior parte da enzima produzida foi secretada e somente uma pequena porção permaneceu associada à célula. Entretanto, em baixas concentrações de fósforo inorgânico, aumenta a atividade associada às células e diminui a atividade total. O efeito do fósforo inorgânico pode estar relacionado com a permeabilidade celular ou ao próprio efeito metabólico.

Determinaram também que a penicilina acilase é induzida pelo ácido fenil acético (AFA), encontrando um valor de 1,5 g/L como concentração ideal quando adicionado ao meio fermentativo próximo do início da fermentação, onde a concentração celular era 0,2 g/L (aproximadamente 8 horas de inoculação). Quando o ácido fenil acético foi adicionado ao meio mais cedo obteve-se apenas um pequeno decréscimo na produção de PGA, porém a adição posterior a esse tempo foi prejudicial. Esses valores ótimos foram obtidos para ambos os meios, definido e complexo.

Um outro resultado obtido foi em relação à glicose, que se comporta como repressora da síntese da penicilina acilase. Verificaram que a produção de PGA em meio complexo ocorreu principalmente depois do consumo da glicose, atrasando o início da síntese, o qual pode ser atribuído à repressão catabólica.

Quando a glicose foi omitida do meio complexo, tanto a produção de PGA como a produtividade foram maiores, e somente um pequeno decréscimo foi observado na taxa de crescimento específica. Isto pode ser observado na Tabela 2.4. (Illanes et al., 1994).

Tabela 2.4. Produção de Penicilina Acilase em meio complexo e definido (Illanes et all., 1994).

Meio	Complexo	Complexo <sup>a</sup>	Definido
Concentração celular (g/L)	2,5	2,6	1,9
Taxa de crescimento específico (h <sup>-1</sup> )	0,38	0,30	0,31
Produção de PA ( UI/L)	168	220	158
Produtividade de PA (UI/L*h)	5,7	10,8	3,2 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Sem glicose;

<sup>b</sup> Produtividade aumentada para um valor máximo de 8,9 quando o ácido fenil acético foi adicionado mais tarde ao meio de cultura.

Gentina e colaboradores,1997, utilizando meio semelhante ao de Illanes et alli,1994, verificaram o efeito de diferentes fontes de nitrogênio complexas na síntese e secreção de PGA por *B. megaterium*, obtendo como melhor substrato a caseína hidrolisada ácida, devido ao maior conteúdo de aminoácidos livres em comparação com as outras fontes utilizadas.

Hojo, 1997, com o intuito de verificar a influência da composição do meio na produção da enzima, utilizou a técnica do planejamento composto central tendo como variáveis as concentrações dos componentes do meio de cultura e como resposta a atividade enzimática específica. Os efeitos das variáveis sobre a resposta foram analisadas pelo método da análise canônica da superfície de resposta, o qual permitiu encontrar os pontos ótimos dentro da região de experimentação, e portanto o meio ótimo de cultura para a produção da enzima, encontrando as seguintes concentrações: 2,0 a 2,4 g/L de AFA, 5,0 a 8,0 g/L de glicose, 30,0 a 50,0 g/L de CHE, 7,3 a 8,0 g/L de carbonato de cálcio.

Também verificaram, anteriormente a esses ensaios, que o melhor tempo de incubação do inóculo foi 72 horas, apresentando um declínio em 96 horas de cultivo. As condições operacionais ótimas encontradas para a produção da enzima

em fermentador foram : concentração de oxigênio dissolvido de 20% de saturação na fase de crescimento e 10% de saturação na fase de produção, ausência de controle de pH, adição de AFA após 10 horas da inoculação, 30° C. Essas condições permitiram a obtenção da produção de PGA em torno de 250 UI/L caldo, valores semelhantes aos obtidos por Illanes et alli., 1994.

Berazaín,1997, utilizou o soro de queijo como fonte de carbono na produção de PGA por *Bacillus megaterium*, visando aliar a redução do custo de produção da enzima à diminuição da carga poluente nos rios causada por esse rejeito de laticínio, isso porque apenas 60% desse subproduto com quantias importantes de proteínas, lactose, gordura e vitaminas são aplicados para a fabricação de produtos para consumo humano ou animal, sendo o restante desprezado como carga poluente. Os autores concluíram que o soro de queijo demonstrou ser muito efetivo para ser utilizado como fonte de carbono no meio de cultura.

Visnardi,1997, estudou a influência da concentração de oxigênio dissolvido no processo de produção de PGA. Dentre os ensaios realizados observou que altas concentrações de oxigênio dissolvido não favorece a produção da enzima, o que está em concordância com outros autores (Cole,1969 ; Kufmann et al,1960 apud Shewale e Sivaraman, 1989) quando se referem à produção de PGA por *E. coli*. Segundo Vaz,1978, apud Shewale e Sivaraman, 1989, manter o oxigênio dissolvido em baixas concentrações no processo é um dos principais fatores que contribuem para a produção de penicilina acilase em grande escala. Visnardi, 1997 , também observou que a muito baixas concentrações de oxigênio dissolvido (5% do valor de saturação) não houve produção da enzima, encontrando melhores atividades enzimáticas quando utilizou 20% de saturação nas primeiras horas e 10% de saturação a partir da 12° hora. Contudo, Hojo,1997 e Visnardi,1997, não chegaram as mesmas conclusões com relação ao momento de mudança da concentração de O<sub>2</sub> fornecido. Hojo,1997, ao tentar reproduzir ensaio de Visnardi,1997 obteve baixa produção de enzima. Em novo ensaio, onde diminui a saturação de O<sub>2</sub> de 20% para 10% em 8 horas de cultivo conseguiu atingir 250UI/L de PGA. Esse ponto permaneceu, pois, a ser esclarecido.

Outra contribuição de Visnardi,1997, é referente à relação entre o crescimento celular e a quantidade de gás carbônico produzido, sendo que esta relação foi encontrada somente para fermentações em que se obteve maiores produções de PGA (250 UI/L). Para as demais fermentações, onde conseguiu apenas traços de PGA, não encontrou uma relação direta entre o crescimento específico e o CO<sub>2</sub> produzido, o que levou a crer que esta relação é linear quando os fluxos metabólicos do microrganismo têm comportamento regular, indicando balanceamento das reações bioquímicas.

Pinotti,1999, verificou a influência da fonte de nitrogênio, bem como da fonte de carbono na produção da enzima, utilizando diferentes meios reportados na literatura (Hojo,1997, ; Berazaín,1997, ; Illanes et alli, 1994). Em relação à fonte de carbono, a cepa utilizada apresentou maior sensibilidade à repressão por glicose do que a utilizada por Hojo (1997). Com diferentes fontes de lactose (soro de queijo seco, “in natura” e lactose PA) a produção de PGA aumentou quando utilizado soro de queijo ao invés de lactose PA como fonte de carbono, o que mostrou que os micronutrientes presentes neste são importantes na produção de PGA.

Quanto à fonte de nitrogênio, foram testadas caseínas hidrolisadas enzimaticamente com diferentes proteases. Os melhores resultados foram obtidos utilizando hidrolisado com Alcalase<sup>®</sup>, que estava relacionado ao maior grau de hidrólise da caseína (verificado pela curva de hidrólise e por dosagem de proteína), ou seja, maior disponibilidade de aminoácidos e pequenos peptídeos para o microrganismo.

Os resultados constataram que a produção de PGA é fortemente dependente da fonte de nitrogênio e de carbono, obtendo-se maiores concentrações de enzima (138 UI/L) quando se utilizou caseína hidrolisada com Alcalase<sup>®</sup>, como fonte de nitrogênio, e lactose (soro de queijo “in natura”), como fonte de carbono.

Como pode ser observado nas descrições acima, a produção de PGA por *B. megaterium* varia amplamente quando fornecidas concentrações e/ou substratos de fontes diferentes, portanto é de suma importância conhecer as verdadeiras exigências nutricionais que o microrganismo necessita para a produção de enzima.

Torna-se necessário, assim, um estudo mais sistemático das exigências nutricionais desse microrganismo.

### **2.3.1. Requerimentos nutricionais dos microrganismos no meio de cultivo**

Todos os microrganismos precisam encontrar em seu ambiente as substâncias requeridas para geração de energia e biosíntese celular. Em laboratório os meios de cultura são projetados para fornecer todos os nutrientes essenciais para o crescimento dos microrganismos.

A nível elementar, as exigências nutricionais requeridas pelos microrganismos são reveladas pela composição elementar da célula. Esses dados não são disponíveis para o *B. megaterium*, mas é encontrado para a *E. coli*, que também é uma bactéria produtora de PGA, a qual consiste de C, H, O, N, S, P, K, Mg, Fe, Ca, Mn e traços de Zn, Co, Cu e Mo. As funções fisiológicas gerais dos elementos são mostrados na Tabela abaixo ([www.bact.wisc.edu/bac303](http://www.bact.wisc.edu/bac303), 1997).

Tabela 2.5. Elementos principais, suas fontes e funções nas células bacterianas

Elemento	% de peso seco	Fonte	Função
Carbono	50	Compostos orgânicos ou CO <sub>2</sub>	Principal constituinte do material celular
Oxigênio	20	H <sub>2</sub> O, compostos orgânicos, CO <sub>2</sub> e O <sub>2</sub>	Constituinte do material celular e água celular; O <sub>2</sub> é elétron acceptor em respiração aeróbica
Nitrogênio	14	NH <sub>3</sub> , NO <sub>3</sub> , compostos orgânicos, N <sub>2</sub>	Constituinte de aminoácidos, nucleotídios e coenzimas
Hidrogênio	8	H <sub>2</sub> O, compostos orgânicos, H <sub>2</sub>	Principal constituinte de compostos orgânicos e água celular
Fósforo	3	Fosfatos inorgânicos (PO <sub>4</sub> )	Constituinte de ácidos nucleicos, nucleotídios, fosfolípidios, LPS e ácidos
Enxofre	1	SO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> S, S <sub>0</sub> , compostos de enxofre orgânico	Constituinte de cisteína, metionina, glutathione e diversas coenzimas
Potássio	1	Sais de potássio	Principal cátion inorgânico celular e cofator para certas enzimas
Magnésio	0,5	Sais de magnésio	Cátion celular inorgânico, cofator para certas reações enzimáticas
Cálcio	0,5	Sais de cálcio	Cátion celular inorgânico, cofator para certas enzimas e um componente de endosporos

Ferro	0,2	Sais de ferro	Componente de citocromos e um cofator para algumas reações enzimáticas
-------	-----	---------------	--

Com relação aos traços de elementos (íons de metal), as quantidades requeridas são tão pequenas que é difícil detectá-las e portanto, não é necessário adicionar ao meio de cultura, pois estão presentes como “contaminantes” da água ou em outros componentes do meio. Geralmente agem como cofatores para reações enzimáticas essenciais na célula ([www.bact.wisc.edu/bac303](http://www.bact.wisc.edu/bac303), 1997).

Bauer et al.,1976, apud Castillo,1997, determinaram a composição elementar para três linhagens de *E. coli*, sendo praticamente igual para os três microrganismos, como pode ser observado na Tabela 2.6.

Tabela 2.6. Composição elementar da massa seca de *E. coli* B, *E. coli* MRE 600 e *E. coli* K13-3300 (Bauer et al, 1976, apud Castillo, 1997)

Microrganismo	Elemento				
	C (%W/W)	H (%W/W)	N (%W/W)	P (%W/W)	O (%W/W)
<i>E. coli</i> B	45,39	6,70	12,79	2,01	29,6
<i>E. coli</i> MRE 600	45,50	6,92	11,63	2,52	30,4
<i>E. coli</i> K-12-3300	43,06	7,03	12,79	2,40	31,6

Cooney, 1981, apud Castillo,1997, juntou dados obtidos por vários autores da composição elementar de bactérias e da quantidade de cada um dos nutrientes adicionados ao meio de cultivo relativas ao nitrogênio (Tabela 2.7). Muitos dos nutrientes são adicionados em excesso ao requerido, por exemplo P, K, contudo, outros estão em concentrações próximas às limitantes, por exemplo Zn, Ca.

Tabela 2.7. Concentrações dos elementos nutricionais relativas ao nitrogênio em células bacterianas e em meios de cultivo comumente utilizados ( Cooney, 1981, apud Castillo,1997)\*.

Elementos	Célula X**	n***	Meio X**	n***
N	100		100	
P	23	25	176	66
K	14	24	201	65
S	8,9	7	59	70
Mg	4,9	27	15	74
Na	3,2	8	66	41
Ca	3,0	25	11	47
Cl	2,5	3	123	29
Fe	0,3	20	2,2	60
Zn	0,14	6	0,13	26
Cu	0,03	21	0,04	27
Mn	0,05	20	0,15	26
Co	0,003	2	0,02	13
Mo	0,002	3	0,09	17
B	0,006	11	0,01	9

(\*) valores médios de dados publicados para bactérias Gram positivas e Gram negativas crescendo em meio mineral.

(\*\*) X é a proporção do elemento em relação ao nitrogênio; (\*\*\*) n é o número de referências bibliográficas.

Outro fator importante no estudo do crescimento do microrganismo são os fatores de conversão ( $Y_{X/S}$ ) dos diferentes elementos que compõem a célula. Essa relação estequiométrica nos fornece o rendimento da biomassa produzida pela quantidade do elemento consumido, o que possibilita uma melhor estimativa do meio de cultivo, tanto nas concentrações utilizadas como na escolha de um determinado substrato utilizado para suprir um determinado elemento ( Bailey e Ollis, 1986).

Dados encontrados referem-se à *E. coli*, porém como *B. megaterium* também é uma bactéria, acredita-se que seja possível utilizar os dados disponíveis para *E. coli*, pelo menos para os cálculos iniciais de concentrações mínimas de nutrientes. Na Tabela 2.8 encontram-se fatores de conversão para diferentes

linhagens de *E. coli* a duas temperaturas em cultivos sem limitação de glicose, realizado por Bauer et al, 1976, apud Castillo, 1997.

Tabela 2.8. Fatores de conversão de *E. coli* B, *E. coli* MRE 600 e *E. coli* K12-3300 (Bauer et al, 1976 apud Castillo, 1997).

Microrganismo	t (°C)	Y <sub>X/G</sub>	Y <sub>X/N</sub>	Y <sub>X/P</sub>	Y <sub>X/O</sub>
<i>E. coli</i> B	25	0,39	-	-	0,47
	30	0,39	7,8	50	0,77
<i>E. coli</i> MRE 600	25	0,46	8,6	-	1,07
	30	0,49	-	40	1,37
<i>E. coli</i> k12-3300	25	0,32	7,8	-	0,55
	30	0,31	-	42	0,59

Existem 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 não são metabolizados diretamente como fontes de carbono ou energia, mas são assimilados para cumprir um papel específico no metabolismo da célula. Na Tabela 2.9 são mostradas algumas vitaminas que são frequentemente requeridas por certas bactérias como fatores de crescimento e suas funções. 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.

Tabela 2.9. Vitaminas comuns requeridas na nutrição de certas bactérias

Vitaminas	Forma na coenzima	Função
Ácido p-aminobenzóico	-	Precursor para a biosíntese de ácido fólico
Ácido fólico	Ácido tetraidrofólico	Transferência de 1-carbono e requerido para síntese de tiamina, serina, metionina e pantotenato
Biotina	Biotina	Reações biosintéticas que requerem fixação de CO <sub>2</sub>
Ácido lipóico	Lipoamida	Transferência de hidrogênio e Grupo acil
Ácido nicotínico	NAD e NADP	Portador de elétrons em reações de desidrogenação
Ácido pantotênico	Coenzima A	Oxidação de ácidos ceto e portador de grupos acil
Piridoxina (B6)	Fosfato de piridoxal	Reações de transferência de aminoácidos
Riboflavina (B2)	FMN e FAD	Reações de oxidação-redução
Tiamina (B1)	Tiamina pirofosfato	Descarboxilação de ácidos ceto
Vitamina B12	Desoxiadenosil cobalamina	Transferência de grupos metil
Vitamina K	Quinonas e naftoquinonas	Processos de transporte de elétron

Dada a variedade de tipos de microrganismos, é difícil encontrar um meio universal que atenda às necessidades de todos os microrganismos. Muitas vezes, o que é exigido por um, inibe totalmente o crescimento de outros. Assim, para compor um meio adequado, é necessário conhecer algo a respeito do microrganismo ou senão trabalhos exaustivos são necessários.

O desenvolvimento de meios sintéticos com o intuito de verificar as verdadeiras exigências nutricionais dos microrganismos vêm sendo amplamente utilizados, pois os meios complexos fornecem numerosos e desconhecidos nutrientes suportando um bom crescimento para os microrganismos, porém as

exatas necessidades nutricionais não ficam esclarecidas (Cocain-Bousquet et alli.,1994, ; Phan-Thanh e Gormon, 1996). A seguir, são apresentados alguns estudos relacionados ao desenvolvimento de meios sintéticos que proporcionam maior esclarecimento a respeito das necessidades do microrganismos, tanto no sentido do crescimento celular como na obtenção de produtos desejados.

Chaloupka et al., 1966, verificaram o efeito de alguns aminoácidos na produção de proteases por *B. megaterium* KM. Os dados encontrados em literatura pelos autores reportam que, na maioria dos casos, a formação de proteases por actinomicetos e bacilos diminui na presença de aminoácidos. Conforme os autores, proteases são formadas e liberadas no meio durante o crescimento da cultura em meio sintético contendo sais e glicose, embora também tenham sido sintetizadas em um meio livre de nitrogênio, onde as células não estavam crescendo. Quando foram adicionados aminoácidos individuais ou misturas destes no meio de cultivo a síntese de enzimas decresceu substancialmente. Os aminoácidos que apresentaram maior efeito inibitório foram a treonina, isoleucina, leucina e valina, porém quando foi adicionado uma mistura de aminoácidos (13), que individualmente não reprimiam a síntese, ocorreu uma repressão muito maior que quando utilizado treonina, indicando um efeito aditivo. Também foi de conclusão dos autores que a inibição era causada por L-isômeros, pois quando adicionado o dobro das concentrações de aminoácidos na forma DL o decréscimo foi o mesmo.

Neidhardt e colaboradores, 1974, desenvolveram um meio sintético mínimo para cultivo de enterobactérias. Esse novo meio, no qual os macronutrientes (fosfato, sulfato e nitrogênio) estão presentes em quantidades suficientemente baixas para permitir seguimento isotópico, manteve o crescimento de *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* a taxas comparáveis com os meios sintéticos tradicionais que utilizam altas concentrações de fosfato.

Os principais objetivos ao desenvolver esse meio eram: (i) encontrar reprodutibilidade da composição química; (ii) satisfazer as necessidades nutricionais das células determinadas experimentalmente ; (iii) evitar um excesso desnecessário das principais espécies iônicas ; (iv) facilitar o ajuste dos níveis de espécies iônicas individuais, tanto para seguimento isotópico como para estudos

nutricionais; (v) fornecer uma completa ordem de micronutrientes ; (vi) fixar um íon particular como fator limitante quando a fonte de carbono e energia está em excesso e finalmente (vii) fornecer máxima conveniência na manufatura e estocagem do meio.

Os autores utilizaram diversas linhagens *E. coli* e *S. typhimurium* para testar as várias formulações do meio mínimo, com o intuito de encontrar um meio simples que seja possível para ambas espécies de enterobactérias. Também vários meios mínimos já existentes foram usados para efeitos comparativos. Os experimentos para encontrar os requerimentos mínimos de nutrientes foram realizados da seguinte forma: Culturas de *E. coli* e *S. typhimurium* crescendo durante à noite em um meio MPOS-glicose (meio sintético já existente) foram inoculadas em frascos contendo o mesmo meio, porém contendo diferentes quantidades de um nutriente particular. Esses experimentos foram realizados para diferentes nutrientes. O crescimento foi monitorado cuidadosamente e o ponto onde o crescimento desacelerou foi estimado do gráfico. Esse ponto definiu a concentração mínima necessária de um determinado nutriente capaz de suportar taxa de crescimento constante. As taxas de crescimentos das culturas foram expressadas como uma função da concentração inicial dos nutrientes.

Essa estratégia utilizada pelos autores foi suficiente para definir os requerimentos das fontes de carbono e energia (glicose), fosfato, sulfato, magnésio e nitrogênio (como íon amônio), porém para alguns micronutrientes (cobre, manganês, cobalto, molibdênio e zinco) foi necessário adotar uma estratégia diferente, devido a ausência de métodos sensíveis para as quantidades requeridas. Os componentes de uma solução de micronutrientes (Machlis), que foi desenvolvida para suportar crescimento de fungos, foram testados individualmente para verificar se havia toxicidade. Efeitos inibitórios foram verificados somente com concentrações acima de 1000 vezes que aquelas presentes na solução Machlis. Portanto, foi especificado uma concentração de 10 vezes maior que Machlis no meio para assegurar que as células bacterianas estejam saturadas por esses micronutrientes e que as flutuações de um laboratório para outro devido aos níveis de contaminação de outros componentes sejam insignificantes.

Cocaign-Bousquet et alli.,1995, formularam um meio sintético simples para o crescimento contínuo de duas linhagens de *Lactococcus lactis*, uma de origem vegetal e a outra de laticínios. Ambas linhagens cresceram mais rapidamente em um meio complexo que em um meio sintético definido. A formulação do meio foi realizada através da técnica de omissão simples de cada componente de um meio sintético não otimizado para determinar os verdadeiros requerimentos nutricionais (meio mínimo). O meio sintético utilizado pelos autores foi um descrito por Otto et al. (1983) e modificado por Poolman e Konings (1988). Esse meio contém virtualmente todos os blocos de construção necessários para síntese da biomassa na forma de aminoácidos, nucleotídeos, vitaminas e sais minerais. Embora este meio seja de composição definida nem a composição ou a concentração dos vários componentes estão otimizadas, e os verdadeiros requerimentos nutricionais das linhagens de *L. lactis*, que permitem que o meio seja simplificado, são desconhecidos.

Segundo os autores muitos pesquisadores estão tentando identificar, pelo menos parcialmente, os requerimentos orgânicos para diferentes espécies de bactérias lácticas. Há, contudo, consideráveis variações de uma espécie para outra. Com relação às vitaminas, requerimento para ácido nicotínico e pantotênico parece ser comum entre espécies de lactococos e lactobacilos, embora para as outras vitaminas foram observadas diferenças no comportamento. Bases nitrogenadas são geralmente estimulantes ou necessárias para o crescimento de todas as bactérias lácticas. Com relação aos requerimentos dos aminoácidos, um estudo realizado para diversas espécies, empregando a técnica de omissão simples, verificou que a remoção de seis aminoácidos (ácido glutâmico, valina, metionina, leucina, isoleucina e histidina) impedia o crescimento de todas as espécies.

Ainda, as duas linhagens estudadas por estes autores cresceram quando Ca, Zn, Co ou Fe foram removidos do meio, porém quando Mg foi omitido o crescimento parou rapidamente, indicando um requerimento absoluto para magnésio. A adição de vários outros oligoelementos não contidos no meio original (Mn, Mo, B, Cu e Li) não provocaram nenhum aumento na taxa de crescimento. Quando as bases adenina, guanina, uracil e xantina foram removidas

do meio, os pesquisadores observaram uma diminuição de 35% na taxa de crescimento. Somente as vitaminas nicotinamida e pantotenato mostraram-se essenciais para o crescimento.

Para caracterizar os requerimentos com relação aos aminoácidos, as linhagens cresceram na ausência de aminoácidos individuais ou de famílias metabólicas inteiras. Inicialmente uma das linhagens (origem vegetal) mostrou-se prototrófica para todos os aminoácidos exceto valina, e em algumas omissões a taxa de crescimento diminuiu. Com relação à outra linhagem, os requerimentos foram idênticos, salvo a necessidade de adição de riboflavina ao meio. Dos resultados obtidos, aparentemente nenhum aminoácido parecia ser essencial ao crescimento, porém quando todos foram removidos juntos não foi verificado nenhum crescimento, sendo necessário a adição de seis aminoácidos (Glu, Met, Ile, Leu, Val, Ser) para o meio de cultivo da linhagem vegetal e mais três (Arg, His, Thr) para a linhagem de laticínio.

Os autores também removeram o sal de amônio do meio e verificaram que não houve efeito no crescimento, ilustrando que os aminoácidos fornecidos satisfazem o requerimento de nitrogênio para síntese de biomassa.

Neviani et alli., 1995, investigaram a relação entre o requerimento de aminoácidos e a atividade peptidase em três linhagens de *Streptococcus salivarius subsp. Thermophilus*. Eles utilizaram um meio sintético sem componentes nitrogenados e um meio composto de leite sem a fração de nitrogênio não proteico (leite RD), no qual acrescentaram diferentes misturas de aminoácidos. O estudo dos requerimentos nutricionais de aminoácidos das bactérias lácticas e suas possíveis relações com o sistema de enzimas peptidases pode ajudar a explicar a habilidade desses microrganismos de crescerem em leite.

O objetivo de realizar os experimentos em 2 diferentes meios era para verificar se este interferiria na quantidade de peptidase produzida, isto porque o leite contém níveis baixos de aminoácidos livres e oligopeptídeos, os quais são insuficientes para permitir crescimento ótimo de estreptococos lácticos, sendo portanto necessário proteólise para liberar aminoácidos e pequenos peptídeos das proteínas do leite.

Quando os pesquisadores utilizaram o meio sintético os seguintes testes foram realizados para cada linhagem: cultivo sem adição de aminoácidos (controle negativo); cultivo suplementado com mistura de 18 aminoácidos (controle positivo) e cultivos suplementados com diferentes misturas de aminoácidos caracterizado pela omissão de um aminoácido individual a cada tempo (17 aminoácidos). O crescimento das culturas foi comparado entre si. O mesmo procedimento experimental foi usado para estudar a influência de uma mistura de aminoácidos na ausência de cisteína (controle positivo com 17 aminoácidos e os testes com 16 deles). Para o meio composto de leite RD os aminoácidos foram adicionados da mesma maneira, porém mudou o modo de detecção do crescimento.

Os resultados obtidos pelos autores mostram a importância dos aminoácidos para o crescimento das três linhagens, como também permitiu determinar os respectivos requerimentos. As linhagens mostraram diferentes requerimentos de aminoácidos e as diferenças foram mais óbvias quando as bactérias cresceram em meio livre de nitrogênio, mas foram menos evidentes em leite RD, onde os microrganismos podem provavelmente usar as proteínas do leite como fonte de aminoácidos essenciais. Os autores encontraram similaridades entre perfis de atividade peptidase e requerimentos nutricionais das linhagens de estreptococos. Linhagens com mais alto requerimento de aminoácidos exibiram maior diversidade de atividades aminopeptidase, mostrando que as linhagens que requerem esses nutrientes produzem enzimas capazes de produzir esses requerimentos durante o crescimento em leite.

Também trabalhando com uma bactéria láctica, Vuyst, 1995, estudou os fatores nutricionais que afetam a produção de nisin (bacteriocina) por *Lactococcus lactis subsp. Lactis* NIZO 22186 em um meio sintético. Como já verificado para diferentes produtos microbianos e neste caso também, a produção de nisin em meio sintético é muito menor quando comparado com meio complexo (370 versus 1800 UI/ml). No entanto, a necessidade de um meio sintético simples para facilitar os processos de purificação de bacteriocinas, já que estas são moléculas de difícil recuperação, fez com que o autor formulasse um meio sintético mínimo.

Para avaliar os requerimentos nutricionais e formular o meio sintético mínimo o crescimento do microrganismo foi acompanhado em meio sintético (SM) faltando um dos componentes. Os requerimentos mínimos de aminoácidos para crescimento foram os mesmos requeridos para a produção de nisin. Desses experimentos o autor concluiu que os aminoácidos histidina, isoleucina, arginina, treonina leucina, valina, metionina e ácido glutâmico foram essenciais para o crescimento de *Lactococcus lactis subsp. Lactis* NIZO 22186 a níveis normais ou máximos. A omissão de um deles ainda permitiu crescimento a baixas taxas, indicando que o microrganismo possui os genes para a biosíntese desses aminoácidos. A omissão de ácido glutâmico não permitiu nenhum crescimento e produção de nisin, mostrando seu absoluto requerimento no meio de cultivo.

Os aminoácidos serina, treonina e cisteína estimularam altamente a produção de nisin sem afetar o rendimento celular final, no qual indica que eles tem um papel de precursor durante a síntese de nisin. A cisteína foi a que mais afetou quando comparado com os outros aminoácidos precursores, sendo concluído, portanto, que a biosíntese de cisteína pela célula microbiana é muito mais complexa que a biosíntese de serina e treonina.

Também foi investigado pelo autor o efeito de adicionar maior concentração desses aminoácidos precursores, bem como adicioná-los simultaneamente na mesma concentração anterior (0,1%). Foi verificado um efeito inibitório quando se utilizou maior concentração, provavelmente devido a inibição feedback. No entanto, quando foram adicionados simultaneamente, ocorreu uma duplicação na concentração de nisin, mostrando que os aminoácidos serina, treonina e cisteína são os componentes limitantes do pool de aminoácidos intracelulares, requerendo a alimentação desses nutrientes em fermentações de regime batelada alimentada.

Quanto à fonte de enxofre, o autor verificou que a biosíntese de nisin é fortemente dependente desse componente. *Lactococcus lactis subsp. Lactis* pode usar tanto a fonte de enxofre orgânico (metionina, cisteína ou cistationia) como inorgânico (sulfato de magnésio ou tiosulfato de sódio).

Phan-Thanh e Gormon, 1996, utilizando meio sintético mínimo já reportado na literatura, conseguiram encontrar um melhor crescimento de várias

linhagens de *Listeria* incorporando diversas vitaminas e fatores de crescimento nesse meio. Os fatores de crescimento foram os aminoácidos triptofano, fenilalanina e histidina, a base nitrogenada adenina e as vitaminas nicotinamida, piridoxal, para-aminobenzóico e pantotenato de cálcio. Embora tenham conseguido atingir um bom crescimento celular para várias linhagens, este não foi igual a um atingido utilizando-se meio complexo, mas provou ser bom o suficiente para ser usado nos casos em que um meio indefinido seja indesejável.

Enquanto alguns fatores tem ligeiro ou nenhum efeito no crescimento de algumas linhagens de *Listeria*, para outras foram notadamente estimulatórios ou essenciais para o crescimento (Siddiqi e Khan, 1982, apud Phan-Thanh e Gormon, 1996). Entre as bases nitrogenadas só foi adicionada adenina, pois citosina apresentou-se inibitória para algumas linhagens e guanina e uracil tiveram somente um fraco efeito na maioria das linhagens de *Listeria*. Esses diferentes efeitos, e as vezes contraditórios, reportados por diferentes autores referentes aos requerimentos nutricionais de *Listeria* refletem a diversidade de condições genéticas e ecofisiológicas de linhagens bacterianas. Algumas linhagens sob determinadas condições ambientais podem carecer de enzimas metabólicas (Phan-Thanh e Gormon, 1996).

Potter et al., 1996, investigaram o efeito da adição de isoleucina, valina e leucina, na produção de sintetase ácido acetohidroxi (AHAS) e sintetase isopropilmalato (IPMS) por *Streptomyces coelicolor*. Essas enzimas são justamente produzidas durante a biosíntese de isoleucina-valina e leucina respectivamente, sendo portanto, objeto de estudo dos autores verificar se a disponibilidade desses aminoácidos no meio de cultivo influenciaria na produção dos mesmos e conseqüentemente na produção das enzimas.

As atividades específicas de ambas enzimas foram similarmente afetadas quando o meio mínimo foi suplementado com aminoácidos isolados ou em combinação. A isoleucina sozinha causou um aumento de 2 a 3 vezes, enquanto que a adição dos três aminoácidos simultâneos fez com que a atividade das enzimas diminuísse em torno de 5 a 8 vezes. As demais adições individualmente ou em par não afetaram a produção de enzimas, exceto a adição do aminoácido

leucina que causou um decréscimo na atividade de IPMS, sendo possível que a enzima esteja sujeita à inibição feedback por leucina.

Foram também realizados pelos autores diferentes experimentos com *S. coelicolor* auxotrófico, verificando que ocorre variação das atividades específicas não só sob diferentes condições fisiológicas mas genéticas também. Essa variação foi observada dentro de uma determinada faixa estudada, indicando que *S. coelicolor* tem mecanismos moleculares capazes de produzir uma resposta em relação às diferentes condições estudadas.

Stuart et alli.,1999, examinaram a influência de lactose e arginina na viabilidade e culturabilidade de duas linhagens de *Lactococcus lactis*, como também o uso de aminoácidos durante a exaustão de carboidrato. *L. lactis* é uma bactéria homofermentativa que em crescimento ótimo fermenta lactose para ácido láctico e ATP, sendo que a ausência de lactose causa imediata exaustão de energia pois estes microrganismos não possuem polímeros estoques de carboidratos.

No entanto, muitos microrganismos tem a habilidade para usar fontes alternativas de carbono para energia. Em resposta à exaustão de carboidrato, muitas bactérias tornam-se viáveis mas não culturáveis (VBNC), ou seja, as células continuam transportando e metabolizando nutrientes porém não formam colônias em ágar sólido. Inicialmente os autores determinaram se *L. lactis* podia tornar-se VBNC depois da exaustão da lactose quando presente arginina e outros aminoácidos no meio fermentativo.

O transporte dos aminoácidos em lactococos ocorre por diferentes mecanismos, sendo que o transporte de arginina é o mais benéfico devido a não necessidade de energia metabólica adicional, isto porque a força que conduz a arginina para dentro da célula é o gradiente de concentração. O excesso de arginina pode ser metabolizado pela rota deiminase arginina (ADI) para produzir energia (ATP) em *L. lactis*. A rota ADI é amplamente distribuída entre bactérias e serve tanto como fonte única de energia, carbono e nitrogênio ou como fontes adicionais desses nutrientes em bactérias lácticas, bacilos e outras linhagens de pseudomonas, aeromonas, clostridia, mycoplasma e halobacteria .

Os resultados encontrados pelos autores para uma das linhagens mostram que as culturas contendo lactose e arginina crescem mais que uma cultura sem

arginina depois da exaustão da lactose, indicando portanto que a presença de arginina representa um papel benéfico no crescimento celular e viabilidade. No entanto, quando lactose não estava presente inicialmente as concentrações de arginina não foram esgotadas nem mesmo durante um longo tempo de incubação (para ambas linhagens). Essas observações sugeriram que as células devem metabolicamente primeiro exaurir a lactose e só então induzir o caminho ADI. Observaram que quando as células cresciam em um meio contendo lactose e depois inoculadas para um meio deficiente nesse nutriente as células não cresciam e também não usavam arginina, sugerindo que um fator de indução desconhecido produzido durante metabolismo da lactose apresenta um papel na regulação do caminho ADI.

Quando as duas linhagens estudadas cresceram em um meio sem lactose e sem arginina, *L. lactis* ML3 foi culturável somente por dois dias, após permaneceu ativa metabolicamente por um determinado tempo mantendo o nível de ATP e a integridade celular, porém tornou-se não culturável. Já *L. lactis* 11454 crescendo em um meio nas mesmas condições manteve-se culturável por 14 dias. Esses dados sugerem que lactococos utilizam aminoácidos como fontes de energia, porém de maneiras diferentes. Os aminoácidos podem prolongar a sobrevivência de *L. lactis* fornecendo uma fonte de energia, provendo aminoácidos para reposição celular e minimizando a fadiga de proteínas essenciais.

Fisher, 1999, em um de seus trabalhos com *Bacillus subtilis*, que tem uma estreita relação com o *Bacillus megaterium*, reporta que três sistemas regulatórios globais de proteínas, CodY, GlnR e TnrA, controlam a expressão de genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio em resposta à disponibilidade de nutrientes em *Bacillus subtilis*. Cada um desses sistemas é ativado por diferentes condições nutricionais. CodY reprime a expressão dos genes necessários ao metabolismo de compostos nitrogenados quando as células estão crescendo rapidamente em meios contendo aminoácidos, GlnR reprime apenas células crescendo com excesso de nitrogênio; e TnrA ativa ou reprime a transcrição apenas durante crescimento limitado por nitrogênio. O uso de múltiplos sistemas para regular a produção de genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio

permite a expressão não-coordenada sobre diversas condições nutricionais. Outras observações sugerem que GlnR e TnrA provavelmente direcionam as células no sentido do crescimento vegetativo adaptado, mais do que no sentido da esporulação, durante crescimento limitado por nitrogênio. A síntese de enzimas degradativas de aminoácidos geralmente não é regulada em esporos de *Bacillus subtilis*. Uma possível explicação para isto é que a rota catabólica de aminoácidos tem um importante papel no desenvolvimento do ciclo vital do *Bacillus subtilis*. Em esporos germinativos de *Bacillus megaterium* mais de 50% de aminoácidos livres gerados por proteólises são degradados, produzindo 10-20 vezes a energia obtida pelo catabolismo do 3- fosfoglicerato, a maior fonte de energia em esporos dormentes (Setlow, 1981). Além disso, a expressão das enzimas requeridas para a degradação de aspartato, asparagina, alanina, arginina, histidina e prolina é substrato induzível.

## **2.4. Produção de PGA por linhagens mutantes ou clonadas**

A hiperprodução de PGA pode ser alcançada por controle de nutrientes para o metabolismo celular ou por alterações no genótipo das células (Shewale e Sivaraman,1989). Com o desenvolvimento recente da tecnologia de DNA recombinante, as pesquisas têm focado a clonagem de genes de PGA.

### **2.4.1. Trabalhos encontrados na literatura relacionados com a produção de PGA com linhagens mutantes ou clonadas**

Son et alli, 1982, obtiveram uma linhagem mutante parcialmente constitutiva a partir de uma linhagem selvagem *Bacillus megaterium* ATCC 14945 por tratamento com luz UV. Enquanto que a selvagem só produz enzima na presença do indutor, a mutante pode produzir a enzima sem a presença do mesmo, sendo que a adição deste aumentou a produção da enzima 3 vezes.

Com relação à morfologia das duas linhagens, observou-se que após o crescimento dos microrganismos em ágar nutriente por 18-24h, a linhagem

mutante apareceu como células isoladas ou pequenas cadeias, enquanto que a linhagem mãe usualmente aparece como longas cadeias.

McCullough, 1983, tinha como objetivo aumentar a produção de PGA de linhagens usadas industrialmente, que já apresentavam uma alta produção, através da aplicação da tecnologia do DNA recombinante. Para tal, foi isolado um fragmento de DNA cromossomal de 2,7 Kb do *B. megaterium* e inserido em um vetor plasmidial, sendo estes então transferidos para as linhagens altamente produtivas (de *B. megaterium* ATCC 14945). O pesquisador também transformou uma linhagem de *B. megaterium* (SC3593) com baixa capacidade produtora de PGA e o *B. subtilis*, que naturalmente não produz penicilina G acilase.

Os resultados encontrados mostram que todas as linhagens de *B. megaterium* transformadas com os plasmídios produzem mais enzima que as linhagens correspondentes sem os plasmídios. Porém, quando o mesmo plasmídio foi introduzido no *B. subtilis* não foi detectado produção de PGA. Esse resultado levou o autor a presumir que esse fragmento de 2,7 Kb quando presente em números altos de cópias em células de *B. megaterium* induz a uma maior produção de PGA, sendo improvável que esse fragmento contenha o gene estrutural para a penicilina G acilase já que a sua introdução no *B. subtilis* não produziu PGA.

Os resultados encontrados pelo autor foram considerados satisfatórios uma vez que ele conseguiu obter aumento de PGA em linhagens que já eram altamente produtivas por métodos empíricos, ou seja, simplesmente selecionando um plasmídio que quando introduzido por transformação no microrganismo aumentasse a produtividade.

Garcia et al.,1986, desenvolveram um procedimento mais simples e versátil para clonar genes de PGA. Segundo os autores os genes de PGA, até então, têm sido isolados de uma biblioteca plasmídica usando a técnica overlay *Serratia marcescens*, que é uma técnica que consome bastante tempo.

Quando o DNA genômico é clivado com enzimas de restrição são gerados muitos fragmentos de DNA, sendo que estes serão ligados aos plasmídios e então introduzidos nas células, dando origem a diferentes colônias (biblioteca genômica). Dentre todas essas colônias é necessário encontrar qual delas é

portadora do gene PGA. Uma das técnicas utilizada é da *overlay Serratia marcescens*, que tem o seguinte princípio: as colônias transformadas são incubadas em meios sólidos por um determinado período e então são encobertas com uma quantidade de ágar contendo *S. marcescens* cultivado durante a noite em penicilina G. A linhagem de *S. marcescens* é resistente a penicilina G mas suscetível ao 6-APA, fato este que irá produzir zonas inibitórias em torno das colônias que possuem o gene de PGA, pois estas colônias irão produzir a enzima e esta irá hidrolisar a PG gerando 6-APA.

O trabalho de Garcia et al.,1986, foi justamente desenvolver um método mais simples para detectar os clones positivos de PGA. O procedimento requereu a construção de uma biblioteca plasmídica em um hospedeiro auxotrófico para um aminoácido específico (microrganismo requer esse nutriente). Portanto, os clones recombinantes que carregavam o gene de PGA foram selecionados em um meio mínimo contendo ao invés do aminoácido requerido o seu derivado fenilacetil. Essa seleção baseou-se no fato de que como o microrganismo é auxotrófico para um aminoácido, quando for adicionado ao meio derivados de aminoácidos fenilacetil as colônias que carregarem o gene de PGA terão condições de clivar esses derivados.

Os autores clonaram genes de PGA de *E. coli* ATCC 11105 e de *Kluyvera citrophila* ATCC 21285 em *E. coli* ( HB101/ AM 763/ SE 5000) usando essa técnica. Eles verificaram diferenças na produção de PGA quando utilizaram bactérias que abrigavam plasmídios com o gene oriundo de *Kluyvera citrophila* e de *E. coli* ATCC 11105 conforme apresentado na Tabela 2.10.

Tabela 2.10. Atividade acilase em linhagens de *E. coli* e *Kluyvera citrophila*

Linhagem	Plasmídio	Atividade acilase (unidades)	
		Não induzida	Induzida
<i>E. coli</i> ATCC 11105	-	0,0	1,2
<i>K. citrophila</i> ATCC 21285	-	1,9	1,9
<i>E. coli</i> HB101	-	0,0	0,0
<i>E. coli</i> HB101	PPGA1*	1,6	4,5
<i>E. coli</i> HB101	PKAE17**	4,6	10,0
<i>E. coli</i> HB101	PKAH3**	2,5	12,4
<i>E. coli</i> HB101	PKAP1**	10,0	30,0
<i>E. coli</i> AM763	PKAH3**	50,0	64,0
<i>E. coli</i> SE5000	PKAH3**	19,0	57,0
<i>E. coli</i> SE5000	PYKH5**	12,0	48,0

\* plasmídio com o gene de *E. coli*      \*\* plasmídio com o gene de *K. citrophila*

Além das diferenças obtidas quando se comparou a origem dos genes, também houve mudança de comportamento quando se utilizaram hospedeiros diferentes para o mesmo gene de *K. citrophila*. As razões ainda não são bem entendidas. O efeito da temperatura também foi estudado na expressão da enzima, sendo verificado que a produção de PGA é mais afetada por essa variável em hospedeiros que abrigam genes PGA de *E. coli*.

Os autores também tentaram aumentar a produção de enzima introduzindo maior número de cópias plasmidiais nas células, no entanto não obtiveram sucesso, sugerindo que altas quantidades de enzima podem ser tóxicas para as células. Portanto, obter uma linhagem hospedeira resistente parece ser um fator importante para aumentar o rendimento da produção.

Meevootisom et al.,1987, clonaram genes de PGA de *E. coli* 194, de um mutante dessa linhagem (*E. coli* 194-3) e de um mutante de *B. megaterium* ATCC 14945 (*B. megaterium* UN1). Esses genes foram clonados em *E. coli* DH1 no vetor plasmídio pACYC184. O objetivo principal do trabalho foi verificar se havia diferença entre esses diferentes genes (diferentes microrganismos e linhagens mutantes do mesmo) e determinar o tamanho dos mesmos.

A estratégia utilizada foi clivar o DNA cromossomal com diferentes enzimas de restrição (*EcoRI*, *HindIII* ou *BamHI*) e selecionar os clones positivos pela técnica *overlay Serratia*. Somente quatro clones positivos, pMLV1, pLMV2, pMLV3 e pLMV4, foram detectados para o DNA cromossomal do mutante de *E. coli* utilizando a enzima de restrição *EcoRI*. Os quatro clones apresentaram-se idênticos, sendo que o tamanho do DNA inserido foi de 9 Kb (kilobases). A partir de um desses clones uma série de subclones foram construídos para determinar o tamanho de DNA inserido mínimo necessário para produção de PGA. Para a linhagem selvagem de *E. coli* e do *B. megaterium* mutante foi empregado a mesma estratégia. Um total de 7 clones positivos foram isolados para o DNA de *B. megaterium*, designados de pMLV101 a 107. Para o caso do DNA de *E. coli* selvagem um simples clone (pMLV001) foi selecionado para estudo.

A comparação dos mapas de restrição dos clones mostram que os genes oriundos das linhagens de *E. coli* não apresentaram diferenças detectáveis, no entanto existem algumas diferenças entre as linhagens de *E. coli* versus *B. megaterium*. Os resultados indicam que o tamanho do gene requerido para a produção da enzima de *E. coli* é em torno de 2,2 Kb, já para o *B. megaterium* é de 2,3 a 2,7 Kb. Verificaram que a PGA de *B. megaterium* foi produzida intracelularmente em *E. coli* recombinante, porém com uma menor produção quando comparado com os genes de *E. coli*.

Um outro resultado notável foi em relação à indução pelo ácido fenil acético. Com exceção de apenas um clone, todos os demais genes de PGA clonados não foram mais induzíveis. Isso pode ser devido à separação do gene PGA de seus elementos de controle como consequência dos procedimentos de subclonagem.

Posterior trabalho encontrado na literatura de Ohashi et alli., 1989, foi contrário ao trabalho de Meevootisom et al., 1987. O que esses autores estudaram foi a expressão de PGA de *Arthrobacter viscosus*, em microrganismos como *E. coli* e *B. subtilis* (produção intracelular). *Arthrobacter viscosus*, tal como *B. megaterium* produz PGA extracelularmente.

O procedimento utilizado foi a clivagem de um plasmídio que já continha o gene PGA de *A. viscosus* e então construíram vários outros plasmídios até

determinar o tamanho mínimo do DNA inserido necessário para expressar PGA. Os clones positivos foram detectados pela técnica *overlay Serratia*.

Para o caso de *E. coli* recombinante (com o gene PGA de *A. viscosus*) a produção de PGA foi detectada intracelularmente, mas no caso do *B. subtilis* recombinante a enzima foi produzida e secretada no meio de cultura, sendo que a sua produção foi 116 e 7,2 vezes maior quando comparada com uma linhagem selvagem de *A. viscosus* e com um mutante de *A. viscosus* respectivamente.

Ambos os microrganismos recombinantes conseguem produzir a enzima constitutivamente, enquanto que a linhagem original é induzida pelo ácido fenil acético. Os autores ainda verificaram uma repressão na produção da enzima quando o ácido fenil acético foi utilizado em cultivos de *E. coli* recombinantes.

Kang et alli.,1991, isolaram o gene PGA de *B. megaterium* ATCC 14945 e estudaram a expressão desse gene em *E. coli* e *B. subtilis*. A enzima proveniente do *B. subtilis* transformado foi purificada e caracterizada.

Após procedimentos básicos de clonagem os autores obtiveram um plasmídeo contendo um fragmento de DNA estranho de 2,8Kb. Todos os clones e subclones positivos obtidos no processo foram testados para produção de PGA e são apresentados na Tabela 2.11. Os clones positivos de PGA foram selecionados com técnica semelhante à *overlay Serratia* mas utilizado-se outro microrganismo e outros compostos. As placas contendo os clones de *E. coli* e *B. subtilis* foram encobertas com ágar contendo o microrganismo *Staphylococcus aureus*, 7-ADCA e D-fenilglicina metilester e incubadas por mais um determinado tempo. Os clones positivos apresentaram um halo transparente em torno da colônia de *S. aureus* devido à cefalexina produzida por acilação enzimática de 7-ADCA e D-fenilglicina metilester.

Tabela 2.11. Atividade de Penicilina G Acilase em várias linhagens e subclones (kang et alli.,1991)

Linhagens e subclones	Atividade extracelular (UI)	Atividade intracelular (UI)
<i>B. megaterium</i>	0,6	ND
<i>B. subtilis</i> (pUB110)	ND	ND
<i>B. subtilis</i> (pUBC73)	13,8	0,3
<i>E. coli</i> (pBR322)	ND	ND
<i>E. coli</i> (pCSE220)	ND	0,17
<i>E. coli</i> (pCSE130)	ND	0,16
<i>E. coli</i> (pCSE94)	ND	0,16
<i>E. coli</i> (pUCSE59)	ND	0,15

ND = não detectado

Ensaio foram realizados usando 10ml de cultura

As atividades encontradas em *E. coli* clonadas foram menores que as aquelas em *B. megaterium*. Por outro lado, uma quantidade vinte vezes maior de enzima foi produzida e secretada extracelularmente por *B. subtilis* transformado (abriga pUBC73) quando comparado com a produção por *B. megaterium*. Esse gene também foi transferido para um vetor de expressão (pTTQ19) com o intuito de obter uma maior produção da enzima. O nível de PGA produzida foi mais de 30% de proteína total celular, no entanto, a maioria das enzimas estavam inativas. Os autores estão realizando trabalhos para renaturar a enzima e tentar entender o processo.

Na caracterização da enzima, foi verificado que a proteína expressada em *E. coli* era em torno de 3000 Da maior que a secretada por *B. subtilis*. Aparentemente a sequência sinal da enzima está sendo processada em *B. subtilis*.

Uma outra linha de pesquisa que está em desenvolvimento diz respeito à identificação da sequência nucleotídica das diferentes PGAs. O trabalho de Konstantinovic et alli.,1994, foi determinar a sequência do gene que codifica a PGA de *Arthrobacter viscosus* ATCC 15294.

Os autores determinaram que a sequência apresenta 2406 nucleotídios com um conteúdo C + G de 37%. Essa sequência codifica uma cadeia

polipeptídica precursora de 802 aminoácidos. Os primeiros 26 aminoácidos pertencem ao peptídeo sinal. As cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  são separadas por um peptídeo espaçador e apresentam 208 e 537 aminoácidos respectivamente. A sequência de aminoácidos deduzida mostrou significativa homologia com outras enzimas de bactérias amidases Gram negativas, o que permitiu os autores concluir que PGA de *A. viscosus* pertence à mesma família de bactérias.

Um resultado interessante mostra que todas as subunidades  $\beta$  conhecidas até então começam com o resíduo serina ou ácido aspártico e quando o mesmo foi modificado por cisteína a atividade enzimática decresceu mais de 10 vezes.

Resultados referentes ao controle da expressão do gene *pac* (gene que codifica a Penicilina G Acilase) mostram diferenças na síntese de PGA quando utilizada a linhagem original ou *E. coli* modificada com esse gene. A atividade enzimática da linhagem original é mais alta quando induzida e na presença de succinato como fonte de carbono, sendo reprimida na presença de glicose. Já o gene de *A. viscosus* clonado em *E. coli* tornou-se constitutivo e a produção da enzima foi muito maior.

Martín et al., 1995, realizaram um trabalho muito parecido com o de Konstantinovic et al., 1994, mas o gene *pac* era proveniente do *B. megaterium* ATCC 14945 (ambos microrganismos expressam a enzima extracelularmente). Os autores sequenciaram esse gene e o clonaram em *E. coli* HB101. A sequência apresentou 2406 nucleotídeos com um conteúdo C+G de 37%, o qual codificou uma cadeia polipeptídica de 802 aminoácidos (Figura 2.3).

Comparação da sequência de aminoácidos de PGA de *B. megaterium* com aquelas de *k. citrophila* e *A. viscosus* revelou que todas as PGAs pertencem à mesma família de proteína. A enzima de *B. megaterium* mostrou maior similaridade com a PGA de *A. viscosus*, com 97% de semelhança nos aminoácidos e 98% nos nucleotídeos. Essa alta similaridade permitiu os autores concluir que o gene *pac* de *B. megaterium* e *A. viscosus* divergiram muito recentemente de um gene ancestral comum e que a PGA é secretada utilizando um peptídeo sinal. No entanto, quando o gene *pac* de *B. megaterium* é clonado em *E. coli* a enzima não consegue ser secretada, sugerindo que o peptídeo sinal não é reconhecido pela maquinaria de secreção de *E. coli*.

1 TTTTAATATA ATAAAATATT AGCTGAAATT AAAGGAATAC TCACATGACT AAGGGATTTA  
AAAAATATAT TATTTTATAA TCGACTTTAA TTTCCCTTATG AGTGTACTGA TTCCTTAAAT  
61 GAACAAAAGT TGGATAGAGT AAGATAAAAA CTAATAATAT ATTCCTGAAA GTTCTAAATA  
CTTGTTTTCA ACCTATCTCA TTCTATTTTT GATTATTTATA TAAGGACTTT CAAGATTTAT  
121 TTTAAATATT ATCTGAATT AGTATAACGG TAAGGTTATG ATTCGTGATA TAAGTGTATT  
AAAAATATAA TAGAACTTAA TCATATTGCC ATTCCAATAC TAAGCACTAT ATTCACAATA  
181 AAAAAGTGGG GGTGGAAATG M K T K W L I S V I I L  
TTTTTCACCT CCACCTTTAC ATTAATACTT CTGCTTCACC GATTATAGTC AGTATTAGGA  
+2 F V F I F P Q N L V F A G E D K N E G V  
241 ATTTGTTTTT ATTTTTCCTC AAAATCTAGT TTTTGCTGGG GAGGATAAGA ATGAAGGGGT  
TAAACAAAAG TAAAAAGGAG TTTTAGATCA AAAACGACCC CTCCTATTCT TACTTCCCCA  
+2 K V V R D N F G V P H L Y A K N K K D L  
301 CAAGGTAGTA CGTGATAATT TTGAGTACC CCATTATATC GCTAAAAATA AAAAAGATTT  
GTTCCATCAT GCACTATTAA AACCTCATGG GGTAAATATG CGATTTTTAT TTTTCTAAA  
+2 Y E A Y G Y V M A K D R L F Q L E M F R  
361 ATATGAAGCC TATGGATATG TTATGGCAAA GGATCGACTA TTTTCAGTTGG AAATGTCCCG  
TATACTTCGC ATACCTATAC AATACCGTTT CCTAGCTGAT AAAGTCAACC TTTACAAGGG  
+2 R G N E G T V S E I F G E D Y L S K D E  
421 TCGCGGAAAT GAGGGGACCC TTTTCAGAAAT TTTGGGAGAA GATTATCTTT CAAAAGATGA  
ACGCCCTTTA CTCCTCTGGC AAAGTCTTTA AAAACCTCTT CTAATAGAAA GTTTTCTACT  
+2 Q S R R D G Y S N K E I K K M I D G L D  
481 GCAATCCAGA AGAGATGGAT ATAGTAATAA AGAAATTAAT AAAATGATGG ACGGTCTGGA  
CGTTAGGTCT TCTCTACCTA TATCATTATT TCTTTAATTT TTTTACTAAC TGCCAGACCT  
+2 R Q P K E L I A K F A E G I S R Y V N E  
541 TCGTCAGCCA AAAGAATTAA TAGCAAAATT TGCTGAAGGT ATTTACGTT ATGTAATGTA  
AGCAGTCGGT TTTCTTAATT ATCGTTTTAA ACGACTTCCA TAAAGTGCAA TACATTTACT  
+2 A L K D P D D K L S K E F H E Y Q F L P  
601 AGCTTTAAAA GATCCAGATG ATAAGCTTTC GAAGGAGTTT CATGAATATC AGTTTTTACC  
TCGAAATTTG CTAGGCTTAC TATTCGAAAG CTTCCCTCAA GTACTTATAG TCAAAAATGG  
+2 Q K W T S T D V V R V Y M V S M T Y F M  
661 GCAAAATGG ACTTCAACAG ATGTTGTCCG TGTTTATATG GTATCCATGA CCTATTTTAT  
CGTTTTTACC TGAAGTTGTC TACAACAGGC ACAAATATAC CATAGTACTT GGATAAAAATA  
+2 D N H Q E L K N A E I L A K L E H E Y G  
721 GGATAATCAC CAGAGTTTAA AAAACGCAGA GATACTTGCA AAGCTAGAAC ATGAATATGG  
CCTATTAGTG GTCCTCAATT TTTTGGCTCT CTATGAACGT TTCGATCTTG TACTTATACC  
+2 T E V S R K M F D D L V W K N D P S A P  
781 GACAGAAGTT TCCCGAAAAA TGTTCTGATG TTTAGTGTGG AAAAATGATC CTAGCGCTCC  
CTGTCTTCAA AGGGCCTTTT ACAAGCTACT AAATCACACC TTTTACTAGT GATCGCGAGG  
+2 T S I V S E G K P K R D S S S Q S L Q I  
841 TACAAGCATT GTAAGCGAGG GGAACCCAAA AAGGGACTCG TCTTCTCAAT CCCTTCAAAAT  
ATGTTCTGTA CATTGCTTCC CTTTGGTTT TTTCCCTGAGC AGAAGAGTTA GGAAGTTTA  
+2 L S S A V I K A S E K V G K E R E N F V  
901 ACTGTCTTCA GCTGTAATCA AAGCTTCTGA AAAAGTCGGA AAGGAAAGG AGAATTTTGT  
TGACAGAAGT GCACATTAGT TTCGAAGACT TTTTCAGCCT TTCCTTTCCC TCTTAAAACA  
+2 Q T S E E L G L P L K I G S N A A I V G  
961 CCAACATCTT GAAGAATGAG GATTACCGTT AAAGATAGGC AGTAATGCGC CCATAGTCGG  
GGTTTGTA GA CTTCTTGAAC CTAATGGCAA TTTCTATCCG TCATTACGGC GGTATCAGCC  
+2 S E K S A T G N A L L F S G P Q V G F V  
1021 TTCCGAGAAA TCTGCAACAG GAAATGCTTT ATTATTGAGT GGACCACAG TAGGTTTTGT  
AAGCTCTTT AGACGTTGTC CTTTACGAAA TAATAAGTCA CCTGGTGTTC ATCCAAAACA  
+2 A P G F L Y E V G L H A P G F D M E G S  
1081 TGCTCCTGGA TTTTGTACG AGGTAGGTTT GCATGCGCCA GGTTTTGATA TGGAAAGTTC  
ACGAGGACTT AAAACATGC TCCATCCAAA CGTACGCGGT CCAAACTAT ACCTTCCAAAG  
+2 G F I G Y P F I M F G A N N H F A L S A  
1141 AGGATTCATA GGCTATCCTT TCATCATGTT CGGAGCCAAC AATCACTTTG CTCTAAGTGC  
TCCTAAGTAT CCGATAGGAA AGTAGTACAA GCCTCGGTTG TTAGTGAAC GAGATTCAGC  
+2 T A G Y G N V T D I F E E K L N A K N S  
1201 TACAGCTGGG TACGGAAATG TAACCGATAT CTTTGAGGAA AAATTGAATG CGAAGAACCT  
ATGTCGACCC ATGCCCTTAC ATTTGGCTATA GAAACTCCTT TTTAACTTAC GCTTCTTGAG  
+2 S Q Y L Y K G K W R D M E K R K E S F T  
1261 TTCCAGTAT TTATACAAAG GGAAGTGGAG AGACATGCAA AAGAGGAAG AATCTTTCAC  
AAGGGTCATA AATATGTTTC CTTTACCTC TCTGTACCTT TTCTCCTTCC TTAGAAAGTG  
+2 V K G D N G E K K T V E K I Y Y R T V H  
1321 AGTCAAAGGA GACAATGGAG AAAAGAAAAC AGTAGAAAAG ATTTATTATC GGACAGTACA  
TCAGTTTCTC CTGTACCTC TTTTCTTTG TCATCTTTTC TAAATAATAG CCTGTCAATG  
+2 G P V I S R D E T N K V A Y S K S W S F  
1381 TGGTCTGTAT ATTAGTAGAG ATGAACAAA TAAAGTGGCT TACAGTAAGT CGTGGTCTTT  
ACCGACACAT TAATCATCTC TACTTTGTTT ATTTCAACCGA ATGTCATTCA GCACACAGAAA  
+2 R G T E A Q S M S A Y M K A N W A K N L  
1441 CCGTGGAACT GAGGCCAAA GCATGTGCGC TTACATGAAA GCGAATTTGG CAAAAAATCT  
GGCACCCTGA CTCGGGTTT CGTACAGCCG AATGTACTTT CGCTTAAACC GTTTTTTGAA

```

+2 K E F E N A A S E Y T M S L N W Y Y A D
1501 AAAAGAATTT GAGAATGCAG CTAGTGAATA TACGATGCTT TGAATTGGT ATTATGCGGA
TTTTCTTAAA CTCCTACGTC GATCACTTAT ATGCTACAGA AACTTAACCA TAATACGCTT

+2 K K G D I A Y Y H V G R Y P V R N S K I
1561 TAAGAAGGTT GATATAGCGT ATTATCATGT AGGAAGATAT CCAGTAAGAA ACAGCAAAAT
ATTCTTCCCA CTATATCGCA TAATAGTACA TCCTTCTATA GGTCAATCTT TGTCGTTTTA

+2 D E R I P T P G T G E Y E W K G F I P F
1621 TGATGAAAGA ATCCCTACAC CAGGAACAGG AGAATATGAG TGGAAAGGTT TTATTCCTTT
ACTACTTTCT TAGGGATGTG GTCCTGTGCC TCTTATACTC ACCTTTCCAA AATAAGGAAA

+2 K E N P H V I N P K N G Y V V N W N N K
1681 TAAAGAGAAC CCTCATGTAA TCAATCCGAA GAATGGCTAT GTAGTTAATT GGAACAATAA
ATTTCTCTTG GGAGTACATT AGTTAGGCTT CTTACCGATA CATCAATTAA CCTTGTATT

+2 P S K E W V N G E Y S F Y W G E D N R V
1741 GCCTTCTAAA GAGTGGGTAA ATGGTGAATA TAGTTTTTAT TGGGGAGAGG ATAATCGAGT
CGGAAGATTT CTCACCCATT TACCCTTAT ATCAAAAATA ACCCTCTCC TATTAGCTCA

+2 Q Q Y I N G M E A R G K V T L E D I N E
1801 CCAACAATAT ATCAATGGGA TGGAAAGCGAG AGGGAAAGTT ACATTAGAAG ATATTAATGA
GGTTGTTATA TAGTTACCTT ACCTTCGCTC TCCTTTCAA TGTAACTTCT TATAATTACT

+2 I N Y T A S F A Q L R A N L F K Q L L I
1861 AATTAATAT ACGGCAAGCT TTGCACAGCT TCGAGCAAAAC CTCTTTAAAC AGTATTGAT
TTAATTAATA TGCCGTTGCA AACGTGTCGA AGCTCGTTTG GAGAAATTTG TCAATACTA

+2 D V L D K N K S T N G N Y I Y L I E K L
1921 TGATGTGTTC GACAAGAATA AATCAACCAA CGGGAAGTAC ATCTATTAA TGAAGAAAT
ACTACACAC CTTCTCTTAT TTAGTTGGTT GCCCTTGATG TAGATAAAT AACCTTTTGA

+2 E E W N N L K E D E N K D G Y Y D A G I
1981 GGAAGATGG AATAATCTAA AAGAAGACGA AAATAAAGAT GGATATTATG ACGCAGGGAT
CCTTCTTACC TTATTAGATT TTCTTCTGCT TTTATTTCTA CCTATAATAC TCGTCCCTA

+2 A A F F D E W W N N L H D K L F M D E L
2041 TGCCGATTC TTTGATGAAT GGTGGAATAA TCTCCATGAT AAACCTTTTA TGGATGAAT
ACGCCGTAG AACTACTTA CCACCTTATT AGAGGTACTA TTTGAGAAAT ACCTACTTAA

+2 G D F Y G I T K E I T D H R Y G A S L A
2101 GGGAGACTTC TATGGAATAA CGAAAGAAAT TACCGATCAT CGCTATGGGG CTTCATTAGC
CCCTCTGAG ATACCTTATT GCTTTCTTTA ATGGCTAGTA GCGATACCCC GAAGTAATCG

+2 Y K I L N K E S T N Y K W V N V D Q E K
2161 ATATAAAATA TTAACAAGG AATCTACAAA CTATAAATGG GTGAACGTAG ATCAGGAAAA
TATATTTTAT AATTTGTTCC TTAGATGTTT GATATTTACC CACTTGCATC TAGTCTTTT

+2 I I M E S T N E V L A K L Q S E K G L K
2221 AATAAATATG GAAAGCACAA ATGAAGTACT TGCTAAATTG CAATCAGAAA AAGGGTTGAA
TTATTATTAC CTTTCGTGTT TACTTCATGA ACGATTTAAC GTTAGTCTTT TTCCAACTT

+2 A E K W R M P I K T M T F G E K S L I G
2281 AGCAGAAAAA TGGCGTATGC CTATAAAAAAC GATGACTTTT GGTGAAAAAT CATTGATTGG
TCGCTTTTTT ACCGCATACG GATATTTTTG CTAAGTAAAA CCCTTTTATA GTAACCTAAC

+2 I P H G Y G S M T P I I E M N R G S E N
2341 TATTCCTCAC GGGTATGGCT CAATGACTCC AATTAATTGAA ATGAATCGTG GAAGTGAATA
ATAAGGGGTT CCCATACCGA GTTACTGAGG TTAATAACTT TACTTAGCAC CTTCCTTTT

+2 H Y I E M T P T G P S G F N I T P P G Q
2401 TCATTATATG GAAATGACTC CGACAGGGCC GAGTGGCTTT AACATCACAC CGCCTGGTCA
AGTAATATAA CTTTACTGAG GCTGTCCCGG CTCACCCGAA TTGTAGTGTG GCGACCAAT

+2 I G F V K K D G T I S D H Y D D Q L V M
2461 AATGGAATTT GTAAAAAAG ATGGAACGAT AAGTGACCAC TATGATGACC AACTAGTTAT
TTAACCTAAA CATTTTTTTC TACCTTGCTA TTCCTGGTGT ATACTACTGG TTGATCAATA

+2 F A E W K F K P Y L F N K K D I N K A A
2521 GTTCGCCGAA TGGAAATTCA AGCCATACTT ATTTAACAAG AAAGATATTA ATAAAGCAGC
CAAGCGGCTT ACCTTAAGT TCGGTATGAA TAAATGTTC TTTCTATAAT TATTTGCTGC

+2 K N V S A L N M S K @
2581 TAAAAATGTT AGCCCATTA AATATGAGTAA GTAGAAAGTA ACGATTTGAA TATACCTTAT
ATTTTTTCAA TCGCGTAATT TATACTCATT CATCTTTCAT TGCTAAACTT ATATGGGATA

2641 CATTCAAGCA TAAAGAGCCT ATACTATTGA TGCTGTGACC TCGATTTTGA ATCGGGGTCA
GTAAGTTCGT ATTTCTCGGA TATGATAACT ACGACACTGG AGCTAAACT TAGCCCCAGT

2701 TTTTGTAAAT CCCCACTTGT AATGACACTT TCAAAAGTAG GTTACAAAAC AAACGCCGGG
AAAAACATTA GGGGTGAACA TTACTGTGAA AGTTTTTATC CAATGTTTGT TTTGCGCCCC

2761 GCAAGGGGAA ATCTTACTCC GGCAATATAT TAAGAATAAT GGGAGAATCG ATCTATTTGG
CGTTCCTTCT TAGAATGAGG CCGTTATATA ATTCTTATTA CCCTCTTAGC TAGATAAAAC

2821 GGAGATGCTC AATCATGTGC ATGATAGATT CAGTAAGGTA TTAAGATAT ATCAGCAATT
CCTCTACGAG TTAGTACACG TACTATCTAA GTCATTCCAT AATCTATATA TAGTCGTTAA

2881 ATTTTGCCAG CCAGCTGCTC
TAAAACGGTC GGTCCGACGAG

```

Figura 2.3. Sequência nucleotídica e dos aminoácidos do gene PGA de *Bacillus megaterium* (Martín et alli, 1995). Dados apresentados no GenBank número Z37542.

Outros trabalhos encontrados na literatura têm como objetivo desenvolver sistemas para obter alta expressão de PGA baseados na seleção de uma conveniente linhagem hospedeira e nos plasmídios. Conforme Sobotková et alli., 1996, ambos contribuem para a formação de um sistema de alta expressão de PGA.

Em geral, o papel dos plasmídios é assegurar um número alto de moléculas plasmidiais recombinantes por célula e uma eficiente transcrição do gene clonado. O hospedeiro, junto com as condições de crescimento, podem determinar a estabilidade do plasmídio recombinante. O hospedeiro também tem um papel importante durante a passagem da cadeia polipeptídica precursora até a formação da enzima madura.

Sobotková et alli., 1996, na tentativa de encontrar um hospedeiro conveniente levou em consideração os fenótipos da linhagem hospedeira, tais como capacidade para utilizar ácido fenil acético e a presença do gene *pac* que codifica a penicilina G acilase. Entre as 15 linhagens testadas a expressão mais alta foi em *E. coli* R3 e C, ambos dos quais carregam o gene *pac* nos seus cromossomos. O vetor plasmidial multicópias pKA18 resultou em uma maior expressão do gene *pac* em relação ao plasmídio pAA6.

Cabe observar que todos os trabalhos descritos até o momento utilizaram a forma de clonagem mais tradicional (item 2.4.1.1). No entanto, são encontrados trabalhos que utilizam a técnica de PCR para amplificar o gene PGA. Huang et alli., 1998, amplificaram o gene PGA de *B. megaterium* CA 4098 através dessa técnica para então clonarem em um vetor (pKK223-3) e expressarem em *E. coli* HB101.

Yang et alli., 1999, amplificou o gene PGA de *B. megaterium* por PCR e subclonou em um vetor de expressão pPZW103. O plasmídio recombinante foi transferido para o *B. subtilis* DB104. Enquanto a produção de PGA é induzida pelo ácido fenil acético em *B. megaterium*, na linhagem transformada (*B. subtilis*) a enzima foi produzida constitutivamente. Procedimento semelhante foi realizado por Yang et alli., 2001, para expressar PGA de *B. megaterium* em *B. subtilis* WB600. O nível de PGA atingido foi de 40 UI/mL sob condições otimizadas.

Como pode ser observado, com o desenvolvimento da tecnologia do DNA recombinante, as pesquisas têm focado bastante a clonagem de genes de PGA, tendo sido encontrados ainda vários outros trabalhos na literatura, como por exemplo, Panbangred et alli.,2000, Chou et alli.,2000 e Lin et alli.,2001.

## **2.5. Purificação de enzimas**

Cada tipo de célula pode conter milhares de proteínas diversas, pois cada espécie de organismo contém um conjunto distinto de proteínas. O isolamento na forma pura de uma determinada proteína é realizado por diferentes métodos, sendo que não existe um método único ou um conjunto de métodos aplicáveis ao isolamento de todas as proteínas indistintamente. Porém, para qualquer proteína, é possível, geralmente, escolher uma sequência de etapas de separação, que irão resultar em um grau elevado de purificação e um alto rendimento. O objetivo geral é aumentar a pureza ou a afinidade biológica da proteína desejada por unidade de peso, pela eliminação das proteínas inativas ou indesejáveis, enquanto, ao mesmo tempo, eleva-se o rendimento ao máximo.

Ainda, para cada espécie de microrganismo, a proteína pode ser produzida de modo intracelular ou extracelular. No caso em que a proteína é extracelular, as células são desprezadas do caldo de fermentação e trabalha-se com a parte líquida, porém quando a proteína é produzida intracelularmente, é necessário realizar o rompimento das células antes de se iniciar as etapas de purificação propriamente dita.

As propriedades das proteínas em solução são levadas em consideração para separar misturas de proteínas, portanto o conhecimento de algumas propriedades da enzima em estudo facilitará a escolha de determinados métodos. A Tabela 2.12 mostra as operações de purificação baseado nas propriedades das proteínas.

Tabela 2.12. Operações de purificação e separação das proteínas ( Leser e Asenjo, 1992)

Operações	Propriedades
Centrifugação	Velocidade de sedimentação
Filtração	Tamanho da partícula
Microfiltração	Tamanho da partícula
Homogeneização	Natureza intracelular
Moinho de bolas	Natureza intracelular
Ultrafiltração	Tamanho molecular
Extração em duas fases	Coefficiente de partição
Precipitação	Solubilidade
Adsorção	Forças Van der Waals, polaridades
Troca iônica	Carga
Interações hidrofóbicas	Superfície hidrofóbica
Afinidade Cromatográfica	Afinidade biológica
Filtração em gel	Tamanho molecular
Cromatografia líquida de fase reversa	Interações hidrofóbicas e hidrofílicas

Pode-se observar pelos resultados de Balasingham et al., 1992, ( Tabela 2.13) as diferentes etapas requeridas para purificar e concentrar a PGA intracelular proveniente de *E. coli*. Cabe observar que para obter a enzima praticamente pura ocorreu uma perda no rendimento de 75% ao longo do processo.

Tabela 2.13. Isolamento da penicilina amidase de *E. coli* ( 10kg ) (Balasingham et alli., 1972).

Material	Vol (l)	Cp (mg/ml)	Aet * 10 <sup>-5</sup> (UI)	Ae (UI/mg)	R (%)
Suspensão rompida	50	28,4	1,32	0,093	100
Extrato(depois da remoção Das membranas)	42	31,4	1,16	0,088	88
Sobrenadante <sup>a</sup> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ppt. (redissolvido)	42	19,2	0,87	0,108	66
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ppt. (redissolvido)	6	45	0,71	0,26	54
Polietilenoglicol ppt. (redissolvido)	1	45	0,150	0,33	54 <sup>b</sup>
Solução dialisada	0,25	76	0,181	0,95	65
Coletado no fracionamento em coluna DEAE-celulose	0,25	62	0,114	0,73	41
	0,24	4,4	0,067	6,35	25

<sup>a</sup> Depois da precipitação com sulfato de estreptomicina, para que ocorra a precipitação dos ácidos nucleicos.

<sup>b</sup> Não é uma etapa de concentração/purificação, apenas ocorre mudança no método da medida de atividade, que é feito com PDAB (p-dimetilaminobenzaldeído).

R = Rendimento , Cp = Concentração de proteínas, Ae = atividade específica  
Aet = atividade enzimática total

Senthilvel e Pai, 1996, ao purificar PGA de *B. megaterium* NCIM 2670, obtiveram uma recuperação de enzima ainda menor no final das operações de purificação, como pode ser observado na Tabela 2.14. Uma das razões citada pelos autores para a baixa recuperação foi a presença de proteases no meio que provavelmente desativaram a PGA ao longo do processo utilizado. A segunda possibilidade pode ser a perda por adsorção sobre a membrana de ultrafiltração durante a concentração.

Tabela 2.14. Atividade de Penicilina G acilase em diferentes operações de purificação ( Senthilvel e Pai,1996)

	Volume (ml)	Proteína total (mg)	Enzima total (UI)	Atividade específica (UI/mg)	Recuperação de enzima (%)
Extrato Enzimático	360	4176	1764	0,4	100
Retido da Ultrafiltração	100	1740	980	0,6	56
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ppt. Fração 40-70%	25	160	323	2,0	18
Coluna Sephadex	25	100	263	2,6	15

Na etapa de ultrafiltração os autores verificaram um aumento na atividade específica, o que mostra que algumas proteínas pequenas foram removidas com o filtrado, e portanto, a ultrafiltração atua não somente para concentrar mas também para purificar parcialmente a penicilina G acilase.

Na precipitação com sulfato de amônio, o caldo de enzimas foi saturado com diferentes quantidades, não se observando nenhuma atividade em precipitados formados com até 40% de saturação. Os melhores resultados foram obtidos com as coletas dos precipitados de 40 a 70% de saturação.

Phillips e Caldwell,1951, obtiveram melhor desempenho na purificação e concentração da glicoamilase com uso de sulfato de amônio, diálises intercaladas, e posteriormente fracionamentos com etanol.

Pinotti, 1999, no estudo sobre concentração/purificação de PGA por *B. megaterium* obteve os melhores resultados usando concentração com sacarose, onde uma progressiva retirada de líquido era obtida mantendo-se a solução confinada em uma membrana de diálise sempre em contato com sacarose cristalizada. Os resultados indicaram que não existe inativação da enzima quando aplicada esta técnica, recuperando-se praticamente toda a enzima, tornando esta técnica muito interessante quando usada em pequena escala.

Outra técnica utilizada por Pinotti,1999, foi a precipitação com solventes orgânicos, que não se mostrou eficiente devido provavelmente à baixa concentração de enzima presente no caldo, pois estudos realizados com a adição de PGA produzida por *E. coli* (baixas e altas concentrações) mostraram que a técnica é eficiente somente quando altas concentrações de enzimas estavam contidas no caldo.

As técnicas utilizadas neste trabalho foram diálise, precipitação com solventes orgânicos, uso de micro e ultrafiltração e adsorção por troca iônica.

### **2.5.1. Diálise**

Esta é uma técnica bastante utilizada entre os trabalhos encontrados na literatura para purificação de enzimas, como por exemplo, Senthilvel et al, 1996; Phillips et al.,1951 ; Chiang et al. ,1967 ; Savidge et al.,1975 ; Balasingham et alli.,1972. Na diálise, as proteínas em solução podem ser separadas facilmente de solutos de baixo peso molecular por meio de uma membrana semipermeável capaz de reter as moléculas proteicas permitindo a passagem das moléculas menores do soluto e da água. Isto torna essa técnica muito interessante, principalmente quando se trabalha com meios fermentativos com altas concentrações de substratos, bem como, após etapas de fracionamento com sais para se obter o precipitado ressuspendido livres de íons.

Há que se salientar aqui que como o tamanho dos poros da membrana não são todos iguais a proteína desejada deve ser muito maior que o tamanho dos poros, pois senão ela irá aparecer tanto no filtrado como no retido (Scopes, 1988).

Um problema observado por Lagone et alli.,1996, ao realizar a diálise para parcial purificação da poligalacturonase, foi a perda da atividade dessa enzima após 10 horas de diálise, devido a presença de celulasas no extrato enzimático. Essas enzimas atuam na celulose dos poros da membrana, aumentando seus tamanhos e portanto permitindo a passagem de proteínas de maior peso molecular, sendo desta forma necessário a troca das membrans após 10 horas de diálise. No entanto, contornando esse problema com a troca das membranas, os autores obtiveram um grande aumento da atividade específica após 12 horas de processo.

Savidge e Cole, 1975, quando utilizaram esta técnica na purificação de PGA por *B. megaterium*, obtiveram melhor desempenho quando o material ressuspenso foi dialisado por 24 horas com três trocas do tampão, isto porque a substituição da fase aquosa externa por diversas vezes aumenta a eficiência da técnica.

Mesmo verificando perdas na atividade enzimática, como apresentado por Balasingham et alii, 1972, essa etapa é importante para se obter melhores resultados em posteriores purificações, principalmente, quando se usa colunas cromatográficas.

### **2.5.2. Precipitação com solventes orgânicos**

Esta operação de purificação baseia-se na solubilidade das proteínas, sendo que a distribuição de resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos na superfície da molécula de proteína é o fator que determina a solubilidade em vários solventes. No entanto, as propriedades solventes da água podem ser manipuladas para alterar a solubilidade das proteínas, tais como mudanças na força iônica, pH, adição de solventes orgânicos miscíveis, outros solutos inertes ou polímeros, e ainda a combinação destes juntos, com variação de temperatura.

Nesta técnica o princípio que causa a agregação das proteínas é a menor constante dielétrica dos solventes em relação à da água, ou seja, menor capacidade de isolamento das cargas de diferentes polaridades. Isso fará com que sua adição em uma solução proteica aquosa aumente as forças de atração entre cargas opostas nas proteínas resultando na precipitação das macromoléculas (Scopes, 1988). Desta forma, as misturas de proteínas podem ser separadas tendo como base as diferenças quantitativas em sua solubilidade, ou seja, a distribuição de seus resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos na superfície da proteína. As proteínas extremamente hidrofóbicas podem ser 100% solúveis em solventes orgânicos.

Um outro fator que afeta a precipitação por solventes orgânicos é o tamanho das moléculas. Para moléculas maiores, o percentual de solvente orgânico requerido para precipitá-las é menor, assim para moléculas de tamanhos diferentes, mas com similar hidrofobicidade, a ordem da precipitação será o

inverso do tamanho. As moléculas grandes precipitam mais cedo porque elas têm uma maior chance de possuir uma área de superfície carregada que corresponde com outra molécula.

Uma vantagem do fracionamento com solventes orgânicos é que pode ser executado a temperaturas negativas, desde que todos os solventes miscíveis formem misturas com a água, congelando bem abaixo de 0°C.

Em temperaturas aproximadamente de 10°C o efeito da desnaturação já se torna significativo. A desnaturação relaciona-se à interação intramolecular hidrofóbica, que ajuda manter a estrutura da proteína. A baixas temperaturas, a falta de flexibilidade conformacional faz com que seja improvável que moléculas de solventes orgânicos penetrem a estrutura interna da proteína e cause desestabilização. Em altas temperaturas, pequenas moléculas de solventes orgânicos entram nas fendas da superfície, surgidas espontaneamente devido à flexibilidade natural da estrutura e atacam as forças hidrofóbicas. A altas temperaturas as forças hidrofóbicas internas das moléculas de proteínas são fortes e relativamente mais importantes na manutenção da integridade da molécula, sendo que a perda dessas interações resulta rapidamente na desnaturação.

Lucarini et al.,1996, estudaram a precipitação da amiloglicosidase por etanol, e observaram que a % de etanol e a temperatura são as variáveis que exercem maior influência na precipitação. A vazão de adição de etanol também foi uma variável estudada, mostrando que vazões maiores beneficiam a precipitação da amiloglicosidase, resultando em atividades maiores. Isso pode ser atribuído ao tempo de contato entre a enzima e etanol. O tempo de contato e o pH não se mostraram importantes quando estudados isoladamente, indicando que o tempo de contato e a vazão de adição do etanol não são independentes, levando a crer que tempos de contatos menores são favoráveis.

### **2.5.3. Ultrafiltração**

A ultrafiltração é um processo de separação e concentração que utiliza membranas para tais objetivos. Os processos de separação com membranas (PSM) vêm, cada vez mais, se tornando importantes como alternativas aos processos

convencionais de separação nas indústrias químicas, farmacêuticas, biotecnológicas e de alimentos (PETRUS, 1997 *apud* Vieira, 1999). Fatores como o menor consumo energético em comparação aos processos de separação convencionais, a flexibilidade operacional devido ao fato dos sistemas com membranas serem mais compactos e a obtenção de produtos finais de melhor qualidade, contribuíram para o avanço científico e tecnológico dos processos com membranas ocorrido nos últimos 30 anos. Via de regra, os PSM são operados a temperatura ambiente, o que viabiliza sua utilização no fracionamento de misturas envolvendo substâncias termosensíveis. Por este motivo, eles têm sido amplamente empregados na indústria farmacêutica e de alimentos e, mais recentemente, como uma alternativa de “downstream processes” em biotecnologia. Ao contrário da maioria dos processos de separação, os processos com membranas apresentam, ainda, a vantagem de serem extremamente simples do ponto de vista operacional.

Processos com membranas, para os quais a diferença de pressão é a força motriz, têm sido utilizados para concentrar, fracionar e purificar soluções diluídas, em particular, soluções aquosas.

Na ultrafiltração, a solução pressurizada flui sobre uma membrana porosa que permite apenas a passagem de moléculas pequenas. A solução na qual a proteína é concentrada flui sobre a membrana enquanto que, sob pressão, a água flui através da membrana, juntamente com solutos de baixo peso molecular. Nesse processo, portanto, a proteína é retida pela membrana e concentrada em relação aos outros solutos. Nesta técnica não ocorre modificação séria da estrutura e funcionalidade da proteína, pois não é aplicado calor e condições físicas/químicas severas.

Quanto aos poros dessas membranas utilizadas, não se pode falar em diâmetro de poros único, existe de fato, uma certa distribuição normal, em torno de um diâmetro médio, portanto, as membranas podem reter de maneira distinta, solutos de pesos moleculares diferentes. O coeficiente de rejeição,  $R$ , de uma membrana para um dado soluto é definido pela relação:

$$R = 1 - \frac{C_P}{C_0}$$

onde  $C_p$  e  $C_0$  representam a concentração do soluto no permeado e na alimentação, respectivamente. Por este motivo as membranas de ultrafiltração são caracterizadas através da chamada curva de corte, que relaciona o coeficiente de rejeição em função do peso molecular do soluto.

Em nível industrial, o principal problema quanto ao uso da ultrafiltração é a diminuição da taxa de permeação durante o processamento. Esse declínio do fluxo com o tempo pode ser causado por vários fatores, tais como polarização da concentração, adsorção, formação de camada gel e bloqueio dos poros, sendo a equação do fluxo permeado através da membrana dado por:

$$J = \frac{\Delta P}{\eta \cdot R_{\text{Total}}}$$

Em que:  $R_{\text{total}} = R_m + R_a + R_p + R_g + R_{pc}$

Sendo:  $\eta$  - viscosidade do permeado

$R_m$  – resistência intrínseca da membrana

$R_a$  – resistência devido a adsorção

$R_b$  – resistência devido ao bloqueio dos poros

$R_g$  – resistência devido a camada gel

$R_{pc}$  – resistência devido ao fenômeno de polarização da concentração

As diversas resistências contribuem em diferentes graus para a resistência total. No caso ideal, somente a resistência da membrana ( $R_m$ ) está envolvida. Como a membrana tem a capacidade de ser seletiva, haverá um acúmulo de moléculas retidas próximas a superfície da membrana. Isto resultará numa região altamente concentrada próxima a membrana e esta região causará uma resistência adicional ao transporte de massa, conhecida como resistência devido a polarização da concentração ( $R_{pc}$ ). Esta concentração pode tornar-se tão alta que uma camada gel pode ser formada por precipitação de macromoléculas sobre a membrana, o que acarretaria numa resistência adicional,  $R_g$ , que provoca uma perturbação no funcionamento hidrodinâmico do sistema.

Quando a camada gel atinge, sob condições operacionais constantes, um estado de equilíbrio dinâmico, ou seja, partículas são agregadas e desagregadas a uma mesma taxa, a alteração das condições operacionais, principalmente pelo aumento da velocidade tangencial, faz com que parte desta camada de gel se desloque junto com a solução circulante.

Não é possível evitar a formação da camada gel quando se trabalha com macromoléculas, porém o controle dessa camada pode ser feito, assim como na polarização da concentração, através de baixa pressão e turbulência ou ainda no material que constitui a membrana.

O outro fenômeno que pode ocorrer é o da adsorção sobre a superfície da membrana assim como dentro dos poros. Este fenômeno depende das propriedades físico-químicas tanto da membrana como dos solutos em contato com esta. Além disso, o grau de adsorção é função direta da concentração de soluto na interface membrana/solução, ou seja, quanto maior o fenômeno de polarização da concentração, maior será a adsorção. Novamente, a consequência será um aumento na resistência ao transporte de massa, alterando as características de transporte de membrana (Petrus, 1997, apud Vieira, 1999).

Na diafiltração, o solvente é repostado por tampão fresco, pois o objetivo é só remoção de contaminantes e não a concentração do soluto.

Após a etapa de microfiltração, Illanes et alli.,1994, realizaram uma diafiltração e concentração de PGA de *B. megaterium* em uma unidade de ultrafiltração em fibra oca. A taxa de alimentação foi de 6 litros/min a uma pressão transmembrana de 20 psig, e as fibras tinham um diâmetro interno de  $7,5 \cdot 10^{-4}$  m. O valor da curva de corte da membrana (MWCO) era 100000 D com área total de membrana de  $0,0465 \text{ m}^2$ .

As condições usadas por Senthilvele e Pai,1996, usando um sistema de fibra oca foram: taxa do fluxo de alimentação de 850ml/min a uma pressão transmembrana de  $0,28 \text{ kg/cm}^2$ , diâmetro interno das fibras de 0,5mm. O MWCO era 50KD com área total de membrana de  $500 \text{ cm}^2$ .

#### 2.5.4. Adsorção por troca iônica

O processo de adsorção é uma técnica bastante utilizada na purificação e concentração de proteínas, sendo que a adsorção por troca iônica baseia-se na distribuição de cargas das proteínas (Scopes, 1988). As proteínas são adsorvidas nas resinas trocadoras de íons por ligações eletrostáticas entre as cargas opostas da superfície da proteína e o grupo carregado do adsorvente.

Os suportes cromatográficos (resinas) subdividem-se em aniônicos e catiônicos. Os primeiros possuem ligantes carregados positivamente, destacando-se entre eles o dietilaminoetil (DEAE), aminoquaternário (Q), aminoetilquaternário (QAE). Nos segundos, os ligantes estão carregados negativamente e entre eles, tem-se o carboximetileno (CM), metilsulfonato(S), propilsulfonato (SP). As proteínas, como regra geral, ficam carregadas positivamente a valores de pH baixos porque os resíduos dos aminoácidos estão protonados e, pelo contrário, a valores de pH elevado apresentam em geral uma carga superficial líquida negativa.

A capacidade desses suportes depende da concentração dos grupos iônicos e da porosidade do suporte, verificando-se exclusão molecular ou uma difusão dificultada das proteínas nos poros de pequeno diâmetro. A capacidade típica de adsorção de proteínas para esses adsorventes é da ordem de 100 mg proteínas/ml de gel, sendo também afetada por fatores externos, como o valor de pH e concentração de sal no tampão. Em consequência, para uma proteína concreta, as condições de ligação e a capacidade do gel têm que ser determinadas experimentalmente. A desorção da proteína faz-se por eluição competitiva ou pela variação do pH no tampão eluente, de modo a alterar a carga superficial da proteína (Fonseca, 1995).

Os modelos matemáticos mais utilizados na literatura para representar o equilíbrio entre a quantidade de proteína adsorvida e a que permanece na fase líquida são os Linear, Langmuir, e Freundlich. Dentre esses apenas o de Langmuir tem base teórica. A equação 1 representa o modelo de Langmuir, a equação 2 o Linear e a equação 3 o de Freundlich.

$$q^* = \frac{q_m C^*}{K + C^*} \quad \text{equação 2.1}$$

sendo  $q$  a quantidade de proteína adsorvida por massa ou volume de adsorvente,  $C^*$  é a concentração de equilíbrio,  $q_m$  a quantidade máxima de proteína adsorvida por unidade de massa ou volume de adsorvente e  $K$  a constante de equilíbrio.

Equação de Freundlich

$$q = K \cdot y^n \quad \text{equação 2.2}$$

Equação linear

$$q = K \cdot y \quad \text{equação 2.3}$$

onde  $q$  a quantidade de proteína adsorvida por massa ou volume de adsorvente,  $y$  é concentração de proteína livre em solução e  $K / n$  são constantes.

#### 2.5.4.1 Adsorção em leito expandido (ALE)

A adsorção em leito expandido é uma tecnologia integrada para a recuperação primária de proteínas a partir de soluções contendo células ou resíduos celulares em suspensão sem a necessidade de remoção prévia das mesmas. Essa operação combina clarificação, purificação e concentração em uma única etapa como é mostrado na Figura 2.4 (Calado et alli.,2001; Lin et alli., 2001).

Diversas são as vantagens apresentadas por esta técnica, entre elas o aumento de rendimento do produto devido ao menor número de etapas necessárias e o menor tempo de exposição do produto alvo às proteases presentes no caldo de cultivo. Adicionalmente, a aplicação de ALE elimina a necessidade de equipamentos caros e com alto custo de energia, como por exemplo, centrifugas contínuas e unidades de microfiltração. Esta técnica é especialmente atrativa quando a corrente de alimentação tem uma baixa concentração de produtos e um alto conteúdo em biomassa. (Shepard et alli.,2001).

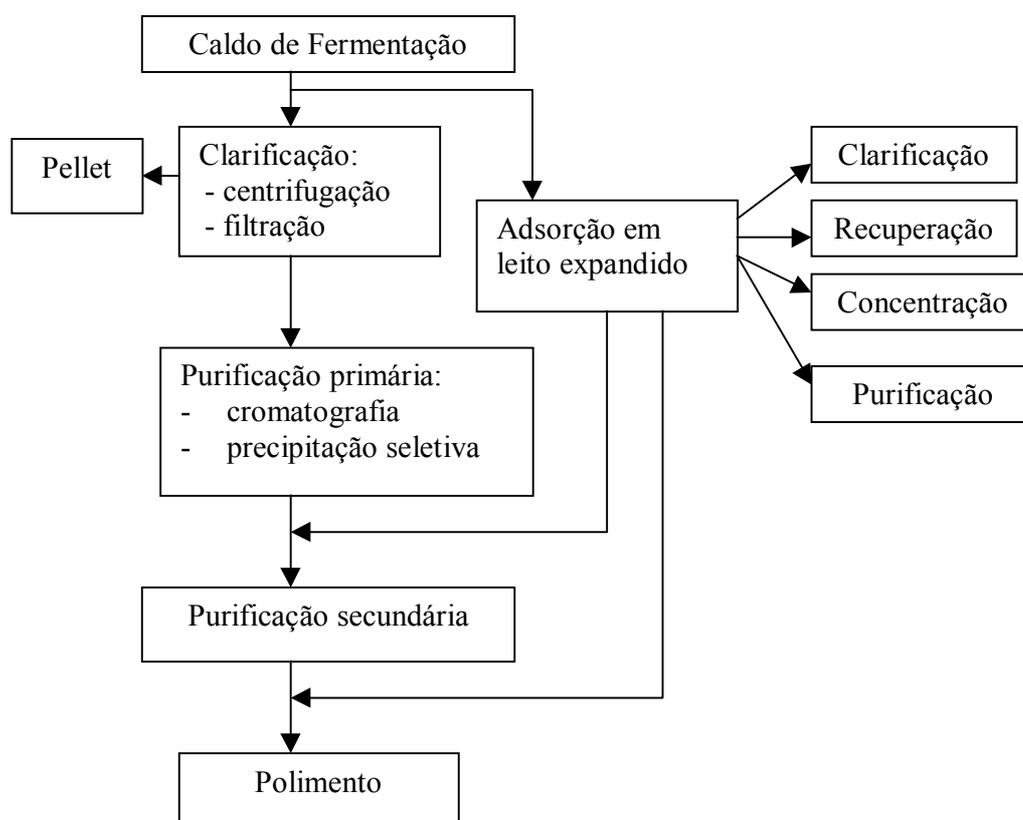


Figura 2.4. Comparação entre um processo de purificação convencional e o processo integrado de adsorção em leito expandido (Calado et alli.,2001)

O princípio de funcionamento desta técnica baseia-se na fluidização. Dessa forma, partindo-se de um leito fixo e aumentando-se a vazão de fluido para o leito atinge-se uma velocidade na qual a força de arraste iguala-se ao peso das partículas. Então, um leito fluidizado estável é formado quando os adsorventes são suspensos devido ao equilíbrio entre a velocidade de sedimentação e a velocidade do fluido ascendente. No uso da ALE inicialmente este equilíbrio é atingido com uso de tampão, e somente após atingir este equilíbrio o caldo de fermentação é aplicado na coluna. O leito expandido permitirá a adsorção das proteínas enquanto que os sólidos suspensos podem passar no leito sem adsorção. O fato das células possuírem uma menor densidade em relação as partículas adsorventes permite que as células sejam arrastadas para fora da coluna (Calado et alli.,2001 ).

O conhecimento do comportamento do leito em função das propriedades físicas das partículas e do fluido é de fundamental importância para as operações

usando leito expandido. Essa caracterização faz-se principalmente medindo-se a expansão do leito em função da velocidade do fluido, ou observando-se a influência de outros fatores como distribuição de tamanho das partículas, viscosidade do fluido, presença de células, pH, concentração de proteína, condutividade do caldo, na ligação proteína-adsorvente. Chase e Draeger, 1992 mencionam que o sucesso da purificação de proteínas, usando a adsorção em leito expandido, depende crucialmente da habilidade do sistema em produzir um leito com expansão estável.

Em nível de adsorventes, foram introduzidos recentemente no mercado Streamline® SP e Streamline® DEAE, os quais possuem propriedades ideais para uso em leitos expandidos. Esses adsorventes são constituídos por uma matriz macroporosa de agarose, com 6% de ligações cruzadas, incorporando um núcleo de quartzo que lhes conferem uma distribuição de tamanho de partículas e densidade própria para aplicação em leitos expandidos. Streamline®SP possui o grupo sulfapropil ( $-O-CH_2CHOHCH_2O-CH_2CH_2CH_2SO_3^-$ ) que é um forte trocador de cátions. Streamline®DEAD possui um grupo que lhe confere o caráter de um fraco trocador de ânion, o dietilaminoetil ( $-O-CH_2CH_2-N^+(C_2H_5)_2H$ ). Ambos possuem uma faixa de tamanho de 100-300  $\mu m$  e estabilidade de pH na faixa de 2-11.

Com relação às condições do caldo de fermentação na estabilidade do leito e na capacidade de adsorção proteína-adsorventes, são encontrados alguns trabalhos na literatura onde os pesquisadores verificaram a influência da massa celular e também otimizaram as propriedades do fluido para obter um melhor desempenho na ALE (Lin et alli.,2001; Shepard et alli., 2001; Bierau et alli.,2001; Calado et al., 2002; Santos et alli.,2002). Lin et al.,2001, comentam que inicialmente os processos são otimizados para as condições de separação (adsorção e desorção) da proteína desejada em leitos empacotados, seguido por extensivos estudos no modo expandido com sobrenadantes clarificados para só então aplicar o caldo bruto.

Lin et al.,2001, pesquisaram uma forma de minimizar as interações entre o adsorvente e a biomassa (células de *S. cerevisiae*). Os autores verificaram em trabalhos anteriores que as interações entre os trocadores iônicos e a biomassa são

dominadas principalmente por forças eletrostáticas, portanto a condutividade da suspensão celular foi escolhida como o principal parâmetro operacional para modular a adesão celular. Os pesquisadores realizaram os experimentos iniciais em tampão fosfato 20mM pH 7,4 e condutividade de  $3,5 \text{ mS cm}^{-1}$  e detectaram uma forte interação entre as células e o trocadores aniônicos (Streamline Q). Esse comportamento foi explicado pela suposição que a pH neutro a maioria das células são polarizadas negativamente e estão propensas à adsorção nos trocadores aniônicos carregados positivamente. Conseqüentemente, a interação entre a biomassa e o adsorvente foi reduzida significativamente pelo aumento da condutividade da suspensão de  $3,5 \text{ mS cm}^{-1}$  para  $35 \text{ mS cm}^{-1}$ .

Shepard et al.,2001, estudaram a purificação de 2 proteínas humanas recombinantes (denominadas proteína 1 e 2) diretamente do caldo de fermentação de *Pichia pastoris*, contendo de 30-44% de biomassa, utilizando adsorção em leito expandido. Os autores também estudaram a capacidade de ligação dinâmica da proteína 2 no caldo bruto e no sobrenadante clarificado. Os resultados mostraram que capacidade de ligação dinâmica (q10%) foi de 33 mg/ml de caldo de fermentação e de 57 mg/ml de sobrenadante clarificado. Esses dados mostraram que a biomassa reduziu a capacidade dinâmica para a proteína desejada.

Calado et al.,2002, estudaram o efeito das condições de fermentação de *S. cerevisiae* na adsorção de cutinase utilizando leito expandido. Os autores verificaram que a redução na quantidade de extrato de levedura de 20 para 10 g/L conduziu a um decréscimo de 29% na produção de cutinase, porém a capacidade de adsorção da cutinase no adsorvente catiônico Streamline SP foi aumentado a 6,7 vezes. Uma vez que os processos de purificação contribuem com até 80% do custo do produto final, foi deduzido que uso de 10 g/L de extrato de levedura otimiza a produção global de cutinase. É também de suas conclusões que, a diluição do caldo de fermentação de 4:5 (v/v), o qual reduz a condutividade, aumentou a capacidade de ligação dinâmica (q5%) da cutinase no adsorvente catiônico em 1,9 vezes. A capacidade de adsorção dinâmica 5% (q5%) foi escolhida pelos autores como parâmetro pois é usual na indústria parar a alimentação quando a concentração de saída do produto desejado (A) tenha atingido 5% da concentração de alimentação ( $A_0$ ) pois, embora o aumento da

carga além de  $A/A_0 = 0,05$  possa aumentar a cutinase total adsorvida, isto conduz a uma perda do produto.

Santos et alli., 2002, verificaram a influência da presença de 5% de *Bacillus pumilus* (massa úmida) na adsorção de xylanase no adsorvente catiônico Streamline SP. Os autores detectaram dois picos de atividades na eluição com fatores de purificação respectivamente de 13,8 e 3,2 vezes e rendimentos de 21,8% e 23,7% para os experimentos em leito expandido sem a presença de células. No entanto, quando 5% de massa celular estava presente os fatores de purificação diminuíram para 2,3 e 1,7 vezes (picos 1 e 2) e os rendimentos para 13,2 e 21,8%.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Materiais**

##### **3.1.1. Produção da Enzima PGA por *B. megaterium***

###### **3.1.1.1. Microrganismo**

*Bacillus megaterium* ATCC 14945 cedido pela Fundação Tropical – Campinas, SP, mantido na geladeira em tubos inclinados contendo 20g/L de ágar, 3g/L de extrato de carne, 5g/L de peptona e 1,5g/L de glicose. A outra forma de armazenamento do microrganismo foi em ultrafreezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  utilizando glicerol 20% como crioprotetor.

###### **3.1.1.2. Nutrientes/Reagentes**

Soro de queijo (Sigma), soro de queijo “in natura” (doador pela Cooperativa de Laticínios São Carlos), caseína (Riedel), alcalase<sup>®</sup>(0,6L) (Novo Indústria do Brasil), aminoácidos (Synth/Sigma/Ajinomoto), ácido fenil acético (Carlo Erba), carbonato de cálcio (Synth), glicose (Synth), vitaminas (Aldrich/Sigma), sais minerais (Synth/Mallinckrodt), glicerol (Synth) e Penicilina G (Paraquímica). Demais reagentes utilizados eram de grau analítico de diferentes marcas comerciais.

##### **3.1.2. Produção da Enzima PGA por *E. coli***

###### **3.1.2.1. Microrganismo**

O microrganismo utilizado na síntese de PGA foi a *E. coli* ATCC 9637 gentilmente cedida pela Cipan. No laboratório onde foram realizados os ensaios

(Instituto Superior Técnico de Lisboa – Portugal) o microrganismo foi mantido congelado em glicerol – 70°C, sendo que a partir desse congelado que se iniciou a propagação em meio sólido.

### **3.1.2.2. Nutrientes/Reagentes**

Extrato de levedura proveniente de diferentes marcas (Difco, Merck, Sigma), ácido fenil acético (Difco), peptona (Difco) e Penicilina G potássica (Cipan). Os demais reagentes utilizados eram de grau analítico de diferentes marcas comerciais.

### **3.1.3. Purificação de PGA de *E. coli***

#### **3.1.3.1. Enzima**

A enzima utilizada foi a PGA produzida pela *E. coli* ATCC 9637, de acordo com o descrito no item 3.2.8. As soluções protéicas fontes da enzima foram utilizadas ao nível do homogenato, resultante do processo de ruptura por sonicação, e do extrato enzimático, após separação dos fragmentos celulares.

#### **3.1.3.2. Suporte**

O adsorvente utilizado na adsorção foi o Streamline® SP da Pharmacia, o qual é constituído por uma matriz macroporosa de agarose, com 6% de ligações cruzadas, incorporado de um núcleo de quartzo que lhe confere uma distribuição de tamanho de partículas (100-300 µm) e densidade própria para aplicação em leitos expandidos.

### **3.1.4. Purificação de PGA de *B. megaterium***

#### **3.1.4.1. Enzima**

A enzima utilizada foi a PGA produzida por *B. megaterium* ATCC 14945, de acordo com o descrito no item 3.2.1.

#### **3.1.4.2. Membranas de diálise**

As membranas de diálise utilizadas neste trabalho foram provenientes da Fundação Sardi com curva de corte de 14000 Da e diâmetro de 35mm.

#### **3.1.4.3. Solvente Orgânico**

O solvente utilizado para a realização da técnica de precipitação por solventes orgânicos foi o etanol da marca Mallinckrodt.

#### **3.1.4.4. Suporte**

O adsorvente utilizado na adsorção foi o Streamline® SP da Pharmacia (mesmo anterior – item 3.1.3.2).

### 3.1.5. Principais Equipamentos

- Câmara rotativa de temperatura controlada marca New Brunswick Scientific “shaker”
- Câmara rotativa de temperatura controlada marca Aralab (Lisboa-Portugal)
- Reator tipo tanque agitado BIOFLO II fabricado pela New Brunswick Scientific com capacidade para 5 litros, acoplado a um sistema de aquisição de dados e analisador dos gases de saída ,CO<sub>2</sub> e O<sub>2</sub>.
- Reator tipo tanque agitado Biostat M fabricado pela Braun com capacidade para 5 litros (Lisboa – Portugal)
- Autoclave marca FABBE modelo 103, 4000W
- Autoclave marca FABBE modelo 103, 2000W
- Estufa de secagem e esterilização marca FANEM modelo 320 – SE
- Estufa de secagem e esterilização marca FANEM modelo 315/9
- Câmara de fluxo laminar marca VECO
- Balança analítica marca METTLER modelo PB 3002
- Balança de precisão marca KERN modelo 410
- pHmetro marca ORION modelo 420 A
- Espectrofotômetro marca PHARMACIA BIOTECH modelo Ultrospec 2000
- Banho termostático marca BROOKFIELD modelo EX – 200
- Banho termostático marca NESLAB modelo RTE – 111
- Bomba de vácuo marca FABBE modelo 341
- Centrífuga marca EPPENDORF modelo 5403
- Centrífuga marca Beckmann modelo J-21C (Lisboa – Portugal)
- pHstato marca METROHM modelo 718 STAT Titrino
- Reator de vidro com camisa de água
- Sonicador Labsonic marca B. Braun (Lisboa – Portugal)

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Produção de Penicilina G Acilase por *B. megaterium* ATCC 14945

A enzima foi produzida seguindo-se o seguinte procedimento:

#### 3.2.1.1. Preparo do Inóculo

O microrganismo foi repicado dentro de tubos de ensaio e deixados em estufa por 7 dias à 30°C. Os microrganismos foram retirados dos tubos por meio de uma solução salina 0,9% p/v e transferidos para o frasco de produção do inóculo. Todo material utilizado como os meios necessários para a obtenção da enzima foram previamente esterilizados. O meio sólido tinha a seguinte composição:

Extrato de carne	3,0 g/L
Peptona	5,0 g/L
Glicose	1,5 g/L
Ágar	20,0 g/L
Água de torneira	1,0 L

Esse preparo do inóculo foi realizado quando se utilizou microrganismo mantido em tubos inclinados. No entanto, quando foi utilizado microrganismo mantido em criotubos essa etapa não foi necessária, adicionando-se a solução de esporos contida nos criotubos diretamente nos frascos de produção do inóculo.

#### 3.2.1.2. Obtenção do Inóculo

O inóculo foi preparado em erlenmeyers de 500 mL contendo 75 mL de meio em composições descritas nas Tabela 3.1 (meios com caseína hidrolisada) e Tabela 3.2 (meios com aminoácidos livres). Dependendo do objetivo do ensaio

era selecionado um desses meios. Depois de adicionar o microrganismo, o meio líquido de germinação foi incubado por 24 horas a 300 rpm e 30°C. A solução de sais utilizadas nos diversos meios tinha a seguinte composição (mg/l):  $MgCl_2 \cdot 6H_2O = 75,3$  ;  $CaCl_2 \cdot 6H_2O = 55,1$ ;  $Na_2SO_4 = 53,3$  ;  $FeCl_3 \cdot 6H_2O = 14,5$  ;  $CoCl_2 \cdot 6H_2O = 1,21$  ;  $MnCl_2 \cdot 4H_2O = 1,07$  ;  $CuCl_2 \cdot 2H_2O = 0,8$  ;  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O = 0,68$  e  $ZnCl_2 = 0,063$ .

Cada nutriente foi preparado em concentrações maiores que a atingida no volume final. Portanto, os valores de concentrações nas Tabelas são valores calculados.

Tabela 3.1 – Composição dos meios de germinação com caseína hidrolisada

Nutrientes	Concentrações (g/l) dos nutrientes dos diferentes meios						
	GC1	GC2	GC3	GC4	GC5	GC6	GC7
Caseína Hidrolisada*	40	40	40	40	-	-	40
Solução de sais	-	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	-
Soro	7	7	7	-	7	7	-
Glicose	-	-	5,0	-	-	5,0	-
Lactose	-	-	-	5,0	-	-	-

\* Considerando uma solução de caseína de 80g/L.

Tabela 3.2 – Composição dos meios de germinação com aminoácidos livres

Nutrientes	Concentrações (g/l) dos nutrientes dos diferentes meios							
	GA1	GA2	GA3	GA4	GA5	GA6	GA7	GA8
$\Sigma$ Mistura de aa <sup>++</sup>	40	40	40	40	40	40	20	10
Sais	-	-	-	0,2	0,2	-	0,9	0,9
Lactose	-	5,0	-	5,0	5,0	5,0	5,0	-
Glicose	-	-	5,0	-	-	-	-	-
Soro	7	-	-	-	-	-	-	7
Samprosoy	-	-	-	0,4	-	-	-	-
Levedura	-	-	-	-	0,4	0,4	-	-

<sup>++</sup> Mistura de aa (g/L) = alanina = 1,16 ; arginina = 1,64 ; ácido aspártico = 2,53 ; cistina = 0,13 ; ácido glutâmico = 4,47 ; glicina = 0,44 ; histidina.HCl = 0,98 ; leucina = 4,18 ; isoleucina = 2,13 ; lisina.HCl = 3,02 ; DL-metionina = 2,49 ; fenilalanina = 2,44 ; prolina = 4,3 ; serina = 2,49 ; treonina = 1,91 ; tirosina = 1,96 ; triptofano = 0,53 ; valina = 2,76.

### 3.2.1.3. Produção da enzima em câmara rotativa

A produção da enzima também foi realizada tanto em meio com caseína hidrolisada como em meio com aminoácidos livres, variando-se os diferentes componentes e as concentrações destes, conforme mostrado nas Tabelas 3.3 a e b (meio com caseína hidrolisada) e Tabelas 3.4 a e b (meio com aminoácidos livres). O volume utilizado de meio foi 50 mL em erlenmeyers de 250 mL. A solução de sais utilizada nos meios de produção é a mesma apresentada na obtenção do inóculo. Esses ensaios foram realizados em câmara rotativa (New Brunswick Scientific) a 30°C e 300rpm por até 72h analisando-se a produção à cada 24h. Após cada tempo de fermentação as amostras foram centrifugadas a 14.000g por 20 minutos a 4°C. O material sedimentado foi coletado e seco para determinação da concentração celular e o sobrenadante utilizado em análises posteriores.

Tabela 3.3 a.- Composição dos meios de produção com caseína hidrolisada

Nutrientes	Concentrações (g/L) dos nutrientes dos diferentes meios								
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5	PC6	PC7	PC8	PC9
Caseína hidrolisada*	51,3	51,3	51,3	51,3	51,3	51,3	-	-	51,3
Solução de sais	-	0,2	0,2	0,2	0,4	0,8	0,2	0,2	0,2
Soro	19,6	19,6	19,6	-	19,6	19,6	19,6	19,6	-
Glicose	-	-	14,7	-	-	-	-	14,7	-
Lactose	-	-	-	14,7	-	-	-	-	-
AFA	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
CaCO <sub>3</sub>	4,13	4,13	4,13	4,13	4,13	4,13	4,13	4,13	4,13

\* Considerando uma solução de caseína de 80g/L.

Tabela 3.3 b.- Composição dos meios de produção com caseína hidrolisada

Nutrientes	Concentrações (g/L) dos nutrientes dos diferentes meios									
	PC10	PC11	PC12	PC13	PC14	PC15	PC16	PC17	PC18	PC19
Caseína hidrolisada*	51,3	51,3	51,3	-	-	-	-	-	-	-
Solução de sais	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Soro	19,6	-	19,6	-	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6
Glicerol	14,7	14,7	-	-	-	-	-	-	-	-
AFA	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
CaCO <sub>3</sub>	4,13	4,13	-	-	-	-	-	-	-	-
Soro líquido hidrolisado	-	-	-	34	34	-	-	-	-	-
Triptona	-	-	-	-	-	-	9	51,4	-	-
Peptona	-	-	-	-	-	25,6	-	-	-	-
Caseína difco	-	-	-	-	-	-	-	-	10	5

Tabela 3.4 a – Composição dos meios de produção com aminoácidos livres

Nutrientes	Concentrações (g/L) dos nutrientes dos diferentes meios							
	PA1	PA2	PA3	PA4	PA5	PA6	PA7	PA8
Σ Mistura de aa <sup>++</sup>	51,3	51,3	51,3	51,3	51,3	51,3	10	20
Solução de sais	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,4	0,4
Lactose	-	-	14,7	0,7	14,7	14,7	14,7	14,7
Glicose	14,7	0,7	-	-	-	-	-	-
Ácido fenil acético	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7	-	2,7	2,7
Carbonato de cálcio	4,13	4,13	4,13	4,13	4,13	4,13	-	-
Mistura de vitaminas <sup>+</sup>	2,5	2,5	2,5	2,5	-	-	-	-

<sup>++</sup> Mistura de aa (g/L) = alanina = 1,16 ; arginina = 1,64 ; ácido aspártico = 2,53 ; cistina = 0,13 ; ácido glutâmico = 4,47 ; glicina = 0,44 ; histidina.HCl = 0,98 ; leucina = 4,18 ; isoleucina = 2,13 ; lisina.HCl = 3,02 ; DL-metionina = 2,49 ; fenilalanina = 2,44 ; prolina = 4,3 ; serina = 2,49 ; treonina = 1,91 ; tirosina = 1,96 ; triptofano = 0,53 ; valina = 2,76.

<sup>+</sup>Mistura de vitaminas: adenina = 2,5 g/L ; ácido p-aminobenzóico = 1 mg/L ; nicotinamida = 1mg/L

Tabela 3.4 b – Composição dos meios de produção com aminoácidos livres

Nutrientes	Concentrações (g/L) dos nutrientes dos diferentes meios					
	PA9	PA10	PA11	PA12	PA13	PA14
$\Sigma$ Mistura de aa <sup>++</sup>	3,4	10	20	10	10	10
Solução de sais	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Soro	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6	19,6
Ácido fenil acético	2,7	2,7	2,7	-	5,4	2,7
glicose	-	-	-	-	-	14,7

### 3.2.1.4. Produção da enzima em fermentador

O procedimento utilizado para a obtenção do inóculo foi o mesmo descrito acima. Após a obtenção do inóculo, o mesmo foi transferido para o biorreator do tipo tanque agitado juntamente com o meio de produção. Para todos os ensaios a temperatura foi mantida a 30°C e as condições operacionais utilizadas são descritas previamente a cada ensaio.

### 3.2.2. Verificação da pureza da cultura de *B. megaterium* ATCC 14945

Inicialmente era obtido o inóculo como descrito no item 3.2.1.2. Este foi diluído em solução salina até obter diluições de  $10^{-4}$  ;  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$ . A partir dessas diluições foram pipetadas amostras e adicionadas em placas de petri contendo o seguinte meio:

Caseína hidrolisada enzimaticamente	40,0 g/L
Soro de Queijo	7,0 g/L
Ágar	20 g/L

Essas placas foram mantidas dentro da câmara rotativa apenas com controle de temperatura (30°C) por 48 horas ou mais, até se observar o

aparecimento de colônias. A Figura 3.1. mostra o procedimento experimental. Quando observou-se colônias aparentemente diferentes, estas foram retiradas por meio de uma alça de platina e repicadas em tubos com ágar nutriente com subsequentes etapas para produção da enzima.

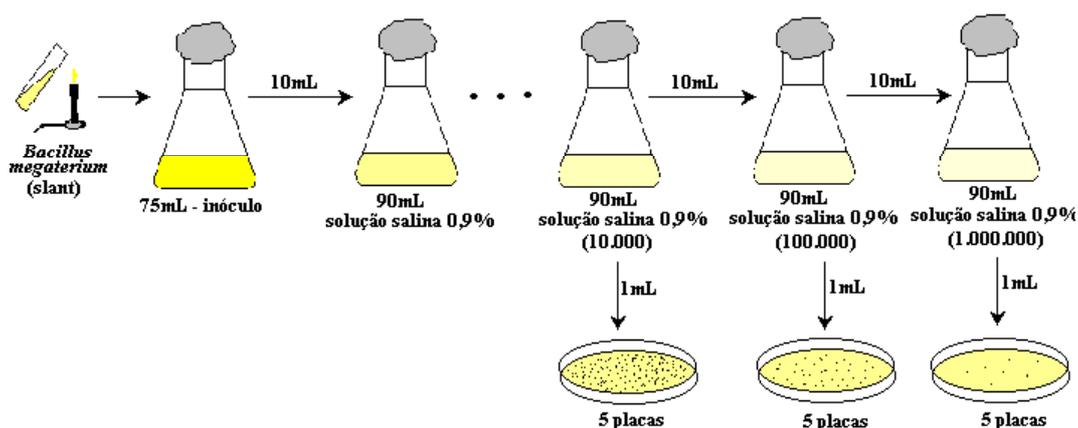


Figura 3.1: Procedimento experimental de seleção do microorganismo

### 3.2.3. Análise das amostras para acompanhamento da produção de PGA de *B. megaterium*

A análise das amostras para o acompanhamento da produção iniciou-se pela separação do microrganismo do meio de cultura. A separação foi feita por centrifugação ou por filtração.

A centrifugação foi feita a 4° C à 11000 rpm por 20 minutos e a filtração foi feita em membrana millipore com porosidade de 0,2 µm.

O sobrenadante foi utilizado para se fazer as análises de atividade enzimática, concentração de proteínas (Lowry e Bradford) e concentração de lactose.

#### 3.2.3.1. Análise de Concentração Celular

A análise da concentração celular foi feita pela pesagem da massa seca. Antes de fazer a filtração a membrana foi previamente seca a 60°C por 24 h,

colocada em dessecador e posteriormente pesada. Filtrou-se uma alíquota de 10 mL da amostra. Após a filtração o permeado foi utilizado para análises e as membranas foram secas novamente a 60°C por 24h e pesadas. Pela diferença de massa determinou-se a concentração celular. Nas amostras que continham carbonato de cálcio, primeiramente centrifugou-se a amostra para então lavar as células com 20 mL de solução de ácido acético 5%. Após a lavagem, as células foram filtradas e secas nas condições citadas acima.

### **3.2.3.2. Determinação da atividade enzimática**

#### **3.2.3.2.1. Método colorimétrico do PDAB**

Este método consiste em determinar a atividade amidase da penicilina G acilase utilizando o colorimétrico p-dimetilaminobenzaldeído de acordo com Balashingham et alli., 1972. O ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) produzido na reação de hidrólise da penicilina G, reage com o PDAB, gerando um produto colorido que foi acompanhado espectrofotometricamente em um comprimento de onda de 415nm. A leitura foi relacionada à concentração de 6-APA por meio de uma curva de calibração obtida com soluções padrões de 6-APA na faixa de 200-1000µg/mL.

Uma unidade internacional (UI) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 µmol de 6-APA a partir de Penicilina G em 1 minuto a 37°C e pH 8,0.

Em um reator aquecido por meio de camisa de água, ajustado para 37°C colocou-se uma quantia de PG 4%(p/v) em tampão fosfato 200mM pH 8,0 e esperou-se estabilizar a temperatura, após adicionou-se a solução de enzima sob agitação. Tomou-se alíquotas em diferentes tempos de reação, no qual foram colocadas em cubetas preparadas com reagente PDAB, que consistia em uma mistura de 0,5 mL de PDAB 0,5% p/v em metanol, 2,0 mL de ácido acético 20% v/v e 1,0 mL de solução de hidróxido de sódio 0,05M, deixando-se reagir por 2,5 minutos.

### **3.2.3.3. Métodos para determinação de proteínas**

#### **3.2.3.3.1. Método de Lowry**

As amostras de proteínas foram avaliadas quantitativamente segundo o método modificado de Lowry (Hartree, 1972), que utiliza como curva padrão a soro albumina bovina, cujo coeficiente angular desta foi de 2,07.

As amostras analisadas foram convenientemente diluídas, quando necessário, para não ultrapassarem a concentração de 0,4 mg/mL.

Em tubos de ensaios, adicionou-se 1 mL de amostra e 5mL de uma solução preparada na hora do uso contendo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% em NaOH 0,1N, CuSO<sub>4</sub> 1% em água destilada e tartarato de sódio potássico 1% em água destilada. Esperou-se 15 min e adicionou-se 0,5mL do reagente Folin Ciocalteau diluído 1:2 na hora do uso. Após 30min foi feita a leitura em espectrofotômetro à 660nm.

#### **3.2.3.3.2. Método de Bradford**

O procedimento utilizado corresponde ao método "standard" descrito no artigo de Bradford (1976).

O reativo foi preparado dissolvendo-se 100mg de Coomassie Brilliant Blue G 250 (BioRad) em 50mL de etanol a 95% v/v (Merck) sob vigorosa agitação. A esta solução adicionou-se 100mL de ácido fosfórico a 85% p/v, diluindo-se em balão volumétrico até 1L com água destilada. Esta solução foi filtrada sob vácuo em sistema Millipore com papel de filtro Wathman 113, e armazenada em frasco plástico na geladeira, sendo estável por duas a três semanas.

Procedimento:

Em tubos de ensaio limpos (isentos de detergente) e secos, adicionou-se 5mL do reativo e 100µl da amostra. A amostra foi convenientemente diluída quando necessário, de forma que a concentração de proteína total não

ultrapassasse a 600mg/L. Agitou-se em vórtice, deixando-se em repouso por 5 minutos. A leitura da absorbância das amostras foi em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595nm.

Para amostras muito diluídas, a solução foi realizar uma diluição inversa das amostras, ou seja, adicionar maior volume de amostra para cada 5 mL do reativo, desde que a leitura da absorbância estivesse compreendida dentro da faixa da curva de calibração, que tinha como coeficiente angular  $1,2 \cdot 10^{-3}$ .

### **3.2.3.4. Determinação da concentração de Lactose**

#### **3.2.3.4.1. Método do Somogyi**

Tanto a maltose quanto a lactose são dissacarídeos que apresentam uma extremidade redutora. Deste modo, fez-se análise de açúcares redutores pelo método do Somogyi, descrito abaixo. Também nesta análise fez-se necessária a preparação de uma curva de calibração com soluções padrões de lactose na faixa de 100 e 500mg/L, cujo coeficiente angular foi de 0,001.

#### a) Reagentes

Solução I:

- 16g de  $\text{NaHCO}_3$  ;
- 12g de tartarato de sódio e potássio  $\text{KOO}(\text{CHOH})_2\text{COONa} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  ;
- 24g de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ;
- 144g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e
- 800mL de água destilada q.s.p

Os sais foram dissolvidos separadamente e as soluções foram misturadas e diluídas a 800mL. Cabe ressaltar que o  $\text{NaHCO}_3$  não deve ser aquecido.

Solução II:

Pesou-se 36g de  $\text{NaSO}_4$  e dissolveu-se a frio em 100mL de solução aquosa 40g/L de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Completou-se o volume para 200mL com água destilada.

### Solução III:

Pesou-se 25g de molibdato de amônio -  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  - e dissolveu-se em 450mL de água destilada. Adicionou-se 21mL de ácido sulfúrico concentrado.

Dissolveu-se, separadamente, 3g de arseniato de sódio monohidrogênio ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) em 25mL de água destilada. Misturou-se as duas soluções, homogeneizou-se e deixou-se em estufa a  $37^\circ\text{C}$  por 24 - 48h.

Deve-se obedecer a ordem de adição dos reagentes. Todas as soluções devem ser armazenadas em frascos escuros e guardadas em estufas a  $37^\circ\text{C}$ .

### b) Procedimento

- Dilui-se a amostra de maneira que a concentração de açúcar redutor estivesse entre 100 e 500mg/L;
- Preparou-se a mistura das soluções I e II, na razão de 4:1, no momento de uso;
- Em tubos de Follin-Wu pipetou-se:
  - 1mL de amostra e
  - 1mL da mistura de soluções I e II
- Tapou-se os tubos com rolhas fendidas e aqueceu-se em banho fervente por dez minutos cronometrados. O banho deve ser aquecido diretamente no bico de Bunsen ( sem a tela de amianto) para que a água permaneça em ebulição ao se colocarem os tubos de Folin-Wu.
- Resfriou-se rapidamente em banho de gelo
- Adicionou-se 2mL da solução III e agitou-se até que ocorre-se o total desprendimento de gases.

- Adicionou-se 20mL de água destilada e homogeneizou-se.
- Preparou-se branco substituindo por água destilada a quantidade de amostra a ser dosada.
- Mediu-se as absorvâncias em espectrofotômetro a 540nm.
- A concentração da amostra foi calculada utilizando uma curva de calibração previamente preparada.

#### **3.2.3.4.2. Método do DNS**

Preparação do reagente:

O reagente deve ser preparado em banho à  $\pm 45^\circ \text{C}$ , ou usando bico de Bunsen com muito cuidado para que não atinja a temperatura de ebulição.

Em um becker de  $\pm 400 \text{ mL}$ , dissolver por completo 30 g de sal de Rochelle P.A. (tartarato duplo de sódio e potássio) em 50 mL de água destilada. Adicionar em seguida 1 g de 3-5 ácido dinitrosalicílico (DNS) à solução anterior, e com uma bagueta de vidro tentar dissolver ao máximo as partículas sólidas. E finalmente adicionar 20 mL de NaOH 2 N (8,3 g em 100 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada), misturando sempre até completa dissolução dos sólidos presentes.

Transferir quantitativamente a solução obtida para balão volumétrico de 100 mL. Colocar este balão em banho de água à temperatura ambiente por  $\pm 2$  horas para resfriamento. Por fim ajustar o volume do balão para 100 mL com água destilada.

Procedimento:

A 1 mL de solução de açúcares redutores, adequadamente diluída, adicionar 2 mL da solução de DNS. O tubo Follin-wu de 25 mL com esta mistura é aquecido por 5 minutos em água em ebulição e a seguir resfriado em água gelada, mantendo os tubos tampados com rolhas fendidas.

Completar o volume do tubo até 25 mL com água destilada, homogeneizar bem, e determinar a absorvância no espectrofotômetro. A leitura é feita a 540 nm (visível) e a faixa de concentração de açúcares redutores deve ser de 0,6 a 1,5 g/L. A curva de calibração foi preparada com soluções de glicose nessa faixa de concentração.

### **3.2.3.5. Determinação de glicose e lactose por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)**

Glicose e lactose foram acompanhadas por cromatografia líquida de alta performance (HPLC WATERS), usando refratômetro diferencial 410-Waters. A coluna utilizada foi íonpak KS 801 e a pré coluna sugar KS-G ambas da Shodex. Composição da fase móvel era água Milli-Q, com fluxo de 1.0 mL/min. Temperatura da coluna de 80°C e do refratômetro 34°C. As amostras foram previamente filtradas em membranas millipore de tamanho de poro 0,45 µm.

### **3.2.3.6. Determinação de aminoácidos, peptídeos e ácido fenil acético por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)**

Para análise de aminoácidos foi usada uma coluna Shim-pack ISC-30 amino-Na (Shimadzu) e as fases móveis A (tampão citrato de sódio 0,2 N, pH 3,2), B (citrato de sódio 0,6 N e ácido bórico, pH 10) e C (hidróxido de sódio 0,2 N) em um gradiente apropriado a uma vazão constante de 0,50 mL/min. Foram usados para derivatização, pós-coluna, dos aminoácidos os reagentes RA (solução de ácido bórico-ácido carbônico, pH 10, contendo 0,04% (p/v) de hipoclorito de sódio comercial) e RB (solução 0,8 mg/mL de o-ftalaldeído, contendo 0,4 mg/mL de Bry-35 e 0,2% (v/v) de 2-mercaptoetanol) a uma vazão total de 0,40 mL/min. A temperatura de análise era de 60°C e os aminoácidos eram detectados, após serem derivatizados, por fluorescência a 350 nm ( $\lambda$  de excitação) e 450 nm ( $\lambda$  de emissão).

Os peptídeos e o ácido fenil acético foram determinados utilizando o mesmo sistema LC, mas agora usando a coluna Superdex<sup>TM</sup> Peptide HR 10/30 (Pharmacia Biotech) a temperatura ambiente. Neste caso o eluente 1 foi o tampão fosfato 0,02 M com 0,25M de NaCl e o eluente 2 foi água milli-Q. A detecção foi em 214nm.

### 3.2.4. Hidrólise de Caseína

Hidrólise da caseína 8% foi realizada em pH-stato Metrohn modelo Titrino, usando uma solução 5M de NaOH para manter o pH constante. Temperatura de 50°C e pH = 8 foram as condições usadas nos ensaios utilizando todas as proteases. A relação mássica entre enzima e caseína usadas nos experimentos foi 1/50. O grau de hidrólise foi determinado de acordo com a equação 3.1, fornecida por Adler-Nissen, 1986, cap.5, pg. 122:

$$DH = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{M_p} \times \frac{1}{h_{total}} \times 100 \quad \text{equação 3.1}$$

Onde:

$B$  = consumo de solução de NaOH em mL;

$N_b$  = normalidade da solução de NaOH

$\alpha$  = grau médio de dissociação dos grupos  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> (valores tabelados para cada temperatura e pH, fornecidos por Adler-Nissen, 1986, cap. 5, p. 123).

$MP$  = massa de proteína em g.

$h_{tot}$  = número total de ligações peptídicas no substrato: 8,2 meqv/g, para caseína, e 8,8 meqv/g, para proteínas do soro (Valores fornecidos por Adler-Nissen, 1986, p.146-147).

### 3.2.5. Atividade proteolítica

A existência de atividade proteolítica foi verificada por 3 métodos diferentes, sendo que o primeiro consistia da adição de caldo de fermentação

(diferentes diluições) em solução concentrada de gelatina e então essa solução foi mantida a 40°C por uma hora e a seguir colocada em geladeira. O segundo método foi a quantificação de NaOH (no pHstato) para manter o pH constante de uma solução que consistia de caseína 8% e de igual volume de caldo de fermentação, ambos a 50°C. E por último (terceiro), utilizou-se o procedimento utilizado pela Novo Industri para determinação de atividade alcalase. Nesse método o substrato NN-dimetil caseína (DMC) é hidrolisado pelas proteases a peptídeos de baixo peso molecular a 50°C e pH 8,3. Os grupos aminos livres formados durante a hidrólise reagem com o ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico (TNBS). A atividade é calculada a partir da densidade ótica (OD) medida a 425 nm, empregando uma curva de calibração.

### 3.2.6. Preparo dos criotubos

Dentre os métodos mais usuais de preservação de microrganismo, o congelamento a baixas temperaturas torna-se mais vantajoso em relação aos demais por preservar a cultura por longos períodos. O preparo dos criotubos com o *B. megaterium* ATCC 14945 passou por várias etapas descritas a seguir:

- A linhagem primeiro foi repicada em tubos inclinados com meio sólido e mantida por 7 dias a 30°C.
- Após 7 dias, os esporos foram suspensos em 3mL de solução salina 0,9% e repassados aos frascos de Roux, previamente preparados com meio sólido. Os frascos de Roux foram então mantidos por 7 dias a 30°C.
- Após este período, foi adicionado aos frascos contendo o meio esporulado uma solução crioprotetora estéril (glicerol 20% v/v) precedida de uma vigorosa agitação e raspagem dos esporos.
- As suspensões de esporos de todos os frascos foram transferidas para um erlenmeyer previamente esterilizado.
- Foi retirada uma alíquota para a contagem dos esporos em câmara de Neubauer e finalmente utilizaram-se os criotubos para acondicionar os volumes de suspensão de esporos referentes à concentração desejada ( $10^8$  esporos/mL).

- Os criotubos foram armazenados em ultrafreezer a (-70°C).

### **3.2.7. Acompanhamento da viabilidade do microrganismo mantido em ultrafreezer**

A viabilidade celular foi acompanhada pelo método da contagem de colônias formadas. Este método considera que o número de colônias que crescem corresponde ao número de células vivas presente na amostra. Deve-se distribuir a amostra a ser examinada sobre a superfície de um meio nutriente, e, após um período de incubação, contar as colônias formadas. Em nosso caso, o plaqueamento era feito em meio ISP-2 que era composto de (g.L<sup>-1</sup>): glicose (4,0), extrato de levedura (4,0), extrato de malte (10,0) e ágar (12,0), pH 7,2.

Esse teste foi realizado antes do microrganismo ser congelado, logo após o congelamento e mais 3 vezes num intervalo de 8 meses. O teste procedia-se da seguinte maneira:

- ❖ com uma pipeta estéril, removia-se 1 mL da amostra e adicionava-se a 99 mL de diluente (solução de NaCl 0,9%). No nosso caso, a amostra era a suspensão de esporos contida num criotubo;
- ❖ com outra pipeta estéril, removia-se 1 mL da amostra diluída e adicionava-se a um tubo de ensaio contendo 9 mL de diluente. Este tubo então, ficava com uma diluição de 10<sup>-3</sup>;
- ❖ agitava-se vigorosamente o tubo de ensaio e, com outra pipeta estéril de 1 mL, removia-se 0,1 mL para cada placa com diluição 10<sup>-4</sup> e colocava-se 1 mL no tubo de ensaio com diluição 10<sup>-4</sup>. Esse passo foi realizado até obter tubos com diluição de 10<sup>-5</sup>.

As placas eram incubadas a 30<sup>0</sup>C por 48 horas e então era realizada a contagem de colônias formadas num contador de colônias. As placas eram feitas em quadruplicatas para que pudesse ser lida a média das colônias. Daí então multiplicava-se este valor (por exemplo uma média de 150) pela diluição da placa correspondente, ou seja, se tivesse sido lido na placa com diluição de 10<sup>-5</sup>, o

resultado seria  $150 \times 10^5$  esporos.mL<sup>-1</sup>. A Figura 3.2 ilustra um esquema do procedimento para o teste da viabilidade celular.

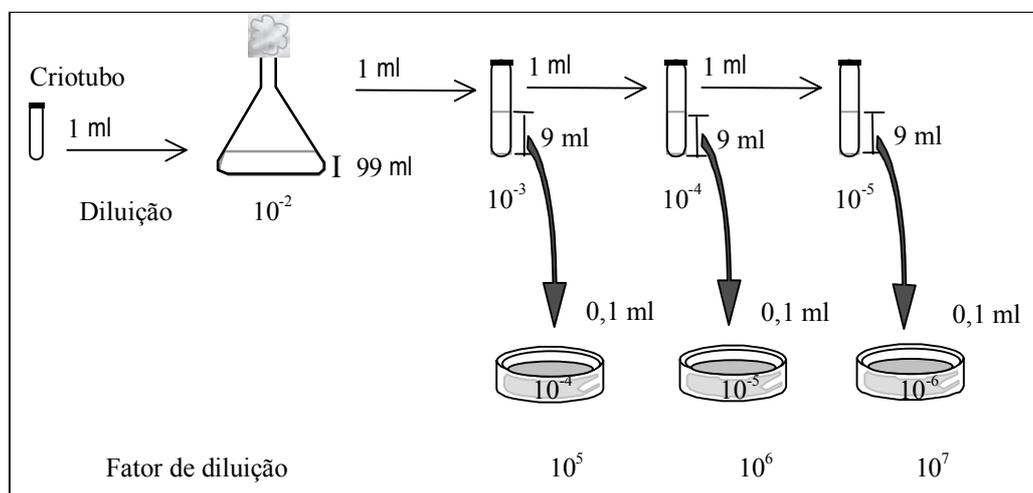


Figura 3.2. Representação do procedimento utilizado para o teste da viabilidade celular

### 3.2.8. Produção de Penicilina G Acilase por *E. coli* ATCC 9637

A enzima foi produzida seguindo-se o seguinte procedimento:

#### 3.2.8.1. Preparo do Inóculo

O microrganismo foi repicado dentro de tubos de ensaio e deixados em câmara rotativa por 2 dias à 30°C. Os microrganismos foram retirados dos tubos por meio de uma solução salina 0,85% p/v e transferidos para o frasco de produção do inóculo. O meio sólido tinha a seguinte composição:

Extrato de levedura	5,0 g/L
Peptona	10,0 g/L
NaCl	5,0 g/L
AFA	1,0 g/L
Ágar	30,0 g/L
pH ajustado para	7,2

### 3.2.8.2. Obtenção do Inóculo

O inóculo foi preparado em erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio dentro da câmara rotativa a 250 rpm e 26°C, cujo meio tinha a seguinte composição:

Extrato de levedura	40,0 g/L
AFA	1,0 g/L
pH ajustado para	7,5

### 3.2.8.3. Produção da enzima em câmara rotativa

A produção de PGA obtida pelo cultivo de *E. coli* foi realizada em erlenmeyers de 250 mL contendo 100mL de meio com a seguinte composição:

Extrato de levedura	10,0 g/L
AFA	3,0 g/L
pH ajustado para	7,2

Após a inoculação do microrganismo (5% do volume total de meio) o meio de produção ficou na câmara rotativa a 24°C e 250 rpm. No decorrer do cultivo (máximo de 45horas) eram retiradas amostras para analisar a evolução da fermentação.

### 3.2.8.4. Produção da enzima em fermentador

O procedimento utilizado para a obtenção do inóculo foi o mesmo descrito acima. Após a obtenção do inóculo, o mesmo foi transferido para o biorreator do tipo tanque agitado onde o meio de produção já estava acondicionado. Para todos os ensaios realizados a temperatura foi mantida em 24°C , controle de pH na faixa de 6,5-8,5 e aeração de 4 litros/min. Quanto ao oxigênio dissolvido e a agitação,

essas foram condições que variaram e estão descritas anteriormente a cada ensaio (item 4.4).

Os valores de pH e de oxigênio dissolvido foram medidos através de eletrodos calibrados previamente a esterilização. O eletrodo de pH foi calibrado com tampões apropriados na faixa de 4 e 7. A calibração do eletrodo de oxigênio dissolvido foi feita da seguinte maneira: calibrou-se o valor de 0%, antes da esterilização, mergulhando o eletrodo numa solução aquosa de sulfito de sódio 500 mg/L e sulfato de cobre pentahidratado 20 mg/L. Esta solução reage e consome rapidamente o oxigênio dissolvido. Por sua vez, o valor de 100% de oxigênio dissolvido foi obtido no meio de fermentação, após sua esterilização e resfriamento, impondo uma vazão de ar de 4 litros/min e uma agitação de 750 rpm, saturando rapidamente o meio de fermentação.

### **3.2.9. Análise das amostras para acompanhamento da produção de PGA por *E. coli***

No decorrer das fermentações recolheram-se amostras para avaliar a evolução da fermentação. As variáveis analisadas foram pH, concentração celular (densidade ótica a 600 nm) e atividade enzimática. Os valores de pH e densidade ótica foram lidos diretamente das amostras recolhidas, sendo necessário somente fazer a diluição apropriada para ler a densidade ótica. Para analisar a atividade enzimática das células (enzima intracelular) foi necessário primeiro separá-las do meio através de centrifugação (centrífuga refrigerada Beckmann JA-21) a 8000 rpm, 7°C por 10 minutos. As células foram, então, lavadas por 2 vezes em tampão citrato 20 mM pH 5,8. Esse tampão foi selecionado devido a etapa de purificação. O volume final de células foi de aproximadamente 10 vezes menor que o volume de meio de cultivo. Esse procedimento descrito para analisar a atividade enzimática foi empregado para meios de cultivo oriundos do fermentador. As amostras de cultivo provenientes da câmara rotativa foram centrifugadas em eppendorfs a 5000 rpm, 10 minutos e temperatura ambiente, sendo após lavadas 2 vezes em tampão fosfato 200 mM pH = 8.

### 3.2.9.1. Concentração celular

- Densidade ótica (600nm), a densidade ótica do meio de fermentação foi lida a 600 nm contra solução de NaCl 0,85%, sendo o meio previamente diluído de modo a que o valor da absorbância, a esse comprimento de onda, seja inferior a 0,6.
- Concentração celular ou Biomassa (X), o teor em biomassa, expresso em g cel seca/L, foi determinado através da reta de calibração, a partir do valor da densidade ótica a 600 nm do meio de cultura diluído (FD). Esta reta de calibração foi obtida, por sua vez, de células filtradas e secas.

$$X \text{ (g cel seca/L)} = (0,3 * D.O_{600nm}) * FD$$

### 3.2.9.2 Determinação da atividade enzimática

O método para determinar a atividade de PGA de *E. coli* foi o mesmo utilizado para a PGA de *B. megaterium*, que é o método colorimétrico do PDAB. Contudo, o procedimento foi diferente para as duas enzimas. Nesta etapa (produção de PGA por *E. coli*) a suspensão celular, isenta de meio de cultura e previamente diluída em tampão fosfato 200 mM pH 8,0, foi aquecida a 36°C. À mesma temperatura adicionou-se igual volume de uma solução de penicilina G potássica 4% (p/v) em tampão fosfato 200 mM pH 8,0. Após um determinado tempo de incubação, 15-30 minutos, a reação de hidrólise da penicilina, pela enzima, foi interrompida pela adição de dois volumes de reativo de PDAB. Este reativo, fortemente ácido, desnatura a enzima e o PDAB reage com o grupo amino do 6-APA, formando um composto amarelo (base de “schiff”) cuja intensidade da cor depende da concentração do 6-APA, resultante da reação enzimática. A suspensão reativa foi clarificada por centrifugação ( 5000 rpm, 5 min, temperatura ambiente) e leu-se a absorbância do sobrenadante a 415 nm contra um branco, preparado simultaneamente, mas cuja ordem de adição das soluções de penicilina G e do reativo de PDAB foram invertidas.

O reativo de PDAB foi preparado a partir de 625mg de PDAB dissolvido em 82 mL de metanol, 12,5 mL de NaOH 1M e 100 mL de ácido acético glacial para um volume final de 500 mL que se completou com água destilada.

### **3.2.10. Extração de PGA de *E. coli***

A PGA é uma enzima produzida intracelularmente e, portanto, é necessário realizar a ruptura celular para obter a enzima. O método utilizado para tal foi a sonicação.

#### **3.2.10.1. Sonicação**

A ruptura das células por sonicação efetuou-se com um sonicador Labsonic da B. Braun. O processo de sonicação ocorreu pela aplicação contínua de pulsos de ultrasons durante 2 minutos, produzindo um aumento da temperatura na ordem dos 10 a 15°C. No intervalo entre os pulsos resfriou-se a suspensão celular até à temperatura de 10°C, procedendo-se então a um novo pulso de ultrasons ( até completar 12 minutos).

As experiências de sonicação foram realizadas num processo descontínuo, com as seguintes condições:

- 180 – 200 mL de suspensão celular tamponizada com tampão citrato 20 mM pH=5,8
- Concentração celular em torno de 30 g cel seca/L
- potência do gerador de ultrasons de 200 W

No final da sonicação, o homogenato é constituído por fragmentos celulares e algumas células intactas que são removidas por centrifugação a 15000 rpm, 20 minutos e 5°C. O sobrenadante assim obtido, é uma solução protéica clarificada, designada de extrato enzimático ou clarificado.

### 3.2.11. Purificação de Penicilina G Acilase de *E. coli*

#### 3.2.11.1. Processos de adsorção-desorção de modo descontínuo

Os processos de adsorção realizados para determinação das isothermas e de seleção da força iônica foram feitos em erlenmeyers de 25 mL, contendo 0,5 mL de gel (Streamline<sup>®</sup>SP) equilibrados com tampão de adsorção e 10 mL do extrato enzimático na concentração desejada. Essa mistura é deixada em câmara rotativa a 100 rpm, temperatura ambiente, durante 150 minutos. Em determinados tempos foram coletadas amostras (sobrenadante) e mediu-se a atividade enzimática e a concentração protéica.

As quantidades adsorvidas nos geles, de atividade da enzima e de proteína total, são calculadas pelas seguintes expressões:

$$\text{Ads (UI)} = (A_0 - A_{\text{eq}}) * V_T \quad \text{equação 3.2}$$

E

$$\text{Ads (mg proteínas)} = (P_0 - P_{\text{eq}}) * V_T \quad \text{equação 3.3}$$

Onde:

$A_0$  (UI/mL) e  $P_0$  (mg prot/mL) são respectivamente a atividade e concentração de proteína total na solução protéica no início do processo.

$A_{\text{eq}}$  e  $P_{\text{eq}}$  são as concentrações de enzima e de proteínas atingidas no equilíbrio.

$V_T$  = Volume total oferecido de solução protéica

Para encontrar as capacidades de adsorção do gel para a atividade e proteínas é necessário dividir estas quantidades pelo volume de gel utilizado:

$$q \text{ (UI/mL gel)} = \text{Ads (UI)} / V \text{ gel} \quad \text{equação 3.4}$$

$$q \text{ (mg/mL gel)} = \text{Ads (mg)} / V \text{ gel} \quad \text{equação 3.5}$$

No estudo da influência do pH do extrato enzimático na adsorção-desorção utilizou-se colunas da Biorad de 2mL, contendo a mesma quantidade de gel (0,5 mL) equilibrado com tampão de adsorção. Nesse processo aplicou-se um volume

de 5 mL de extrato enzimático, fez-se a lavagem com 8 mL do tampão de adsorção e por fim, a respectiva eluição (desorção) da enzima com tampão de adsorção adicionado de 150 mM de NaCl ( 3mL – 2 vezes). Os parâmetros calculados neste estudo são apresentados abaixo com suas respectivas fórmulas.

$$Atividadeadsorvida = ((Act_{clarif} \cdot V_{clarif}) - (Act_{ext} \cdot V_{ext}) - (Act_{lav} \cdot V_{lav}))$$

equação 3.6

$$rendimentodeadsorção = \frac{Atividadeadsorvida}{Act_{clarif} \cdot V_{clarif}}$$

equação 3.7

$$rendimentodeeluição = \frac{(Act_{el1} \cdot V_{el1}) + (Act_{el2} \cdot V_{el2})}{Atividadeadsorvida}$$

equação 3.8

$$rendimentodeoperação = \frac{(Act_{el1} \cdot V_{el1}) + (Act_{el2} \cdot V_{el2})}{Act_{clarif} \cdot V_{clarif}}$$

equação 3.9

$$fatordepurificação = \frac{atividadeespecíficaeluição}{atividadeespecíficaclarificado}$$

equação 3.10

$$capacidadedeadsorção = \frac{atividadeadsorvida}{volumeresina}$$

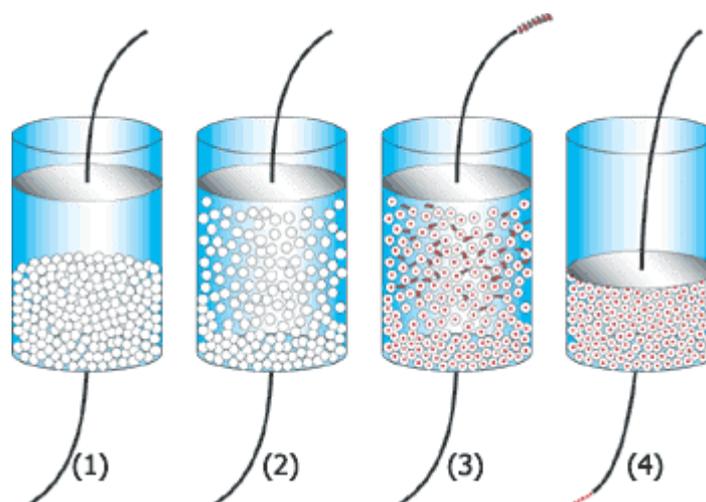
equação 3.11

### 3.2.11.2. Processos de adsorção-desorção de modo contínuo

Os processos de adsorção realizados de modo contínuo utilizaram uma coluna Biorad de 20mL, contendo 8 mL de gel (Streamline<sup>®</sup> SP) equilibrados com tampão citrato 20 mM pH = 4,8. No uso da ALE inicialmente foi realizado o equilíbrio entre o sistema tamponante e o adsorvente, com o fluxo ascendente e de forma expandida, com uma velocidade linear de 5mL/min (condição já estudada por Fonseca, 1995). Após a etapa de equilíbrio seguiu-se a etapa de aplicação da amostra, na mesma velocidade. Aplicada a amostra, realizou-se a lavagem (com tampão), também com o fluxo ascendente e velocidade de 5 mL/min. Então, o fluxo foi interrompido, esperou-se a sedimentação do adsorvente e iniciou-se a eluição da enzima com o sentido do fluxo descendente com o leito fixo, com uma velocidade linear de 2,5 mL/min. O tampão de eluição foi o tampão de adsorção (tampão citrato 20 mM pH = 4,8) adicionado de NaCl 150 mM. Na Figura 3.3 tem-se a ilustração das etapas usadas na adsorção em leito expandido.

Para a adsorção em leito fixo utilizou-se as mesmas condições e soluções, contudo, o fluxo foi sempre descendente.

Após a eluição, a regeneração do adsorvente foi realizada na própria coluna pela passagem abundante de água destilada, solução de NaOH 0,5M/NaCl 0,5M, novamente água destilada e armazenada em solução de etanol 20% (v/v).



(1)= leito fixo (2) = expansão e equilíbrio (3) = aplicação da amostra seguida por lavagem (4) = eluição e regeneração

Figura 3.3 – Etapas usadas na adsorção em leito expandido (ALE)

Nesse modo de operação a capacidade de adsorção foi calculada conforme a equação 1 do item 4.6.2.1.4. Os rendimentos de recuperação e de purificação foram obtidos pela seguintes fórmulas:

$$\text{rendimentoderecuperação} = \frac{\sum Act_{el} \times V_{el}}{Act_{clarif} \times V_{clarif}} \quad \text{equação 3.12}$$

$$\text{fatordepurificação} = \frac{\text{atividadeespecíficaeluição}}{\text{atividadeespecíficaclarificado}} \quad \text{equação 3.13}$$

### **3.2.12. Purificação/Concentração de PGA de *B. megaterium***

Os métodos utilizados nessa etapa foram os seguintes:

#### **3.2.12.1. Diálise**

As membranas utilizadas foram previamente tratadas para eliminação de metais pesados, e então o caldo de fermentação foi convenientemente acondicionado e dialisado contra tampão fosfato 5mM pH 6, com 3 trocas do tampão durante 24 horas.

##### **3.2.12.1.1. Tratamento das membranas**

- 1- Lavou-se com detergente e água de torneira
- 2- Retirou-se todo detergente
- 3- Ferveu-se durante 15 minutos ( 2x ), passou-se água quente dentro
- 4- Colocou-se as membranas em solução de etanol 50% de 2 à 5 litros por 1 hora ( 2x )
- 5- Imersão por 1 hora em bicarbonato de sódio 10mM, EDTA 1mM, 2 trocas e em seguida 2 vezes em água milli-Q
- 6- Estocou-se a 4° C em azida sódica 1mM
- 7- Antes de usar lavar com a solução de diálise.

Observação: Uma vez iniciado o tratamento acima, nunca deixe as membranas de diálise secar, porque elas rompem.

### **3.2.12.2. Concentração com Solventes Orgânicos**

Neste método o meio de fermentação contendo a proteína desejada foi precipitado com a adição lentamente de solvente (etanol) à frio. O volume de solvente utilizado foi de 4 volumes para cada volume de solução de enzima. O meio de fermentação foi mantido em um banho frio (-1°C) de volume suficiente para assegurar rápida transferência de calor. Durante a adição do solvente foi necessário uma adequada agitação. Quando a adição do solvente foi completada, a mistura permaneceu mais 15 minutos no banho frio com temperatura constante, para atingir o equilíbrio, e então centrifugado a -1°C e 11000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi desprezado cuidadosamente e o precipitado formado redissolvido em um volume mínimo de tampão fosfato 200 mM pH 8.

### **3.2.12.3. Processos de adsorção-desorção**

Os processos de adsorção foram os mesmos descritos no item 3.2.11.1 e 3.2.11.2.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Produção de PGA por *B. megaterium* em câmara rotativa

#### 4.1.1. Estudos da estabilidade do microrganismo: conservação, pureza, seleção e reativação da cultura

Inicialmente foi realizado um ensaio de produção de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945 utilizando meio de fermentação reportado na literatura (Berazaín,1997), denominado de PC1, com o intuito de verificar a estabilidade do microrganismo, uma vez que este estava estocado em geladeira por 2 anos sem repique (denominado em nosso laboratório por linhagem original). Os valores encontrados de atividade enzimática (Tabela 4.1) mostram que o microrganismo se manteve estável quando conservado em meio sólido (tubos inclinados) em geladeira, pois valores similares foram obtidos por Pinotti, 1999, utilizando o mesmo microrganismo.

Tabela 4.1. Resultados obtidos na produção de PGA por *B. megaterium* ATCC 14945

Ensaio	MG	MP	Tempo (h)	pH	Atividade enzimática (UI/L)	Cx (g/L)	Atividade específica (UI/g célula)
1	GC1	PC1	Inóculo		-	1,8	-
			0		-	0,2	-
			24	7,9	41,6	3,1	13
			48	8,4	99,0	4,0	25
			72	9,0	97,0	4,1	24

Cx = concentração celular; MG = Meio de germinação; MP = meio de produção

##### 4.1.1.1. Verificação da pureza da cepa de *B. megaterium*

Visando selecionar o microrganismo a ser utilizado como inóculo padrão estudou-se a seguir a pureza da cultura utilizada no ensaio 1. Assim, o microrganismo foi cultivado em meio líquido de germinação e amostras diluídas

em solução salina ( $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ ) foram incubadas em meio sólido. Como pode ser observado na Figura 4.1 a placa com diluição de  $10^{-6}$  apresentou uma melhor separação e, portanto, melhor visualização. Macroscopicamente observou-se o surgimento de duas colônias aparentemente diferentes, na qual uma apresentou aspecto concentrado, denominada colônia A, enquanto a outra apresentou-se de forma mais espalhada, denominada colônia B, as quais podem ser observadas mais detalhadamente na Figura 4.2.

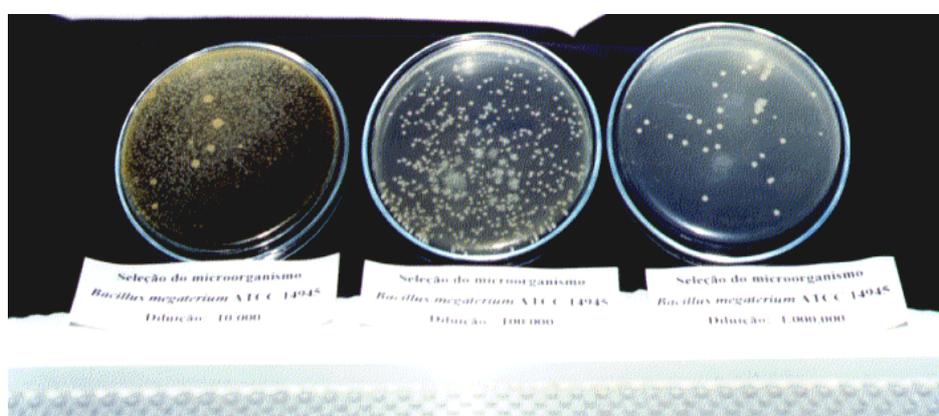
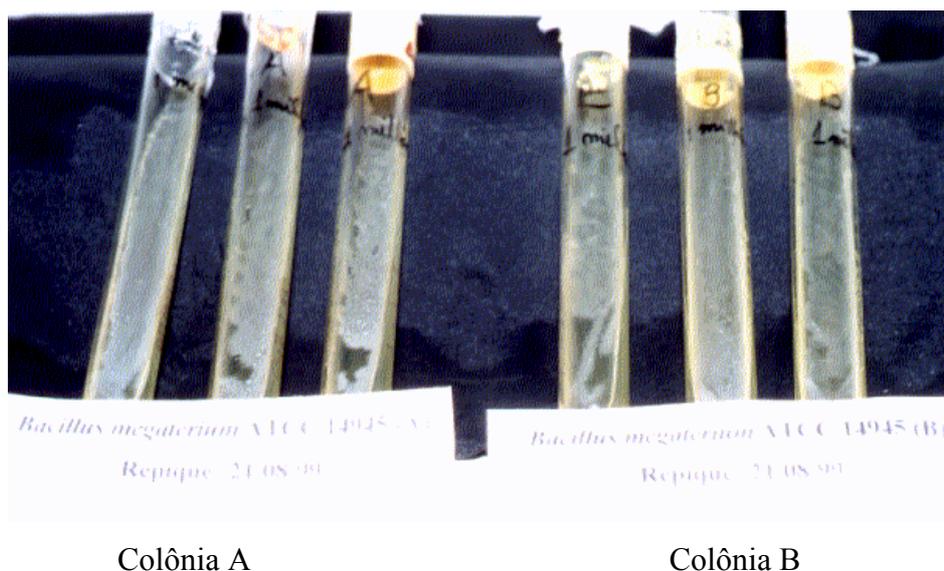


Figura 4.1. Placas após o aparecimento de colônias em ordem crescente para as três diluições ( $10^{-4}$ ;  $10^{-5}$ ;  $10^{-6}$ )



Figura 4.2. Placa com diluição de  $10^{-6}$

A partir da diferença observada separou-se as duas colônias em novos repiques em ágar nutriente (Figura 4.3 ), e as colônias A e B foram cultivadas separadamente em meio líquido de germinação/propagação (ausência do indutor ácido fenil acético). A Figura 4.4. mostra a visualização no microscópio das colônias A e B no meio de cultivo.



Colônia A

Colônia B

Figura 4.3. “Slants” com as colônias A e B.



Colônia A

Colônia B

Figura 4.4. Visualização no microscópio das colônias A e B.

Os valores obtidos para a velocidade máxima de crescimento nesse meio foram de  $0,2 \text{ h}^{-1}$  para a colônia A e  $0,03 \text{ h}^{-1}$  para a colônia B. Esses resultados confirmaram, pois, a existência de duas colônias formadas por células efetivamente diferentes.

A seguir, testaram-se as capacidades de produção de enzima das duas colônias em separado. Os resultados obtidos nos ensaios de produção, apresentados na Tabela 4.2, mostraram que a atividade enzimática das colônias em separado decresceu de aproximadamente 50% em relação ao ensaio 1, onde estavam juntas. O passo seguinte foi realizar um ensaio de produção de PGA utilizando um “slant” onde as colônias A e B foram repicadas juntas, para observar-se se havia influência do isolamento dessas colônias na produção da enzima. No entanto a atividade enzimática encontrada ( $39,42 \text{ UI/L}$ ) foi muito próxima da encontrada utilizando-se as colônias em separado. Esses resultados indicam que deve ter havido degeneração da população de microrganismo devido à realização de repiques sucessivos de uma população estocada por um longo período de tempo. Outra possível explicação seria a produção de proteases extracelulares simultaneamente à de penicilina G acilase. Passou-se, por isso, a se investigar de maneira qualitativa a possível presença de proteases no caldo de fermentação. A metodologia que foi utilizada (item 3.2.5 – primeiro método) é muito sensível à presença de protease no meio, sendo possível observar-se a não gelificação da solução mesmo para baixas concentrações de proteases no meio.

Os resultados obtidos com a aplicação do método mostraram não haver presença de proteases, o que indica ser realmente a atenuação de uma ou das duas colônias a causa provável da baixa produção observada.

Tabela 4.2. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando as colônias A e B (ensaio 2 e 3 respectivamente )

Ensaio	MG	MP	Tempo (h)	pH	A.E. (UI/L)	Cx (g/L)	Atividade específica (UI/g célula)
2 (colônia A)	GC1	PC1	Inóculo		-	1,6	-
			0		-	0,2	-
			24	8,1	38	2,6	15
			48	8,7	43	3,0	14
			72	9,0	46	2,3	20
3 (colônia B)	GC1	PC1	Inóculo		-	1,3	-
			0		-	0,2	-
			24	7,7	39	1,9	21
			48	8,5	54	2,5	22
			72	8,9	54	2,0	27

Cx = concentração celular; A.E = atividade enzimática; MG = Meio de germinação; MP= meio de produção

Foi, então, adquirido novo “slant” da Fundação Tropical, no qual o microrganismo foi submetido a repique e ao processo de seleção conforme descrito acima. Contudo não foi possível observar colônias diferenciadas com esse novo microrganismo. Os resultados obtidos em ensaio de produção com esse microrganismo são apresentados na Tabela 4.3. Como pode ser visto, novamente, baixas atividades enzimáticas foram atingidas.

Tabela 4.3. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando novo “slant” de *B. megaterium* ATCC 14945

Ensaio	MG	MP	Tempo (h)	pH	A.E. (UI/L)	Cx (g/L)	Atividade específica (UI/g célula)
4	GC1	PC1	Inóculo		-	1,3	-
			0		-	0,2	-
			24	8,1	8	1,2	7
			48	8,3	11	1,1	10
			72	8,4	25	0,9	28

Cx = concentração celular; A.E = atividade enzimática; MG = Meio de germinação; MP= meio de produção

Visando verificar a interferência da possível presença de contaminantes no meio de cultura, diversos outros ensaios com esse microrganismo foram realizados, mudando-se a origem dos nutrientes. Nos ensaios 5-6 variou-se a

fonte de lactose, onde foi utilizado soro de queijo líquido e em pó respectivamente. Nos ensaios anteriores sempre se utilizou soro de queijo em pó, portanto o ensaio 6 é uma réplica do ensaio 4, realizado novamente para efeito comparativo. Já nos ensaios 7-8 utilizaram-se lotes diferentes de caseína hidrolisada com Alcalase® e também foi realizada uma ativação do microrganismo em meio líquido, anteriormente ao repique, conforme instruções do banco fornecedor do microrganismo. Conforme os resultados apresentados nas Tabelas 4.4 e 4.5, observa-se que o fato do microrganismo não estar alcançando atividades enzimáticas esperadas não está relacionado com a procedência dos nutrientes. Já a prévia ativação do microrganismo em meio líquido conduziu a um acréscimo da enzima produzida, porém, ainda em quantidades não satisfatórias.

Tabela 4.4. Resultados na produção de PGA utilizando soro de queijo líquido e em pó.

Ensaio	MG	MP	Tempo (h)	pH	A.E. (UI/L)	Cx (g/L)	Atividade específica (UI/g célula)
5 SQL*	GC1	PC1	Inóculo		-	1,0	-
			0		-	0,1	-
			24	8,0	12	2,5	5
			48	8,1	14	2,6	5
			72	8,5	17	2,2	8
6 SQP**	GC1	PC1	Inóculo		-	0,5	-
			0		-	0,1	-
			24	8,0	17	1,0	17
			48	8,1	21	1,1	19
			72	8,5	16	0,8	20

\* SQL = Soro de queijo líquido

\*\* SQP = Soro de queijo em pó

Cx = concentração celular; A.E = atividade enzimática; MG = Meio de germinação; MP= meio de produção

Tabela 4.5. Resultados na produção de PGA utilizando lotes diferentes de caseína e após prévia ativação do microrganismo

Ensaio	MG	MP	Tempo (h)	pH	A.E. (UI/L)	Cx (g/L)	Atividade específica (UI/g célula)
7	GC1	PC1	Inóculo		-	1,0	-
			0		-	0,1	-
			24	7,9	28	1,5	19
			48	8,3	49	2,0	24
			72	8,8	48	1,9	25
8	GC1	PC1	Inóculo		-	1,0	-
			0		-	0,1	-
			24	7,84	28	1,8	16
			48	8,32	58	2,4	24
			72	8,94	46	2,3	20

Cx = concentração celular; A.E = atividade enzimática; MG = Meio de germinação; MP= meio de produção

#### 4.1.1.2. Seleção do microrganismo para padronização do inóculo

Os resultados obtidos no item anterior motivaram a aquisição dos diferentes “slants” encontrados no mesmo banco fornecedor. Os três novos “slants” recebidos são lotes da mesma linhagem liofilizada de *Bacillus megaterium* ATCC 14945, porém conservados de maneiras diferentes. Nos ensaios 9 e 10, o microrganismo utilizado foi preservado por liofilização (liofilizador Edwards modelo L 4KR e L 400GS), e no ensaio 11 por congelamento (-80°C). Os crioprotetores utilizados foram respectivamente: skim milk 10% + inositol 5%; sacarose 7% + peptona 7% e glicerol 10%. Os novos ensaios com os “slants” recebidos (ensaios 9-11), e também com um “slant” que havia sofrido repiques sucessivos em nosso laboratório a partir da linhagem original (ensaio 12), tinham como objetivo verificar se um dos lotes alcançaria novamente a atividade enzimática encontrada inicialmente. Conforme os resultados mostrados na Tabela 4.6, observa-se que todas as culturas testadas apresentaram queda na atividade enzimática, ou seja, o microrganismo desativou-se mesmo quando não submetido a repiques sucessivos.

Tabela 4.6. Resultados obtidos nos ensaios de produção de PGA utilizando diferentes lotes da mesma linhagem de *Bacillus megaterium* ATCC 14945

Ensaio	MG	MP	Tempo (h)	pH	Cx (g/L)	A. E (UI/L)	C.P. (g/L) Lowry	Lactose (g/L)
9 microorg. liofilizado (modelo L 4KR)	GC1	PC1	Inóculo		0,6	-	21,1	4,9
			0		0,1	-	-	15,2
			24	8,0	1,0	20	30,0	12,8
			48	8,2	0,8	12	29,2	12,4
			72	8,4	0,8	15	34,2	11,8
10 microorg. liofilizado (modelo L 400GS)	GC1	PC1	Inóculo		3,7	-	16,7	5,4
			0		0,4	-	-	15,1
			24	8,2	3,1	27	30,0	12,3
			48	8,4	3,5	34	25,6	12,3
			72	8,9	3,2	41	24,4	12,6
11 microorg. congelado (-80° C)	GC1	PC1	Inóculo		3,2	-	15,5	4,9
			0		0,3	-	-	15,2
			24	8,2	3,5	24	29,2	12,1
			48	8,5	4,5	33	25,4	12,6
			72	8,9	4,2	35	23,4	11,8
12 microorg. mantido geladeira (slant)	GC1	PC1	Inóculo		1,3	-	23,4	5,2
			0		0,1	-	-	15,2
			24	8,0	1,7	38	34,0	13,9
			48	8,2	1,9	36	33,1	12,4
			72	8,6	2,0	56	33,8	12,1

Cx = concentração celular; A.E = atividade enzimática; C.P. = Concentração de proteínas; MG = Meio de germinação; MP = meio de produção

Tabela 4.7. Parâmetros calculados a partir de dados obtidos na produção de PGA.

Ensaio	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	Atividade específica (UI/g células)	Y <sub>X/S</sub> lactose
9	0,10	18,8	0,2
10	0,08	12,8	1,1
11	0,10	8,3	1,1
12	0,12	28,0	0,6

Embora todos os lotes recebidos fossem oriundos da mesma linhagem de *B. megaterium* ATCC 14945, estes apresentaram características distintas entre eles. Os ensaios 9 e 10 foram realizados com microrganismos oriundos de um mesmo repique, mas conservados no banco fornecedor usando diferentes equipamentos e crioprotetores. Pode-se observar que embora tenham  $\mu_{\max}$  semelhantes, apresentam Y<sub>X/S</sub> muito distintos (Tabela 4.7). O microrganismo

utilizado no ensaio 9, além de crescer pouco era visivelmente diferente dos demais, no exame ao microscópio. Portanto, observa-se que o crioprotetor e/ou equipamento utilizado não foram eficientes na sua conservação. Os ensaios 1 e 12 utilizaram microrganismos oriundos do mesmo repique que os usados nos ensaios 9 e 10, mas conservados ambos na forma de “slants” em geladeira no DEQ/UFSCar. O microrganismo utilizado no ensaio 12 passou por sucessivos repiques, enquanto que o utilizado no ensaio 1 foi retirado do “slant” original. Isso indica que sucessivos repiques podem implicar queda na produtividade do microrganismo.

Dentre os lotes estudados nesses ensaios, o que apresentou melhor desempenho na produção da enzima foi o utilizado no ensaio 12, embora não tenha alcançado a atividade enzimática esperada. Uma vez que ele foi o que apresentou o melhor desempenho, foi realizada a padronização do inóculo utilizando-se esse microrganismo. Isso foi feito através da preparação dos criotubos conforme mencionado no item 3.2.6, acompanhando-se a viabilidade das células armazenadas (item 3.2.7) durante um período de 8 meses através de plaqueamento. Durante todo o período acompanhado a viabilidade das células se manteve constante.

#### **4.1.1.3. Reativação do microrganismo selecionado para recuperação da capacidade produtora de penicilina G acilase**

Passou-se a seguir à realização de ensaios de produção de PGA com o microrganismo selecionado (criotubos) visando recuperar a capacidade produtiva do microrganismo. Para isso foram testadas a adição de sais no meio de produção conforme composição de Illanes et alli.,1994, e também o ajuste do pH no início do cultivo, que até então somente era ajustado o pH do soro de queijo (pH 7) pois, conforme Berazaín, 1997, quando a solução de soro era neutralizada e autoclavada não acontecia a precipitação dos ácidos graxos presentes no soro e o meio tornava-se mais claro, favorecendo a etapa de inoculação do microrganismo e a manipulação dos diferentes reagentes. Os resultados são apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8. Influência da adição de sais a diferentes pHs na produção de PGA utilizando inóculo padrão (criotubos).

Ensaio	Variável	M.G	M.P	t (h)	pH	Cx	A. E. (UI/L)	A.Esp. (UI/g células)	C.P (g/L)	C.L (g/L)
13	Adição de sais pH <sub>i</sub> =8,3	GC1	PC2	0	8,3	0,2	-	-		
				24	7,9	3,2	66	20,6	41,6	12,4
				48	8,4	5,0	128	25,6	30,2	9,7
				72	8,6	4,5	123	27,3	33,3	11,8
14	Adição de sais pH <sub>i</sub> =7	GC1	PC2	0	7,0	0,2	-	-		
				24	7,4	3,6	54	15,0	38,5	14,5
				48	8,2	5,2	47	9,0	37,3	12,8
				72	8,5	5,5	52	9,5	31,9	11,9
15	pH <sub>i</sub> =8,3	GC1	PC1	0	8,3	0,2	-	-		
				24	7,9	1,7	30	17,6	33,3	8,4
				48	8,3	1,6	38	23,8	40,6	11,7
				72	8,5	1,7	34	20,0	39,4	12,6
16	PH <sub>i</sub> =7	GC1	PC1	0	7,0	0,2	-	-		
				24	7,3	1,4	18	12,9	40,6	11,3
				48	7,7	1,7	23	13,5	37,8	12,6

M.G = Meio de germinação ; M.P = Meio de produção ; A.E. = atividade enzimática ; Cx= concentração celular C.P = Concentração de proteínas (Lowry); C.L = Concentração de lactose

Conforme os resultados obtidos nesses ensaios (Tabela 4.8) observa-se a importância da adição de sais, no qual obteve-se praticamente 3 vezes mais atividade enzimática (ensaio 13) comparando com um meio onde omitiu-se esses componentes (ensaio 15). O pH também foi outra variável importante, atingindo o dobro de atividade enzimática quando o pH inicial do meio de cultivo partiu de aproximadamente 8,3 em oposição a um meio ajustado inicialmente em pH 7 (comparação entre os ensaios 13 e 14). Porém, esses resultados referentes ao ajuste de pH, não podem ser observados nos ensaios 15 e 16. O que pode ter acontecido é que devido ao microrganismo estar deficiente em alguns nutrientes (sais), nem mesmo o ajuste do pH conduziu a uma melhora na produção de PGA.

Esses resultados despertaram o interesse de investigar o efeito da adição de sais em um dos lotes testados anteriormente (utilizado no ensaio 10), mantido no banco fornecedor, para verificar se a deficiência nos sais é que estavam causando uma tão baixa produtividade (ensaio 17). Paralelamente a este ensaio foram realizados outros 2 (ensaio 18 e 19) com o intuito de verificar se havia alguma

diferença na produção de PGA quando se utilizava a solução de sais em cultivos realizados com o microrganismo mantido em criotubos (ensaio 18), preparados em nosso laboratório com 20% de glicerol, ou na forma de “slant” porém sendo repicado mensalmente (ensaio 19).

Tabela 4.9. Influência da adição de sais na produção de PGA com *B. megaterium* oriundo de diferentes formas de conservação

Ensaio	Variável (microrganismos)	MG	MP	t (h)	pH	Cx	A.E (UI/L)	A.Esp. (UI/g células)
17	Congelado -80°C (banco fornecedor)	GC1	PC2	Inóculo		3,4	-	-
				0		0,4	-	-
				24	8,5	5,4	19	3,5
				48	8,4	5,7	9	1,6
				72	8,5	5,8	-	-
18	congelado -70°C (nosso laboratório)	GC1	PC2	Inóculo		1,3	-	-
				0		0,2	-	-
				24	8,0	4,0	75	18,8
				48	8,4	4,4	98	22,3
				72	8,6	5,1	104	20,4
19	“slant”	GC1	PC2	Inóculo		0,9	-	-
				0		0,1	-	-
				24	8,0	4,0	88	22,0
				48	8,4	4,5	121	26,9
				72	8,5	5,1	93	18,2

M.G = Meio de germinação ; M.P = Meio de produção ; A.E. = atividade enzimática ; Cx= concentração celular

Os resultados mostrados na Tabela 4.9 mostram que o lote congelado - 80°C não foi capaz de produzir PGA, nem mesmo na presença dos sais, confirmando a melhor escolha do microrganismo utilizado para inóculo padrão. Do ponto de vista da conservação do microrganismo os resultados dos ensaios 18 e 19 (Tabela 4.9), onde se obteve aproximadamente a mesma atividade enzimática, indicaram que a forma de estocagem do microrganismo em criotubos com glicerol 20% é uma eficiente maneira de preservação. A conservação em “slant”, apesar de ser a forma mais comum, aumenta a possibilidade de mutação a cada subcultura, sendo portanto indesejável para preservação de microrganismos a longo prazo. A baixa atividade encontrada no ensaio 17 utilizando um lote congelado -80°C deve ser possivelmente devido ao tempo de armazenamento do

mesmo (desde 1996) e também vários outros fatores afetam a sobrevivência de microrganismos congelados tais como: idade da cultura, taxa de congelamento e descongelamento, temperatura de armazenamento e o tipo e concentração dos agentes crioprotetores. (Heckly,1978).

Esses estudos forneceram assim os seguintes importantes subsídios para a continuidade do estudo da produção de PGA por *B. megaterium*:

- a adição de sais no meio se mostrou essencial para a obtenção de níveis mais altos de atividade
- o melhor pH inicial é 8,3
- o armazenamento do microrganismo em glicerol 20% no ultrafreezer mostrou ser uma forma eficiente de preservação da cultura.

#### **4.1.2. Estudos do inóculo: volume e tempo de germinação/propagação**

Visando otimizar o tempo total de cultivo e o volume necessário de inóculo a se utilizar foram realizados ensaios com diferentes concentrações iniciais de esporos adicionados no meio de germinação e com diferentes tempos de cultivo nessa etapa inicial. O inóculo produzido sob diferentes condições era então utilizado para a produção de PGA em etapa subsequente. Para melhor entendimento a Figura 4.5 mostra o procedimento utilizado nos ensaios.

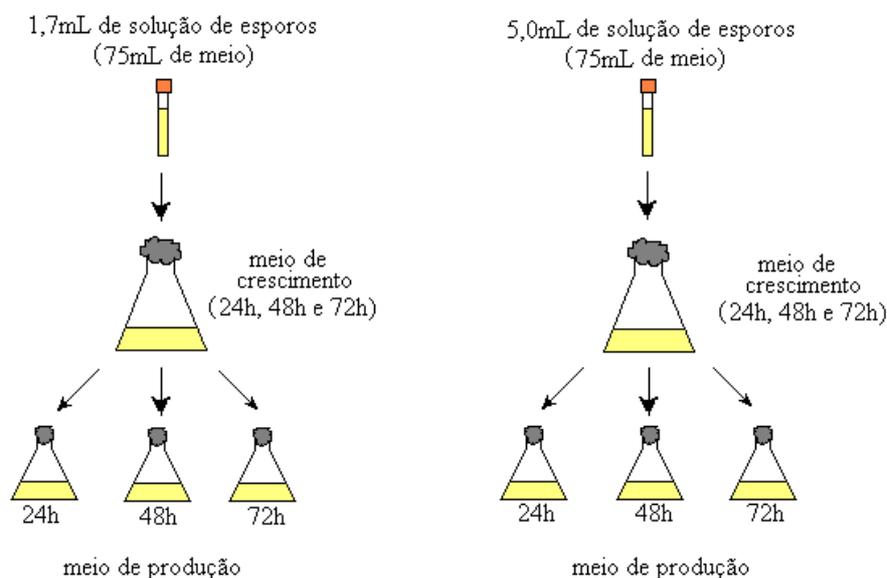


Figura 4.5. Procedimento experimental para estudo da influência do volume inicial de esporos e do tempo de germinação na produção de PGA.

Os resultados obtidos na produção de PGA para 1,7mL e 5,0mL de solução de esporos utilizados no meio de germinação são mostrados respectivamente nas Tabelas 4.10 e 4.11. A Tabela 4.10 mostra os resultados para o primeiro grupo de ensaios onde se fixou o volume inicial da suspensão de esporos em 1,7mL e variaram-se os tempos de germinação e produção da enzima.

Observa-se pela Tabela 4.10 que os melhores resultados foram obtidos para o tempo de germinação de 24 horas e tempo de produção da enzima de 72 horas. De acordo com os resultados apresentados, observa-se que tempos de germinação acima de 24 horas não conduzem a aumento significativo no valor da atividade enzimática na fase de produção. Para os três tempos de germinação e 24 horas de produção, por exemplo, obteve-se aproximadamente 50,0 UI/L de atividade. A concentração celular apresentou o mesmo comportamento com pequenas variações, que parecem não interferir na produção da enzima. Este resultado nos conduziu a uma redução do tempo de cultivo na etapa de germinação permitindo assim a otimização de uma variável importante para o processo de produção de PGA.

Tabela 4.10. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando meio de germinação com concentração inicial de 1,7 mL de solução esporos / 75 mL de meio.

Tempo de Germinação	Tempo de Produção					
	24h		48h		72h	
	A.E. (UI/L)	Cx (g/L)	A.E. (UI/L)	Cx (g/L)	A.E. (UI/L)	Cx (g/L)
24 h	46	4,1	88	5,2	115	5,2
48 h	52	4,4	110	5,2	89	5,3
72 h*	47	3,6	96	5,7	106±10	5.4±0.5

A.E. = atividade enzimática; Cx = concentração celular

\* Triplicata

O segundo grupo de ensaios, mostrados na Tabela 4.11, tiveram por objetivo a confirmação dos resultados obtidos no primeiro grupo, com relação ao tempo, além de verificar se a utilização de uma quantidade maior de solução de esporos, 5,0mL, levaria a melhorias significativas na atividade enzimática final.

Tabela 4.11. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando meio de germinação com concentração inicial de 5 mL de solução de esporos / 75 mL de meio.

Tempo de Germinação	Tempo de Produção					
	24h		48h		72h	
	A.E (UI/L)	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	Cx (g/L)
24 h	64	4,3	88	4,8	89	4,6
48 h	61	4,2	88	4,8	96	5,2
72 h	59	3,6	89	5,3	106	5,6

A.E. = atividade enzimática; Cx = concentração celular

Pode-se observar na Tabela 4.11, que são obtidos valores semelhantes de atividade enzimática em 48 horas de produção, para os três tempos de germinação testados. A duração de 72 horas tanto para a fase de germinação quanto de produção levou a pequeno aumento no valor da atividade final de PGA, mas a ordem de grandeza da variação está dentro das oscilações normalmente observadas. O tempo de 24 horas parece pois ser realmente suficiente na etapa de germinação. Com relação à concentração celular, valores maiores foram obtidos para tempo de germinação de 72 horas, mas esta quantidade maior não conduziu a aumento significativo na produção de PGA. Na etapa de produção, como pode se observar nos dois casos, 72 horas foi o tempo em que se obteve em média maiores atividades enzimáticas.

Comparando-se agora os dados das Tabelas 4.10 e 4.11, com relação à quantidade de esporos utilizada, observa-se que um aumento na quantidade de esporos utilizado no meio de germinação não implica aumento na concentração de células e nem da atividade enzimática no final do ensaio. Portanto, para simplificar procedimentos experimentais, o volume de solução de esporos foi fixada em 3 mL que é o volume contido nos criotubos.

As Tabelas 4.12 e 4.13 mostram a produtividade e rendimento do produto com respeito a biomassa (produtividade específica) respectivamente para 1,7mL e 5,0mL de esporos. Pode-se observar pela Tabela 4.12 que o tempo total de 96 horas (24 horas de germinação e 72 horas de produção) foi o que apresentou os melhores resultados de atividade enzimática, produtividade e produtividade específica. A Tabela 4.13 apresenta os resultados para o segundo grupo e observa-se que o tempo total de 96 horas (24 horas de germinação e 72 horas de produção) mesmo não apresentando melhor atividade enzimática e produtividade, apresenta o melhor valor de atividade específica. As diferenças entre os valores de atividade máxima atingida, além disso, continuam dentro da oscilação de 10%. De todo modo, embora aparentemente 24 horas de germinação e 48 horas de produção conduzam à maior produtividade, decidiu-se, a favor da segurança, continuar acompanhando a fase de produção por 72 horas, na continuidade dos estudos da produção de PGA.

Tabela 4.12. Produtividade e produtividade específica utilizando meio de germinação com concentração inicial de 1,7 mL de solução de esporos / 75 mL de meio.

Tempo total do ensaio ( $t_{\text{germinação}} + t_{\text{produção}}$ )	Atividade enzimática (UI/L)	Produtividade (UI/L/h)	Atividade específica (UI/g <sub>célula</sub> )
(24+24)=48	46	1,0	11
(24+48)=72	88	1,2	17
(24+72)=96	115	1,2	22
(48+24)=72	52	0,7	12
(48+48)=96	110	1,1	21
(48+72)=120	89	0,7	17
(72+24)=96	47	0,5	13
(72+48)=120	96	0,8	17
(72+72)=144	106	0,7	20

Tabela 4.13. Produtividade e produtividade específica utilizando meio de germinação com concentração inicial de 5,0 mL de solução de esporos / 75 mL de meio.

Tempo total do ensaio ( $t_{\text{germinação}} + t_{\text{produção}}$ )	Atividade enzimática (UI/L)	Produtividade (UI/L/h)	Atividade específica (UI/g <sub>célula</sub> )
(24+24)=48	64	1,3	15
(24+48)=72	88	1,2	18
(24+72)=96	89	0,9	20
(48+24)=72	61	0,9	15
(48+48)=96	88	0,9	18
(48+72)=120	96	0,8	18
(72+24)=96	59	0,6	17
(72+48)=120	89	0,8	17
(72+72)=144	106	0,7	19

Um outro lote de suspensão de esporos teve que ser preparado devido ao grande número de outras variáveis que estavam sendo pesquisadas na produção de PGA (mostradas a seguir). Esse segundo lote apresentou menor capacidade de produção de PGA, necessitando presença de sais na etapa de germinação (meio GC2) e maiores concentrações na etapa de produção (meio PC5) para recuperação da capacidade de produção nos níveis semelhantes aos anteriores. Esse fato suscitou dúvidas quanto às conclusões obtidas com o primeiro lote de esporos. A possibilidade de que o menor tempo de germinação (24h) já conduzisse à máxima concentração de enzima na fase de produção devido a ausência de algum(s) dos sais adicionados era assim um hipótese a ser verificada. Decidiu-se por isso repetir os experimentos anteriores na presença desses sais. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.14 e permitem concluir que 24 horas de germinação é realmente o suficiente, mesmo acrescentando-se maiores concentrações de sais no

meio. Os menores valores de atividade enzimática final atingidos em relação aos primeiros ensaios (Tabela 4.10 e 4.11) podem ser explicados assim pelo uso de um segundo lote de esporos. Uma oscilação em torno de 10% na atividade enzimática final já é esperada mesmo quando se utiliza um mesmo lote de esporos. É razoável, pois, observar oscilações até um pouco maiores quando um novo lote de esporos foi utilizado. Acredita-se, contudo, que essa oscilação não compromete as conclusões anteriormente obtidas, confirmando-se, pois, que 24 horas de germinação e 72 horas de produção são os melhores tempos para produção de PGA.

Tabela 4.14. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando meio de germinação com concentração inicial de 3,0 mL de solução esporos / 75 mL de meio. 2ª batelada de esporos

Tempo de Germinação	Tempo de produção					
	24h		48h		72h	
	A.E (UI/L)	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	Cx (g/L)
24 h	71	6,0	71	6,4	90	6,2
48 h	51	5,5	81	7,2	92	6,2

A.E. = atividade enzimática; Cx = concentração celular

Após a otimização dessas variáveis passou-se, então, a estudar os requerimentos nutricionais de *B. megaterium* para a produção de PGA.

### **4.1.3. Estudo dos requerimentos nutricionais do *Bacillus megaterium***

#### **4.1.3.1. Meio de germinação com aminoácidos livres**

O objetivo deste estudo é investigar os requerimentos nutricionais do microrganismo para produção da enzima penicilina G acilase, visando a formulação de um meio o mais simples e barato possível, bem como auxiliar na elucidação do metabolismo do microrganismo. Foram realizados ensaios com diferentes formulações sintéticas e adição de nutrientes complexos na fase de produção da enzima penicilina G acilase. Essa produção, como ocorre em qualquer cultivo, é precedida pela fase de preparação do inóculo, onde ocorre germinação dos esporos e crescimento da massa do microrganismo. Assim, para evitar elementos desconhecidos do meio de germinação quando este é inoculado ao meio de produção, bem como diminuir a fase de adaptação do microrganismo nesta etapa, o ideal é encontrar um meio de germinação sintético que suporte um bom crescimento celular e que favoreça a fase de produção. Dessa forma, o objetivo dos experimentos, cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.15, é investigar a influência de diferentes nutrientes na fase de germinação do microrganismo (produção do inóculo). A meta, contudo, é sempre aumentar a produção da enzima, que sempre ocorre na segunda fase, na presença do indutor ácido fenil acético. Assim, procurou-se correlacionar a produção de PGA com a composição do meio utilizado na fase de germinação. Não foi medida, nestes experimentos, a massa celular no final da fase de germinação, pois a presença de diferentes nutrientes nos meios testados requereria exaustivos procedimentos de determinações em branco. Optou-se então pela medida da concentração celular no início da segunda fase, feita com meio padrão, após adição de cada inóculo (10% do volume).

Os valores de produção de PGA por *B. megaterium* comumente encontrados na literatura (Illanes et alli., 1994; Gentina et alli., 1997; Hojo, 1997) estão na ordem de 250 UI/L. Este estudo dos requerimentos nutricionais objetiva atingir níveis semelhantes e se possível superiores a esses valores.

Tabela 4.15. Resultados obtidos na produção de PGA variando-se o meio de germinação. 1ª batelada de esporos.

Ensaio	Variável	M.G	M.P	T (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	A.Esp. (UI/g células)
20	PADRÃO	GC1 Caseína Soro	PC2 Caseína Soro Sais AFA	Inóc		0,8	-	-
				0		0,1	-	-
				24	8,2	4,5	76	16,9
				48	8,6	5,5	133	24,2
				72	9,1	4,9	122	24,9
21	FONTE DE CARBONO	GA1 a.a Soro	PC2	0		0,1	-	-
				24	8,2	4,7	81	17,2
				48	8,6	5,2	126	24,2
				72	9,1	5,2	134	25,8
22		GA2 a.a Lactose	PC2	0		0,1	-	-
				24	8,1	4,1	89	21,7
				48	8,5	5,3	130	24,5
				72	8,9	4,3	121	28,1
23		GA3 a.a Glicose	PC2	0		0,1	-	-
				24	8,0	4,1	87	21,2
				48	8,5	5,4	128	23,7
				72	9,0	4,5	143	31,8
24	VITAMINAS & SAIS	GA4 a.a Lactose Samprosoy Sais	PC2	0		0,1	-	-
				24	8,2	4,4	93	21,1
				48	8,5	5,1	75	14,7
				72	9,2	5,1	136	26,7
25		GA5 a.a Lactose Levedura Sais	PC2	0		0,1	-	-
				24	8,2	4,4	76	17,3
				48	8,8	5,6	132	23,6
				72	9,2	5,5	126	22,9
26		GA6 a.a Lactose Levedura	PC2	0		0,1	-	-
				24	8,2	4,7	84	17,9
				48	8,7	5,3	131	24,7
				72	9,2	4,8	135	28,1

M.G = Meio de germinação ; M.P = Meio de produção ; A.E. = atividade enzimática ; Cx= concentração celular

O uso do meio padrão complexo na fase de produção, aqui denominado PC2, foi feito para se garantir a presença no meio de algum elemento essencial para a produção da enzima, uma vez que as exatas necessidades nutricionais do microrganismo para produção de PGA não estão ainda esclarecidas. A caseína

hidrolisada por alcalase<sup>®</sup> foi substituída por aminoácidos livres preservando a mesma composição da caseína, nos ensaios de 21-26. Nos ensaios 21-23 objetivou-se verificar a influência da fonte de carbono no meio de germinação. Para os demais ensaios (24-26) o meio GA2 foi suplementado com pequenas concentrações de outros componentes (samprosoy e sais; levedura e sais; levedura) com o intuito de fornecer vitaminas e sais sem alterar demais a concentração de aminoácidos fornecidos.

A observação dos resultados apresentados na Tabela 4.15 mostra que a composição do meio de germinação não parece ter afetado significativamente a produção de PGA, obtendo-se valores semelhantes para concentração final da enzima. Observe-se ainda que a massa celular após 24 horas é praticamente igual também. Baseando-se nesses resultados, foi selecionado para os próximos ensaios o meio de germinação contendo aminoácidos e lactose (ensaio 22), pois ele reproduz os componentes utilizados no meio complexo (lactose presente no soro de queijo e aminoácidos da caseína).

#### **4.1.3.2. Meio de produção com aminoácidos livres**

A partir do meio de germinação sintético padronizado (aa + lactose) foram realizados diversos ensaios de produção de PGA em diferentes meios sintéticos. A Tabela 4.16 mostra as condições de ensaio. Os ensaios 27-30 tinham como objetivo investigar o efeito de diferentes fontes de carbono, bem como a presença de efeito repressivo destas (glicose e lactose) na produção de PGA. Os ensaios 31-33 visaram verificar o efeito do ácido fenil acético no crescimento celular e na produção de PGA. No ensaio 31, o indutor foi adicionado no início da fase de produção, no ensaio 32 após 8 horas da inoculação do microrganismo e no ensaio 33 não houve adição do ácido. Conforme mencionado anteriormente o ácido fenil acético apresenta-se como indutor na produção de PGA, porém a altas concentrações e quando adicionado no início do crescimento inibe a sua produção. Esses ensaios visavam por isso melhor esclarecer esse ponto. Nos ensaios realizados até o momento o ácido fenil acético era sempre adicionado 8h após a inoculação do microrganismo.

Os resultados obtidos nesses ensaios mostraram que o crescimento do microrganismo não é significativo e conseqüentemente a produção de PGA também. Após a obtenção desses resultados decidiu-se repetir alguns experimentos e acompanhar o crescimento do microrganismo ao microscópio, ao longo das fases de germinação e produção. Verificou-se assim que os esporos de *B. megaterium* adicionados em meio sintético não germinavam, o que explica o comportamento observado nos ensaios 20-26, onde aparentemente a composição do meio de germinação não afetava a produção de PGA. Na verdade, o que ocorria era que a germinação só ocorria após transferência dos esporos para o meio complexo padrão utilizado na fase de produção, igual para todos os ensaios.

Tabela 4.16 – Atividade enzimática (UI/L) e concentração celular (g/L) na produção de PGA por *B. megaterium* utilizando meio sintético na etapa de germinação e de produção. 1ª batelada de esporos.

Ensaio	Variável	M.G	M.P	A.E* (72h, UI/L)	C <sub>x</sub> (72h, g/l)
27	DIFERENTES FONTES DE CARBONO	GA2 aa / lactose	PA1 aa/sais/AFA/vitaminas/ glicose (14,7g/L)	23	<0,1
28		GA2	PA2 aa/sais/AFA/vitaminas/ glicose (0,7g/L)	22	<0,1
29		GA2	PA3 aa/sais/AFA/vitaminas/ lactose (14,7g/L)	22	<0,1
30		GA2	PA4 aa/sais/AFA/vitaminas/ lactose (0,7g/L)	29	<0,1
31	ADIÇÃO DE ÁCIDO FENIL ACÉTICO (AFA)	GA2	PA5 aa/sais/lactose(14,7g/L) AFA t = 0h	20	<0,1
32		GA2	PA5 aa/sais/lactose(14,7g/L) AFA t = 8h	25	<0,1
33		GA2	PA6 aa/sais/lactose (14,7g/L) Sem AFA	13	<0,1

\* Precisão experimental é baixa para atividades de PGA abaixo de 30UI/L

Esses resultados indicaram que o microrganismo necessita de algum nutriente contido no meio complexo. Passou-se assim a estudar a influência de diferentes nutrientes presentes nesse meio, tanto na etapa de germinação (inóculo) quanto de produção da enzima.

#### 4.1.3.3. Meio de germinação com caseína hidrolisada

Inicialmente foi realizado um detalhado estudo para elucidar qual dos nutrientes presentes no meio complexo era essencial para a germinação e crescimento do microrganismo na fase de produção do inóculo. Os meios continham diferentes combinações de soro, caseína hidrolisada, sais, lactose PA e glicose PA. Foram analisadas no início e no final da fase de germinação (24 horas) concentrações celulares, de proteína e de açúcar, bem como observação microscópica dos esporos no início e após 24 horas de germinação. Os resultados obtidos estão mostrados na Tabela 4.17

Tabela 4.17 – Consumo de nutrientes e concentração celular (g/L) após 24 horas de cultivo de *B. megaterium* em meios complexos na etapa de germinação. 2ª batelada de esporos

Meio de germinação	Tempo (h)	Cx (g/L)	Lactose (g/L) (HPLC)	Glicose (g/L) (HPLC)
GC1 Soro/caseína	0	0,1	6,03	
	24	1,1	5,97	
GC2 Soro/caseína/sais	0	0,1	4,95	
	24	6,3	4,32	
GC3 Soro/caseína/sais/glicose	0	0,1	5,99	4,4
	24	7,2	4,94	-
GC4 Caseína/sais/lactose	0	0,1	5,04	
	24	1,5	5,06	
GC5 Soro/sais	0	0,1	ND	
	24	0,4	ND	
GC6 Soro/sais/glicose	0	0,1	ND	
	24	0,6	ND	
GC7 Caseína	0	0,1	ND	
	24	0,3	ND	

ND = não determinado

A observação microscópica mostrou que ocorre germinação em todas as condições testadas, embora o número de células vegetativas seja menor para os meios GC5, 6 e 7. Comparando-se os resultados obtidos nos ensaios utilizando os meios GC1 e GC2, vê-se que a presença de sais conduz a expressivo aumento de massa celular. Em GC3, vê-se que ocorre aumento ainda maior da massa celular quando se adiciona glicose, com consumo total desse nutriente. A substituição de soro por lactose PA (GC4) conduziu a muito menor concentração celular. Ocorre algum crescimento celular, ainda que pequeno, na presença de soro e sais (GC5). A adição de glicose (GC6) não conduziu a concentrações celulares significativamente maiores. Ocorre também pequeno crescimento celular na presença exclusivamente de hidrolisado de caseína (GC7).

Os resultados obtidos mostram que soro de queijo contém algum fator importante para o crescimento celular, pois sua substituição por lactose, na presença de caseína e sais, conduziu a drástica redução na massa celular. O grande aumento de massa celular observado recomenda assim manutenção desse nutriente no meio para a etapa de germinação.

Os resultados obtidos com relação à fonte de nitrogênio ainda não foram totalmente esclarecedores, pois se observou ocorrer germinação e crescimento em todos os meios complexos. Os experimentos efetuados até o momento, contudo, não permitiram elucidar se a presença de pequenos peptídeos é necessária à germinação ou se algum dos aminoácidos livres presentes na mistura usada nos meios sintéticos reprime o processo de transformação do esporo na forma vegetativa. O esclarecimento requer estudos posteriores variando-se a composição da mistura de aminoácidos. Até ser esclarecido o papel dos aminoácidos, os resultados obtidos mostram que deve ser fornecida fonte de nitrogênio na forma de pequenos peptídeos para a germinação.

Os sais exercem função importante no crescimento celular, mostrando que sua ausência limita o crescimento do microrganismo, devendo assim estar presentes em concentrações apropriadas.

O maior crescimento na presença de glicose, com esgotamento desse nutriente nas 24 horas de ensaio, mostra que o microrganismo a utiliza como fonte preferencial de carbono, o que já era esperado. Lactose foi pouco consumida.

#### **4.1.3.4. Meio de produção com caseína hidrolisada**

A seguir passou-se a estudar o papel dos componentes presentes no meio complexo padrão (caseína e soro e/ou glicose e/ou lactose) na etapa de produção da enzima. Deve-se ressaltar, contudo que um novo lote de esporos teve que ser preparado para utilização nestes ensaios, o qual apresentou uma menor produtividade em enzima. Uma vez que foi detectada a grande importância da presença dos sais para aumento da massa celular este nutriente passou a ser adicionado em todos os meios de germinação e de produção, sendo que para esta última etapa, foi variada a concentração desse nutriente. Nos ensaios 34-39, os mesmos componentes presentes no meio de germinação são também utilizados no meio de produção. Nos ensaios 40-43 foi fixada a composição do meio de germinação para possibilitar o estudo da influência da concentração de sais (40-41) e do ácido fenil acético (42-43) no meio de produção. A Tabela 4.18 mostra os resultados obtidos.

Tabela 4.18 – Resultados obtidos na produção de PGA utilizando diferentes meios complexos. 2ª batelada de esporos

Ensaio	M.G	M.P	T (h)	pH	Cx (g/L)	A.E. (UI/L)	A.Esp. (UI/ g células)	C.L (g/L)	C.G (g/L)
34	GC2 Caseína Soro Sais	PC2 Caseína Soro Sais/AFA	0	8,5	0,6	-	-	11,0	
			24	8,2	4,9	56	11,4	9,5	
			48	8,8	5,2	58	11,2	9,9	
			72	9,4	4,9	65	13,3	8,8	
35	GC3 Caseína Soro/glic. Sais	PC3 Caseína Soro/glic. Sais/AFA	0	7,8	0,7	-	-	9,4	7,5
			24	7,8	5,7	33	5,8	9,6	-
			48	8,2	7,1	55	7,7	9,1	-
			72	8,7	6,9	61	8,8	9,4	-
36	GC4 Caseína Lactose Sais	PC4 Caseína Lactose Sais/AFA	0	8,6	0,2	-	-	11,3	
			24	8,2	1,9	24	12,6	10,0	
			48	8,6	3,3	45	13,6	10,6	
			72	9,2	3,5	55	15,7	10,5	
37	GC5 Soro Sais	PC7 Soro Sais AFA	0	7,9	0,1	-	-		
			24	8,1	0,7	-	-		
			48	8,2	0,9	-	-		
			72	8,2	1,2	-	-		
38	GC6 Soro/glic. Sais	PC8 Soro/glic. Sais AFA	0	7,4	0,1	-	-		
			24	8,1	0,9	-	-		
			48	8,1	1,2	-	-		
			72	8,1	1,3	-	-		
39	GC7 Caseína	PC9 Caseína Sais AFA	0	8,6	<0,1	-	-		
			24	8,0	0,3	13	43,3		
			48	8,1	1,8	29	16,1		
			72	8,7	3,2	55	17,2		
40	GC2	PC5 PC2 + 0,2g sais	0	8,5	0,6	-	-	12,2	
			24	8,3	4,9	71	14,5	11,2	
			48	8,5	5,1	80	15,7	11,4	
			72	9,3	5,5	80	14,5	11,1	
41	GC2	PC6 PC2 + 0,6g sais	0	8,6	0,5	-	-		
			24	8,3	3,0	76	25,3		
			48	8,6	4,3	82	19,1		
			72	9,5	4,4	86	19,5		
42	GC2	PC2	0	8,0	0,6	-	-	10,2	
			24	8,2	4,6	45	9,8	9,1	
		AFA T = 0h	48	8,8	5,3	50	9,4	9,5	
			72	9,4	5,1	67	13,1	8,8	
43	GC2	PC5	0	8,6	0,5	-	-		
			24	8,7	3,8	41	10,8		
		Sem AFA	48	8,9	4,3	51	11,9		
			72	9,5	4,2	43	10,2		

M.G = Meio de germinação ; M.P = Meio de produção ; A.E. = atividade enzimática ;

Cx= concentração celular; C.L = concentração lactose ; C.G = concentração glicose

Comparando-se os resultados obtidos nos ensaios 34 com o 35, observa-se que a adição de glicose ao meio conduz a aumento da massa celular, com consumo total da glicose já nas primeiras 24 horas. O uso preferencial de glicose para crescimento já havia sido observado na etapa de produção de inóculo, mas vê-se agora que esse aumento de massa celular não está associado a aumento na produção da enzima. Uma possível explicação seria o efeito repressor da glicose, ou seja, enquanto há glicose o microrganismo a consome de modo preferencial, com a síntese da enzima reprimida (ver tempo 24 horas). Esgotado esse nutriente o microrganismo começa a utilizar hidrolisado de caseína como fonte de carbono e de nitrogênio, com ajuste do metabolismo para produzir a enzima.

A substituição de soro por lactose na etapa de produção (ensaio 36) conduz também à redução da massa celular, com pequeno consumo de lactose. Além disso, fica claro o aumento na velocidade de crescimento do microrganismo e da velocidade de produção da enzima na ausência e na presença de soro (comparar o tempo 24 horas para os ensaios 34 e 36). O soro de queijo possui quantidades importantes de vitaminas e sais minerais. Esses componentes são usualmente requeridos em pequenas quantidades por alguns microrganismos como cofatores de certas enzimas necessárias nas rotas metabólicas [[www.bact.wisc.edu/bac303](http://www.bact.wisc.edu/bac303), 1997]. É possível, portanto, que o soro esteja fornecendo esses nutrientes.

A importância da presença de hidrolisado de caseína fica clara observando-se os resultados obtidos nos ensaios 37-39. PGA é produzida apenas quando esse nutriente está presente. Observa-se ainda que atuando como única fonte de carbono e nitrogênio (ensaio 39) para o *Bacillus megaterium* enzima é produzida em níveis similares aos observados quando se utilizou outras fontes de carbono conjuntamente. A metabolização de pequenos peptídeos (principalmente di e tripeptídeos) parece assim ser importante para germinação e crescimento do microrganismo e essencial para a produção de penicilina G acilase por *B. megaterium*.

Quanto à presença de sais, o ensaio 40, onde se dobra a quantidade de sais presentes, vem confirmar o requerimento de sais minerais pelo *Bacillus megaterium* para produção de PGA, pois a adição de uma solução 2 vezes mais concentrada melhorou os resultados obtidos. Essa concentração parece estar

próxima da necessária, pois a utilização de quantidades ainda maiores de sais (ensaio 41) não afetou significativamente a produção.

Com relação ao tempo de adição do ácido fenil acético, observou-se que a adição do indutor no início da fermentação (ensaio 42) ou 8 horas após a inoculação do microrganismo (ensaio 34) não afeta o crescimento do microrganismo nem a produção de PGA. No entanto, na sua ausência (ensaio 43) a atividade enzimática foi reduzida praticamente à metade (comparação com o ensaio 40, onde também se utilizou solução de sais 2 vezes mais concentrada). Ácido fenil acético mostra-se assim importante como indutor da enzima.

Os resultados obtidos nos experimentos mostram que hidrolisado de caseína é importante na germinação e crescimento do microrganismo e essencial para a produção de penicilina G acilase por *B. megaterium*, podendo atuar tanto como fonte de carbono como fonte de nitrogênio. Glicose é fonte preferencial de carbono para o microrganismo, mas não ocorre produção da enzima quando glicose está sendo consumida. Soro de queijo possui algum(s) nutriente(s) importante para crescimento celular e produção de enzima, sendo que na presença de hidrolisado de caseína, ocorre consumo conjunto do hidrolisado e de lactose como fonte de carbono. Adição de sais conduz a expressivo aumento da massa celular.

Após a obtenção desses resultados, realizaram-se 2 ensaios em shaker utilizando os melhores meios encontrados nesse estudo (GC2 e PC5). Esses ensaios tinham como objetivo testar uma nova batelada de criotubos e também o microrganismo que vinha sofrendo repiques mensais e que foi utilizado para a realização desses criotubos. Essa terceira batelada foi realizada para tentar recuperar a produtividade obtida na primeira, uma vez que a segunda batelada mostrou menor capacidade produtiva de enzima. Realmente atingiu-se o objetivo com a terceira batelada, mostrando capacidade produtiva similar à primeira.

A partir dessa 3ª batelada de criotubos e da seleção dos meios que conduziram aos melhores níveis de produção de PGA (GC2 e PC5) passou-se a estudar a influência de diferentes fontes de nitrogênio para elucidar o papel dessa fonte na produção de PGA e também o uso de uma nova fonte de carbono.

#### 4.1.3.4.1. Uso de glicerol como fonte de carbono

Testou-se a seguir o uso de uma nova fonte de carbono, o glicerol. O glicerol foi adicionado ao meio como única fonte de carbono (ensaio 46) e conjuntamente com soro (ensaio 45). O ensaio com meio padrão (ensaio 44) é sempre repetido com o intuito de verificar se o microrganismo não sofreu nenhuma modificação. A composição do meio de crescimento é a mesma dos ensaios anteriores (GC2).

Tabela 4.19. Influência da presença de glicerol no cultivo de *B megaterium* para produção de PGA.

Ensaio	MP	t (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	A.Esp. (UI/ g células)	C. P. <sub>1</sub> (g/L)	C. P. <sub>2</sub> (g/L)	C.L (g/L)	C.G (g/L)
44	PC5 Caseína Soro Sais 2x AFA CaCO <sub>3</sub>	0	7,7	0,7	-	-	42,2	0,9	11,7	
		12	8,1	3,4	59	17,4	39,7	0,9	11,6	
		24	8,4	5,1	95	18,6	38,6	0,9	11,3	
		48	8,7	5,5	101	18,4	36,6	0,9	11,3	
45	PC10 Caseína Soro Glicerol Sais 2x AFA CaCO <sub>3</sub>	0	7,7	0,6	-	-	44,8	0,8	11,5	14,0
		12	7,7	3,5	52	14,9	42,9	0,8	11,3	12,7
		24	7,5	5,9	46	7,8	42,9	0,8	11,3	7,8
		48	8,0	6,7	100	14,9	40,8	0,9	11,4	0
		72	8,7	7,7	109	14,2	37,4	0,9	11,4	0
46	PC11 Caseína Glicerol sais 2x AFA CaCO <sub>3</sub>	0	7,8	0,5	-	-	41,3	0,3	-	13,0
		12	7,8	1,3	28	21,5	41,4	0,3	-	11,6
		24	7,7	2,0	28	14,0	38,8	0,3	-	10,5
		48	7,7	2,7	30	11,1	38,7	0,3	-	5,3
		72	8,5	2,9	48	16,6	39,6	0,4	-	0

Cx = Concentração celular ; A.E. = atividade enzimática ; C.P<sub>1</sub> = concentração de proteínas Lowry; C.P<sub>2</sub> = concentração de proteínas Bradford, C.L = concentração de lactose; C. G = concentração de glicerol

Comparando-se os resultados obtidos no ensaio 44 com os do ensaio 45, onde foi acrescentado glicerol, observa-se aumento da concentração celular quando este foi adicionado, o qual não está, contudo, associado a aumento da atividade enzimática. Pode-se, até mesmo, observar uma repressão na síntese de PGA no tempo de 24 horas, atingindo valores semelhantes aos anteriores em 48 horas.

Quando se utilizou apenas glicerol como fonte de carbono (ensaio 46), tanto a concentração celular como a atividade enzimática diminuiu. Um fato interessante a ser notado é em relação à velocidade de consumo do glicerol. Quando o meio é constituído apenas por glicerol, o microrganismo consome este nutriente numa menor velocidade do que quando está presente também o soro de queijo, indicando novamente a presença de algum importante nutriente no soro de queijo. Por outro lado, o efeito repressor causado pela fonte de carbono de fácil assimilação já tinha sido observado nos resultados anteriores quando se utilizou glicose.

#### **4.1.3.4.2. Influência de diferentes fontes de nitrogênio**

Os resultados obtidos até então nos mostram que o microrganismo necessita de pequenos peptídeos para produção de PGA e que o uso de aminoácidos livres na concentração estudada (51,4 g/L-estudo de meio com aminoácidos livres), não permitiu nem mesmo a germinação do microrganismo. Dessa forma, diferentes nutrientes e concentrações da fonte de nitrogênio foram testadas para revelar as verdadeiras exigências do microrganismo. Há que se salientar aqui que o meio de produção, a partir desses novos ensaios, não contém mais carbonato de cálcio na sua composição. Foram realizados ensaios para verificar se a retirada desse componente iria interferir no metabolismo do microrganismo. O novo meio de produção sem  $\text{CaCO}_3$  foi denominado de PC12. Os resultados obtidos nesses ensaios foram 108 UI/L para cultivos com o meio PC5 e 94 UI/L para cultivos com o meio PC12. Essas pequenas oscilações foram consideradas insignificantes e, portanto, não se adicionou esse componente nos meios utilizados nos ensaios a seguir.

#### 4.1.3.4.2.1. Uso de diferentes proteases na hidrólise de caseína

Uma estratégia utilizada foi realizar a hidrólise de caseína com diferentes proteases a fim de obtermos diferentes peptídeos, desde que cada enzima proteolítica tem uma especificidade diferente para os resíduos de aminoácidos. Os produtos resultantes dessas hidrólises foram analisados em HPLC para verificar se havia formação de diferentes peptídeos e também para saber em que faixa de peso molecular eles se encontravam. As diferentes enzimas e os tempos de hidrólise testados foram os seguintes:

CI ⇒ Caseína hidrolisada com alcalase 2,5L (4 horas)

CII ⇒ Caseína hidrolisada com alcalase 2,4L (4horas)

CIII ⇒ Caseína hidrolisada com alcalase 2,4L (2h) + alcalase 2,4 L (2h)

CIV ⇒ Caseína hidrolisada com alcalase 2,4L (2h) + tripsina (2h)

CV ⇒ Caseína hidrolisada com alcalase 2,4L (2h) + tripsina (1h) + quimotripsina (1h)

As relações mássicas substrato/enzimas e as condições usadas nas hidrólises são apresentadas na parte de Materiais e Métodos. Os ensaios de cultivo do microrganismo, utilizando essas diferentes caseínas hidrolisadas, são mostrados na Tabela 4.20. Até o presente momento, a caseína usada sempre era hidrolisada com alcalase 2,4L (ensaio 48).

Tabela 4.20. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando caseína hidrolisada com diferentes proteases, em diferentes condições de reação.

Ensaio	MG	MP	t (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	A.Esp. (UI/ g células)	C.P (g/L)	C.L (g/L)
47	GC2 Caseína CI Soro Sais	PC12 Caseína CI Soro sais 2x AFA	0	7,9	0,5	-	-	49,9	11,0
			10	7,9	2,4	40	16,7	49,9	11,2
			24	8,4	4,5	71	15,8	45,3	10,7
			48	8,5	4,6	75	16,3	42,9	10,5
48	GC2 Caseína CI Soro Sais	PC12 Caseína CII Soro sais 2x AFA	0	7,9	0,5	-	-	48,7	
			10	7,9	2,8	48	17,1	46,9	
			24	8,4	4,6	80	17,4	43,7	
			48	8,5	4,7	89	18,9	38,3	
49	GC2 Caseín a CI Soro Sais	PC12 Caseína CIII Soro sais 2x AFA	0	7,8	0,4	-	-	51,4	
			10	8,0	3,2	52	16,3	49,7	
			24	8,4	4,6	87	18,9	46,5	
			48	8,5	5,2	91	17,5	41,9	
50	GC2 Caseín a CI Soro Sais	PC12 Caseína IV Soro sais 2x AFA	0	7,9	0,6	-	-	53,9	11,6
			10	8,0	2,9	46	15,9	50,2	11,3
			24	8,3	4,3	79	18,4	47,3	10,5
			48	8,4	4,4	74	16,8	44,2	10,8
51	GC2 Caseín a CI Soro Sais	PC12 Caseína V Soro sais 2x AFA	0	8,0	0,4	-	-	52,6	11,1
			10	7,9	2,8	48	17,1	51,7	10,6
			24	8,3	4,6	86	18,7	49,1	10,5
			48	8,6	4,8	85	17,7	44,7	10,6

Cx = Concentração celular ; A.E. = atividade enzimática C.P = concentração de proteínas Lowry; C.L = concentração de lactose

Conforme podemos observar, para todas as caseínas testadas a atividade enzimática e o crescimento celular foram muito semelhantes, indicando que os produtos resultantes dessas hidrólises provavelmente são semelhantes. O cromatograma mostrado a seguir (Figura 4.6) vem a confirmar essa hipótese com relação aos peptídeos formados.

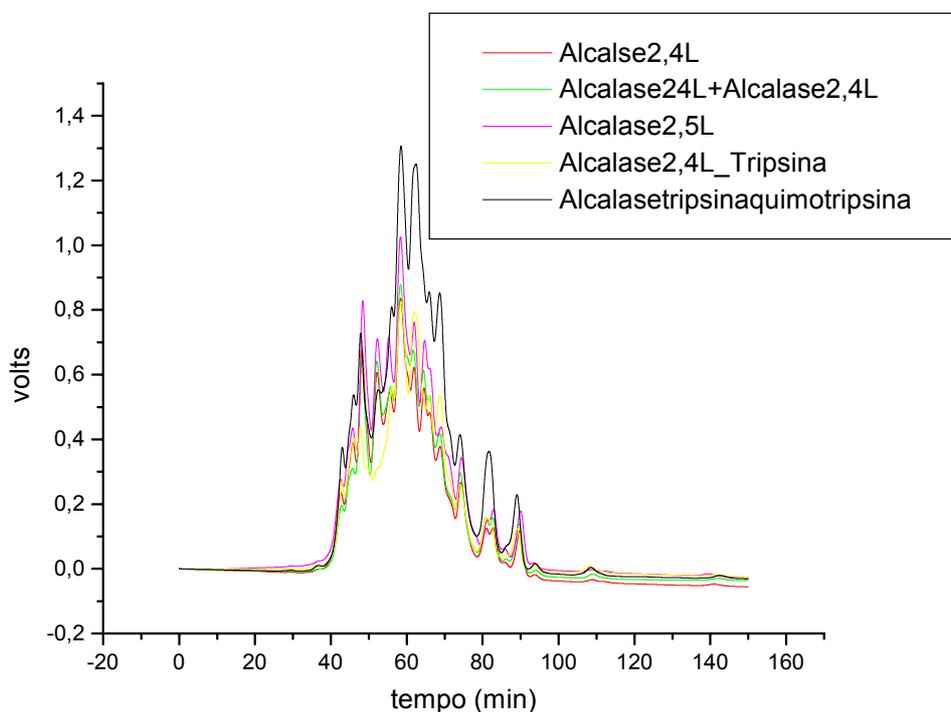


Figura 4.6. Cromatograma da caseína hidrolisada com diferentes proteases

O grau de hidrólise calculado resultou em valores bem próximos, entre 18 a 20%. O maior grau (20%) foi obtido utilizando as três enzimas proteolíticas, o qual também conduziu à produção de peptídeos menores, conforme pode ser verificado no cromatograma. Contudo, esse maior grau de hidrólise não resultou em mais altas atividades de PGA.

Uma possível explicação para a obtenção de produtos semelhantes utilizando proteases com especificidades diferentes é o fato de iniciarmos todas as hidrólises com a Alcalase, uma endoprotease de baixa especificidade. Desta forma, a mesma pode ter hidrolisado ligações peptídicas que seriam específicas para as demais enzimas, o que explica que a adição seqüencial de tripsina e quimotripsina não tenham conduzido a alterações significativas na composição de peptídeos. Aumento da concentração de Alcalase também não alterou significativamente os resultados, indicando que a concentração inicial utilizada já era suficiente para se atingir máximo grau de hidrólise, no tempo de reação usado.

Uma vez que não se observou melhora significativa na produção de PGA com o uso de outras proteases, continuou-se a utilizar a alcalase 2,4L para as hidrólises das proteínas.

#### **4.1.3.4.2.2. Uso de diferentes proteínas hidrolisadas: soro de queijo, peptona e triptona**

Visando mais uma vez a obtenção de diferente composição de peptídeos, decidiu-se alterar o substrato protéico, hidrolisando-se a seguir soro de queijo líquido concentrado. Assim, ao invés de caseína, seriam hidrolisadas agora B-lactoglobulina, alfa-lactoalbumina, soroalbumina e diferentes imunoglobulinas, que são as proteínas presentes no soro de queijo. Essas proteínas possuem diferentes estruturas primárias em relação à caseína, devendo se obter em consequência diferentes peptídeos nas suas hidrólises.

Os ensaios 53 e 54 tinham como objetivo não só testar o soro de queijo líquido (in natura) hidrolisado como fonte de nitrogênio e carbono, mas também verificar se a substituição do soro em pó pelo soro “in natura” influenciaria nos resultados a serem obtidos. Como verificado anteriormente, o soro de queijo em pó que vem sendo utilizado contém algum nutriente importante e esse pode estar presente em maiores quantidades no soro líquido, uma vez que o processo de secagem do soro pode alterar a composição desse nutriente. Dosagem de proteínas pelo método de Lowry e por Bradford de soro em pó e soro fresco (in natura) revelaram que o soro em pó sofre redução no tamanho das cadeias polipeptídicas de suas proteínas. A dosagem de proteínas presentes nas duas formas de soro pelo método de Lowry mostra resultados similares mas a dosagem pelo método de Bradford indica teor protéico muito menor no soro em pó que no fresco. É fato conhecido na literatura que o funcionamento adequado do método de Bradford requer polipeptídeos maiores que 5000 Daltons. Por outro lado, possivelmente ocorre perda de vitaminas no soro seco, constituindo-se em outra possível diferença entre os soros em pó e “in natura”.

Tabela 4.21. Produção de PGA utilizando soro de queijo líquido hidrolisado

Ensaio	MG	MP	t (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	A.Esp (UI/ g células)	C <sub>Lactose</sub> (g/L)
52	GC2 Caseína Soro Sais	PC12 Caseína hidrolisada Soro Sais 2x AFA	0	-	-	-	-	
			10	-	-	-	-	
			24	8,3	4,4	76	17,3	
			48	8,8	5,4	104	19,3	
53	GC2 Caseína Soro Sais	PC13 Soro Hidrolisado Esterilizado Sais 2x AFA	0	7,9	0,5	-	-	
			10	7,9	2,6	21	8,1	
			24	8,2	4,0	40	10,0	
			48	8,8	4,3	38	8,8	
54	GC2 Caseína Soro Sais	PC14 Soro Hidrolisado Esterilizado Soro Sais 2x AFA	0	7,9	0,5	-	-	45,3
			10	7,9	3,1	34	11,0	43,0
			24	8,4	4,2	31	7,4	42,8
			48	8,7	5,9	45	7,6	43,6
55	GC2 Caseína Soro Sais	PC14 Soro Hidrolisado Microfiltrado Soro Sais 2x AFA	0	7,7	0,6	-	-	44,1
			10	-	-	-	-	-
			24	8,1	3,7	27	7,3	44,9
			48	8,5	4,8	33	6,9	44,5

Concentração Inicial de proteínas(Lowry): caseína: 46 g/L; soro: 34 g/L

Cx = Concentração celular ; A.E. = atividade enzimática

Pode-se observar que o uso de soro hidrolisado conduziu sempre a baixas produções de PGA, embora a concentração celular tenha atingido valores semelhantes ao do meio padrão (ensaio 52). A adição de soro em pó não influenciou nesse resultado. Um fato observado foi o escurecimento do meio de cultivo após o processo de esterilização (autoclave). Isso nos levou a crer que ocorreu a reação de Maillard (reação entre açúcares e aminoácidos) durante o processo de esterilização. Essa possibilidade não tinha sido considerada, uma vez que achávamos que a lactose contida no soro líquido tinha permeado a membrana durante o processo de ultrafiltração. Contudo, o soro deveria ter sido dialisado antes da concentração, pois embora tenha havido realmente grande perda de

lactose pela membrana, a concentração do soro no processo resultou também em alta concentração residual da lactose no concentrado. A adição de soro em pó resulta em torno de 14 g/L de lactose no meio e a obtida com o uso de soro líquido concentrado e hidrolisado foi de 45 g/L. Tentativa de uso de soro esterilizado por microfiltração para evitar que ocorresse a reação (ensaio 55) também não resultou em aumento da produção.

Os resultados referentes ao soro líquido hidrolisado indicam que a composição resultante nesse hidrolisado não é a desejável pelo microrganismo ou que talvez esteja ocorrendo repressão da produção da enzima pela alta concentração de lactose. Esse último efeito não nos pareceu importante para ser investigado, pois era pouco provável que esse caminho conduzisse a aumento considerável na produção da enzima, objetivo sempre visado.

Optou-se, assim, por testar outras fontes de nitrogênio, na busca de uma substituição para a caseína que resultasse em melhora na produção da enzima. As fontes testadas foram peptona e triptona. Os resultados são apresentados na Tabela 4.22.

Tabela 4.22. Efeito de diferentes fontes de nitrogênio na produção de PGA

Ensaio	MG	MP	t (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	A. Esp. (UI/g células)
56	GC2 Caseína Soro Sais	PC12 Caseína (51,4 g/L) Soro Sais 2x AFA	0	7,8	0,9	-	-
			24	8,7	4,6	71	15,4
			48	8,8	4,7	89	18,9
57	GC2 Caseína Soro Sais	PC15 Peptona (25,6 g/L) Soro Sais 2x AFA	0	7,9	0,6	-	-
			24	8,8	3,9	35	9,0
			48	9,1	4,1	46	11,2
58	GC2 Caseína Soro Sais	PC16 Tryptona (9g/L) Soro Sais 2x AFA	0	7,7	0,4	-	-
			24	8,5	4,1	52	12,7
			48	9,1	3,4	21	6,2
59	GC2 Caseína Soro Sais	PC17 Tryptona (51,4 g/L) Soro sais 2x AFA	0	-	-	-	-
			24	8,3	4,1	46	11,2
			48	8,8	4,2	60	14,3

Cx = Concentração celular ; A.E. = atividade enzimática

Conforme pode ser visto pelos resultados apresentados na Tabela 4.22, nenhuma dessas fontes resultou em mais altos níveis de atividade de PGA.

#### 4.1.3.4.2.3 Influência da adição de aminoácidos: meio de germinação e de produção

Após a verificação da influência de diversas fontes de nitrogênio e a constatação de nenhuma melhoria na produção de PGA resolveu-se então testar a adição de alguns aminoácidos no meio PC12. A falta de algum(s) deles poderia vir a ser suprida desta maneira. Os ensaios apresentados na Tabela 4.23 estão relacionados com a adição dos mesmos. No ensaio 61, adicionou-se uma mistura de aminoácidos (4g/L) com a mesma composição que a encontrada na caseína,

quando esta é hidrolisada acidamente. Já para o ensaio 62 somente asparagina (2,5g/L), histidina (2,5g/L), prolina (2,5g/L) e arginina (2,5g/L) fizeram parte do meio, totalizando uma concentração de 10g/L. Com relação aos demais ensaios, a influência desses 4 aminoácidos foram verificadas individualmente, numa concentração final de 2,5 g/L.

Tabela 4.23. Efeito da adição de aminoácidos no meio PC12 (com caseína hidrolisada) na produção de PGA

Ensaio	MG	MP	T (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	A. Esp. (UI/g células)
60	Caseína Soro Sais	Caseína Soro Sais 2x AFA	0	7,9	0,5	-	-
			24	8,3	4,9	80	16,3
			48	8,8	5,4	90	16,7
61	Caseína Soro Sais	Caseína a.a. Soro Sais 2x /AFA	0	8,0	0,9	-	-
			24	8,8	5,2	54	10,4
			48	9,0	5,5	83	15,1
62	Caseína Soro Sais	Caseína 4 a.a. Soro Sais 2x /AFA	0	7,9	0,4	-	-
			24	8,5	5,0	51	10,2
			48	8,8	5,4	63	11,7
63	Caseína Soro Sais	Caseína Histidina Soro Sais 2x /AFA	0	7,7	0,5	-	-
			24	8,3	4,9	56	11,4
			48	8,7	5,9	86	14,6
64	Caseína Soro Sais	Caseína Prolina Soro Sais 2x /AFA	0	7,9	0,4	-	-
			24	8,3	4,9	79	16,1
			48	8,7	5,3	93	17,5
65	Caseína Soro Sais	Caseína Asparagina Soro Sais 2x /AFA	0	7,9	0,4	-	-
			24	8,4	4,5	76	16,9
			48	8,8	5,1	86	16,9
66	Caseína Soro Sais	Caseína Arginina Soro Sais 2x /AFA	0	8,1	0,5	-	-
			24	8,4	4,6	72	15,7
			48	8,7	5,5	91	16,5

Cx = Concentração celular ; A.E. = atividade enzimática

Analisando os resultados apresentados na Tabela 4.23, tanto para o ensaio 61, que continha 18 a.a. numa concentração final de 4 g/L, como para o ensaio 62 quando se adicionou 10g/L de uma mistura de 4 a.a., podemos observar que não houve aumento da produção de PGA ocorrendo até mesmo uma repressão na síntese da enzima no ensaio 62. A adição em separado desses aminoácidos também não influenciou na atividade final.

Esses resultados levam a crer que concentrações altas de aminoácidos inibem a produção de PGA, uma vez que essa produção não foi afetada quando se adicionaram separadamente os aminoácidos. Essa constatação nos motivou a realizar alguns ensaios utilizando somente a.a. no meio de produção só que em concentração menor do que a utilizada nos estudos de meio com aminoácidos livres, – que foi 51,4 g/L. Lembramos que nesse estudo, na presença dessa concentração alta (que corresponde à da caseína) os esporos do *B. megaterium* não foram capazes de germinar. Desta forma retornamos ao estudo do meio com aminoácidos livres. Na Tabela 4.24. são mostrados os resultados dos ensaios 67 e 68 que utilizam 10 e 20 g/L de aminoácidos, respectivamente.

Tabela 4.24. Influência da concentração de aminoácidos em meio sintético na produção de PGA.

Ensaio	MG	MP	t (h)	pH	Cx (g/L)	A.E * (UI/L)	Lactose (g/L)
67	GA7 a.a (20g/L) Lactose Sais	PA7 a.a (10g/L) Lactose Sais (2x) AFA	0	8,1	0,07	-	14,1
			24	8,3	0,07	19	13,9
			48	8,3	0,2	16	13,6
68	GA7 a.a (20g/L) Lactose Sais	PA8 a.a (20g/L) Lactose Sais (2x ) AFA	0	8,0	0,08	-	13,9
			24	8,2	0,07	12	13,8
			48	8,1	0,2	12	13,8

\* Precisão experimental é baixa para atividades de PGA abaixo de 30UI/L

Cx = Concentração celular ; A.E. = atividade enzimática

A observação em microscópio óptico mostrou que os esporos de *B. megaterium* foram capazes de germinar quando se utilizaram menores

concentrações de aminoácidos, apesar do crescimento celular ser baixo e conseqüentemente a atividade de PGA.

O que se resolveu testar, então, foi a adição de soro nesses meios com a.a., pois já tínhamos detectado que o soro possui algum nutriente que favorece o crescimento e produção de PGA. Junto com essa variável, testou-se o fato de realizar a germinação do microrganismo em meio padrão, a fim de obter uma alta concentração celular no inóculo. Os resultados são apresentados na Tabela 4.25. Observe-se que três concentrações diferentes de aminoácidos foram usadas para se verificar o efeito repressor.

Tabela 4.25. Influência da concentração de aminoácidos, na presença de soro de queijo, na produção de PGA.

Ensaio	MG	MP	t (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	A. Esp. (UI/g células)	Lactose (g/L)
69	GC2 Caseína Soro Sais	PA9 a.a. (3,4 g/L) soro Sais (2x) AFA	0	7,7	-	-	-	-
			24	8,6	2,5	21	8,4	12,0
			48	9,2	2,4	30	12,5	11,6
70	GC2 Caseína Soro Sais	PA10 a.a. (10g/L) soro sais (2x ) AFA	0	8,0	-	-	-	-
			24	8,4	3,5	70	20,0	12,8
			48	9,2	3,5	50	14,3	11,0
71	GC2 Caseína Soro Sais	PA11 a.a. (20g/L) soro sais (2x ) AFA	0	8,1	-	-	-	-
			24	8,5	3,4	45	13,2	11,2
			48	9,1	3,5	42	12,0	10,3
72	GA8 a.a. (10g/L) soro Sais	PA10 a.a. (10g/L) soro sais (2x ) AFA	0	8,1	-	-	-	-
			24	8,5	3,5	172	49,1	13,7
			48	9,3	3,2	140	43,8	13,6

Cx = Concentração celular ; A.E. = atividade enzimática

Nos primeiros 3 ensaios, onde se utilizou meio com caseína hidrolisada na germinação e soro de queijo junto com aminoácidos na etapa de produção, o crescimento celular foi muito maior quando comparando com um meio totalmente sintético (ensaios 67/68), no entanto, a produção de PGA não aumentou

correspondentemente. Entretanto, quando comparamos os ensaios em meio totalmente sintético, com o realizado com a adição de soro a esse meio, tanto na fase de germinação como na produção (ensaio 72), observa-se expressivo aumento da atividade enzimática, que atinge nível nunca alcançado antes. Esse resultado mostra que o soro de queijo tem um papel essencial na produção de PGA quando usado juntamente com aminoácidos. No meio contendo caseína foi verificado que o soro é importante, mas não de uma forma tão relevante.

O fato de obter atividades enzimáticas menores quando se realizou a germinação em meio com caseína hidrolisada é uma questão não esclarecida. Uma possível explicação seria a formação de proteases. Quando se utiliza caseína hidrolisada como fonte de nitrogênio estamos oferecendo ao meio de cultivo diversos peptídeos resultantes da hidrólise, desta forma o microrganismo poderia estar produzindo proteases com a finalidade de hidrolisar esses peptídeos e liberar nutrientes de mais fácil assimilação (peptídeos menores e aminoácidos). No entanto, quando essas proteases são produzidas, elas podem atacar a enzima de interesse resultando numa atividade enzimática menor do que a realmente produzida.

Dessa forma, resolveu-se verificar novamente a existência de enzimas proteolíticas por 2 métodos diferentes. Convém salientar que no item 4.1.1.1 já havia sido comentado a respeito da possível existência dessas enzimas, e que a realização de testes com o uso de gelatina mostrou que o *B. megaterium* não produz proteases, quando cultivado em meio com caseína. Embora tenhamos verificado a não existência dessas enzimas anteriormente os novos resultados suscitaram dúvidas a respeito da confiabilidade do método escolhido. Ainda, o fato de mudarmos de meio pode propiciar a produção de proteases. Levando em consideração esses fatores resolveu-se testar a atividade proteolítica tanto para o meio contendo aminoácidos como para o meio com caseína hidrolisada. Um dos métodos utilizados foi o uso do pHstato, que mede o consumo de NaOH para manutenção do pH, durante uma reação que libera prótons. Caso houvesse proteases presentes no caldo fermentado, ocorreria queda do pH após adição de uma alíquota desse caldo a uma solução de caseína, devido à liberação de terminais carboxílicos. Esse método não acusou a existência de proteases no meio.

Para confirmação desses resultados testou-se o método colorimétrico TNBS (2,4,6,-trinitrobenzeno sulfônico), implantado pela NOVO Industri para medida de atividade ALCALASE, o qual também não acusou atividade proteolítica em ambos os meios. Assim, não foi possível elucidar o porque da menor atividade enzimática obtida com a germinação na presença de hidrolisado de caseína ao invés de aminoácidos livres.

O expressivo aumento da atividade enzimática obtido no ensaio 72, onde germinação e produção foram feitas usando-se aminoácidos livres motivou a realização de outros ensaios com o objetivo não só de confirmar esse resultado como também testar outras concentrações de aminoácidos. O ensaio 73 é replicata do ensaio 72 onde se utilizou 10 g/L de aminoácidos; no ensaio 74, a concentração testada foi de 20g/L. Amostras obtidas nesses ensaios foram analisadas em HPLC para acompanhamento do consumo dos aminoácidos (a.a.) e do ácido fenil acético (AFA). Os resultados são apresentados na Tabela 4.26. Nas Figuras 4.7 e 4.8 tem-se o consumo dos aminoácidos durante o cultivo de *B. megaterium* utilizando uma concentração de 10 g/L e 20 g/L respectivamente.

Tabela 4.26. Influência da concentração de aminoácidos na produção de PGA. O meio de germinação utilizado foi o GA8 ( a.a = 10 g/L; soro e sais).

Ensaio	MP	t (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	A. Esp. (UI/g células)	Lactose (g/L)	a.a. (g/L)	AFA (g/L)
73	PA10 a.a (10g/L) soro sais (2x) AFA	0	8,1	0,5	-	-	14,4	9,0	2,3
		10		2,9	65	22,4	13,6	4,0	2,1
		24	8,4	4,5	232	51,6	13,6	0,8	0
		48	9,1	3,6	194	53,9	13,1	0,3	0
74	PA11 a.a (20g/L) soro sais (2x) AFA	0	8,2	0,5	-	-	12,8	17,0	2,5
		10		3,3	25	7,6	11,7	12,0	2,3
		24	8,4	3,6	71	19,7	11,1	7,8	1,5
		48	9,1	4,0	140	35,0	11,2	3,4	0

Cx = Concentração celular ; A.E. = Atividade Enzimática

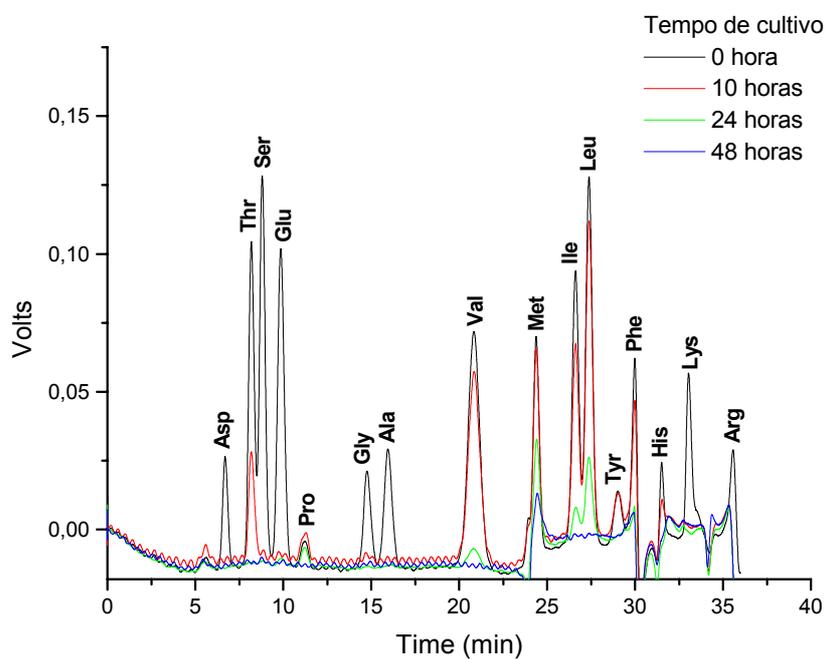


Figura 4.7: Consumo de aminoácidos (10g/L) durante o cultivo de *Bacillus megaterium*.

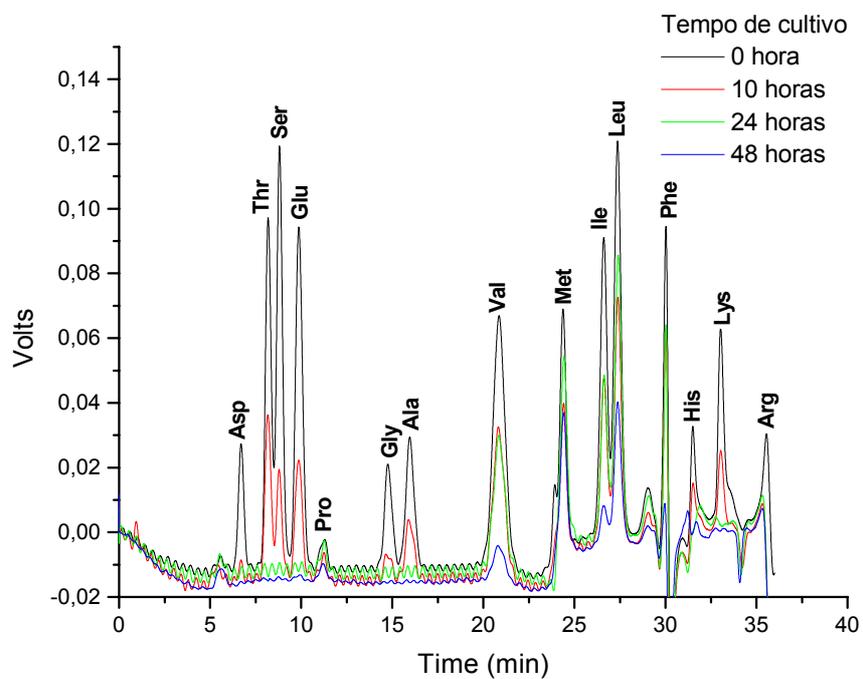


Figura 4.8. Consumo de aminoácidos (20g/L) durante o cultivo de *Bacillus megaterium*

Observa-se na Tabela 4.26 (ensaio 73) que os aminoácidos foram consumidos praticamente nas primeiras 10 horas e o AFA é consumido entre o período de 10 a 24 horas de cultivo, período em que a produção de PGA atinge o máximo. Já no ensaio 74 (20g/L), houve alto consumo de aminoácidos nas primeiras 10 horas, porém a concentração restante ainda se encontrava alta, atrasando desta forma o consumo de AFA, que se completou somente após as 24 horas de cultivo. Quando se utilizou 20 g/L, pode-se observar que ocorre uma repressão na síntese da enzima comparando-se com o ensaio que utilizou 10 g/L.

Os resultados obtidos através dos cromatogramas mostram que o microrganismo consome preferencialmente os aminoácidos alanina, ácido aspártico, glicina, lisina, serina, arginina e ácido glutâmico. Observa-se assim uma significativa influência da concentração inicial da fonte de nitrogênio na produção da enzima, o que indica estar havendo regulação da síntese da enzima por nitrogênio.

A influência da concentração e composição dos aminoácidos na produção de PGA foi por isso estudada, em paralelo a este trabalho, por Vanessa Ribeiro de Souza (Mestrado). Este estudo foi feito utilizando a técnica da omissão simples, que consiste na omissão individual de cada um dos 18 aminoácidos utilizados. Esta técnica foi empregada para concentrações iniciais de aminoácidos de 10 e 20 g/L. Com a realização desses experimentos buscou-se averiguar qual ou quais dos aminoácidos estavam influenciando o comportamento do microrganismo em relação ao crescimento e à produção de PGA.

As conclusões desse trabalho foram que para meios de produção contendo 10,0 g/L de concentração inicial, nenhum dos aminoácidos omitidos se mostrou ser essencial no crescimento do microrganismo e produção de PGA. Confirmou-se também o consumo preferencial pelo microrganismo pelos aminoácidos alanina, ácido aspártico, glicina, serina, arginina e ácido glutâmico. Já para meios de produção com solução de aminoácidos de 20,0g/L a omissão da arginina, valina, ácido glutâmico, lisina conduziram a um maior aumento na atividade da enzima comparada ao padrão. Parece que há uma correlação entre o consumo preferencial de aminoácidos pelo microrganismo e a sua importância na regulação da expressão da enzima. A omissão da prolina, treonina, tirosina e fenilalanina

conduziram a um decréscimo na atividade enzimática indicando um efeito indutor desses aminoácidos. A omissão de cada um, embora tenha melhorado a atividade não recuperou os níveis de atividade alcançados no ensaio padrão com 10,0 g/L inicial de aminoácidos total. Os resultados parecem indicar assim a ocorrência de um efeito aditivo dos 18 aminoácidos testados.

Segundo Fisher, 1999, a expressão de enzimas relacionadas ao consumo de aminoácidos é finamente regulada pela concentração desse nutriente em *B. subtilis*, um microrganismo estreitamente relacionado a *B. megaterium*, estando sujeita a três sistemas regulatórios globais de proteínas. Assim, a transcrição de PGA só estaria liberada para uma estreita faixa de concentração da fonte de nitrogênio, sendo rapidamente bloqueada quando essa concentração aumenta acima dos valores permitidos pelo sistema regulatório. A ocorrência de efeito repressor aditivo pelos aminoácidos e a necessidade de um controle fino da concentração de nitrogênio recomendam, pois, uso de batelada alimentada de aminoácidos em biorreator para aumento da concentração celular e, conseqüentemente, da produção associada da enzima.

#### **4.1.3.4.2.4. Uso de hidrolisado ácido de caseína (Difco)**

O fato do hidrolisado ácido de caseína, teoricamente, ter a mesma composição dos aminoácidos livres, nos motivou a testar essa nova fonte. A substituição dos aminoácidos pela caseína nos facilitaria o preparo do meio e também reduziria os custos. Os resultados obtidos nos ensaios onde se utilizou essa fonte estão apresentados na Tabela 4.27. Foram realizados diversos ensaios com variações na concentração da caseína para verificar se não ocorreria efeito repressivo pelos aminoácidos.

Tabela 4.27. Influência do uso de caseína hidrolisada ácida no meio de cultivo

Ensaio	MG	MP	t (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	A.Esp. (UI/ g células)
75	GA8 a.a. (10g/L) soro Sais	PC18 Caseína Difco (10 g/L) Soro sais (2x) AFA	0	8,0	0,5	-	-
			24	8,4	3,4	66	19,4
			48	9,3	3,8	58	15,3
76	GA8 a.a. (10g/L) soro Sais	PC19 Caseína difco (5 g/L) Soro sais (2x) AFA	0	7,6	0,6	-	-
			24	8,7	2,9	106	36,6
			48	9,0	2,2	97	44,1
77	GA8 a.a. (10g/L) soro Sais	PC19 Caseína difco (5 g/L) + a.a. (5 g/L) soro sais (2x) AFA	0	7,7	0,6	-	-
			24	8,5	3,9	68	17,4
			48	8,9	3,3	53	16,1
78	GA8 a.a. (10g/L) soro Sais	PC19 Caseína difco (5 g/L) + Caseína difco (5 g/L) (após 24h de cultivo) Soro sais (2x) AFA	0	7,6	0,6	-	-
			24	8,7	2,9	106	36,6
			48	8,8	3,1	101	32,6

Podemos observar nos resultados obtidos que quando substituímos os aminoácidos por caseína hidrolisada ácida temos uma redução na produção de PGA, efeito esse mais brusco quando utilizamos concentrações maiores de caseína (ensaio 75). O fato de obtermos mais altos níveis enzimáticos para concentrações menores nos indica que está ocorrendo uma inibição na produção da enzima, inibição esta que pode ser causada pelos aminoácidos ou então por alguma “impureza” presente nesse hidrolisado. A hipótese de impureza não detectável por fluorescência parece mais provável, pois em ensaio realizado usando o que restava de um lote antigo de caseína - também Difco, obteve-se resultados similares aos que vinham sendo obtidos com solução de aminoácidos. Análise de aminoácidos dos dois lotes não detectou diferença na composição em aminoácidos.

#### 4.1.3.4.3 – Estudos sobre o papel do soro de queijo

A produção de PGA em meio contendo aminoácidos só foi possível quando estava presente soro de queijo. As análises de lactose feitas pelo método Somogyi mostraram que a concentração deste açúcar permanece praticamente constante ao longo das fermentações o que descarta a possibilidade de o *B. megaterium* utilizar a lactose como fonte de carbono. Esse fato evidencia que é outro nutriente presente na composição do soro que é essencial para a produção da enzima, por isso iniciou-se a busca para descobrir qual nutriente é essencial para que o microrganismo consiga produzir a PGA.

A primeira batelada de ensaios realizados baseou-se na substituição do soro por todos seus principais componentes (proteínas, vitaminas, lactose e sais de potássio e fósforo) e a omissão individual de cada um dos componentes. O estudo da omissão tinha como objetivo descobrir qual nutriente que era o responsável pela produção de PGA, uma vez que substituindo o soro por todos os seus nutrientes a produção de PGA seria possível, porém não descobriríamos qual era o nutriente chave. Assim, o ensaio 80 contém todos os nutrientes do soro e nos ensaios 81-84 omitiu-se respectivamente proteínas, vitaminas, lactose,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . O ensaio 79 é o padrão (PA10 - com soro). Na Tabela 4.28 tem-se os componentes que fazem parte do soro de queijo e suas respectivas concentrações. Os resultados obtidos nos ensaios são apresentados na Tabela 4.29.

Tabela 4.28. Concentrações de nutrientes utilizadas nos ensaios simulando a composição do soro de queijo. Concentrações baseadas em Berazaín, 1997.

Componentes	Concentração (g/L)
Vitaminas	
A (retinol)	$5,8 \cdot 10^{-5}$
C (ácido ascórbico)	$3,1 \cdot 10^{-4}$
B2 (riboflavina)	$4,7 \cdot 10^{-4}$
Ácido Pantotênico	$2,2 \cdot 10^{-3}$
B12	$4,7 \cdot 10^{-4}$
Proteínas	
$\beta$ -lactoglobulina	1,1
$\alpha$ -lactoalbumina	0,5
Soro albumina	0,12
Açúcares	
Lactose	14,7
Ácidos	
Ácido oléico	0,04
Ácido láctico	0,04
Sais	
CaCl <sub>2</sub>	0,037
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,6

Tabela 4.29. Efeito da substituição do soro por seus componentes e verificação da omissão individual de cada componente na produção de PGA.

Ensaio	MG	MP	t (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	Lactose DNS (g/L)
79	a. a. (10g/L) Proteínas/vitaminas/ Lactose/ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Sais	a.a (10g/L) soro sais (2x ) AFA	0	8,0	0,3	-	12,7
			24	8,4	3,4	170	12,2
80	a. a. (10g/L) Proteínas/vitaminas/ Lactose/ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Sais	a.a (10g/L) todos nutrientes soro sais (2x ) AFA	0	8,1	0,4	-	13,5
			24	8,4	4,0	-	12,3
81	a. a. (10g/L) Proteínas/vitaminas/ Lactose/ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Sais	a.a (10g/L) omissão proteínas sais (2x ) AFA	0	8,2	0,5	-	13,3
			24	8,4	4,7	12	12,5
82	a. a. (10g/L) Proteínas/vitaminas/ Lactose/ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Sais	a.a (10g/L) omissão vitaminas sais (2x ) AFA	0	8,0	0,5	-	13,5
			24	8,5	4,6	-	13,2
83	a. a. (10g/L) Proteínas/vitaminas/ Lactose/ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Sais	a.a (10g/L) omissão lactose sais (2x ) AFA	0	7,9	0,5	-	-
			24	8,4	4,1	-	-
84	a. a. (10g/L) Proteínas/vitaminas/ Lactose/ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Sais	a.a (10g/L) omissão KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> sais (2x ) AFA	0	8,2	0,5	-	12,8
			24	8,3	0,6	72	12,5

Como pode-se observar na Tabela 4.29 a substituição do soro por todos os seus principais componentes não resultou em produção de PGA e conseqüentemente não foi possível detectar qual nutriente presente no soro tem o papel chave na produção da enzima. Um resultado interessante nessa batelada de ensaios foi com relação ao sal de fósforo e potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Quando este sal é adicionado ao meio o crescimento celular é praticamente o mesmo que o obtido quando se adiciona soro (ensaios 79-83), agora quando este não é adicionado ao meio (ensaio 84) o crescimento celular não é significativo e observa-se ocorrer produção da enzima.

Estes resultados nos motivaram a realizar outros ensaios de produção de PGA onde foi acrescentado o dobro deste sal e de cálcio. Esta adição foi feita em um meio padrão (PA10) e também no meio totalmente sintético onde o soro foi substituído por seus componentes. Estes ensaios tinham como objetivo verificar se ocorreria um aumento na atividade enzimática quando se utiliza o meio padrão e investigar se não era a falta de fósforo e potássio que estava causando a não produção de enzima. Os resultados são apresentados na Tabela 4.30.

Tabela 4.30. Influência da adição de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e cálcio na produção de PGA

Ensaio	MG	MP	t (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	Lactose DNS (g/L)
85	a. a. (10g/L) Proteínas/ Vitaminas/ Lactose/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ Sais	a.a (10g/L) soro + dobro $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /cálcio sais (2x ) AFA	0	8,1	0,5	-	12,8
			24	8,4	4,4	33	12,0
86	a. a. (10g/L) Proteínas/ Vitaminas/ Lactose/ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ Sais	a.a (10g/L) todos nutrientes soro + dobro $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /cálcio sais (2x ) AFA	0	8,1	0,5	-	12,8
			24	8,3	4,3	11	12,4

Os resultados apresentados nesta Tabela mostram que houve um forte efeito inibitório na produção de PGA quando se adicionou o dobro de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ /cálcio no meio padrão (comparação do ensaio 79 com 85). Com relação ao meio sintético não houve mudanças nos resultados, ou seja, não se conseguiu produzir PGA em meio totalmente sintético. É claro, no entanto, que o fósforo e/ou potássio são importantes para o crescimento do microrganismo mas não os responsáveis pela produção da PGA, tendo até mesmo efeito adverso quando em concentrações maiores que a ideal.

Partindo desses fatos decidiu-se realizar novos ensaios com metade da concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  inicialmente utilizada e acrescentando os lipídios comumente encontrados no soro – ácido oléico e ácido láctico. No ensaio 88 foi adicionado ácido oléico, no ensaio 89 ácido láctico e no ensaio 90 ambos foram adicionados. Uma outra tentativa foi extrair a gordura de um soro de queijo líquido e acrescentar ao meio de cultivo (ensaio 91). O ensaio 87 é o que utiliza o

meio padrão (PA10). Os resultados são apresentados na Tabela 4.31. Nesses ensaios não foram mais acrescentados os demais nutrientes presentes no soro (vitaminas, proteínas e lactose) pois não foi observado nenhum efeito dos mesmos.

Tabela 4.31. Influência da diminuição do sal de fósforo e potássio e da adição dos lipídios na produção de PGA.

Ensaio	MG	MP	T (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)
87	a. a. (10g/L) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Sais	a.a (10g/L) soro sais (2x ) AFA	0	7,8	0,4	-
			24	8,6	3,3	239
88	a. a. (10g/L) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Sais	a.a (10g/L) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Ácido oléico Sais (2x ) AFA	0	7,8	0,4	-
			24	8,3	2,1	-
89	a. a. (10g/L) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Sais	a.a (10g/L) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Ácido láctico Sais (2x ) AFA	0	7,8	0,4	-
			24	8,7	4,9	-
90	a. a. (10g/L) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Sais	a.a (10g/L) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Ácido oléico e láctico sais (2x ) AFA	0	7,8	0,4	-
			24	8,3	2,4	-
91	a. a. (10g/L) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Sais	a.a (10g/L) KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Gordura do soro líquido Sais (2x ) AFA	0	8,1	0,3	-
			24	8,5	3,6	31

O que se pode observar nesses resultados é que a adição de ácido láctico (ensaio 89) conduz a um aumento da concentração celular quando comparado com o ensaio onde se adicionou ácido oléico (ensaio 88). Agora, quando se adicionou os dois juntos o crescimento celular foi o mesmo que aquele obtido com somente ácido oléico. Embora tenhamos atingido uma boa concentração celular não foi

possível obter níveis de produção da enzima, nem mesmo diminuindo a concentração de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .

Uma outra forma de comprovarmos o efeito inibitório do fósforo e potássio é realizar um ensaio com o meio padrão (PA10) porém adicionando-se o dobro de soro de queijo. Os resultados desse ensaio (93) são apresentados na Tabela 4.32.

Tabela 4.32. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando o dobro de soro de queijo no meio padrão (PA10)

Ensaio	MG	MP	t (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	A. Esp. (UI/ g células)
92	a. a. (10g/L) soro Sais	a.a (10g/L) soro sais (2x ) AFA	24	8,4	3,3	170	51,5
93	a. a. (10g/L) soro Sais	a.a (10g/L) dobro soro sais (2x ) AFA	24	8,3	3,8	87	22,9

Como podemos observar na Tabela 4.32 o fato de acrescentarmos o dobro de soro de queijo no meio de cultivo acarretou um decréscimo grande na atividade enzimática (comparação do ensaio 92 com o 93). Esse resultado vêm a confirmar os dados obtidos no ensaio 85, onde o meio padrão foi suplementado com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e ocorreu um efeito inibitório na produção de PGA. É claro, portanto, que os sais de fósforo e potássio afetam drasticamente a produção da enzima.

Embora tenhamos verificado que o sal de potássio e fósforo é necessário para o crescimento do microrganismo e que altas concentrações deste sal inibem a produção da enzima, não se conseguiu esclarecer qual nutriente do soro é essencial na produção de PGA. Uma possível explicação para o fato da substituição do soro pelos componentes não ter conseguido reproduzir os resultados com soro seriam diferenças entre a composição de literatura (Berazaín,1997) usada para cálculo da concentração do nutriente adicionado e a real do soro que está se substituindo. Conforme Marwaha et al.,1988, apud Ponsano et alli.,1992, a composição e o tipo de soro de leite produzido nas

indústrias leiteiras dependem dos tipos de queijos fabricados, dos processos tecnológicos utilizados na produção e também do modo como este é seco, portanto, seu conteúdo em proteínas, sais minerais, ácidos graxos, lactose e ácido láctico também pode variar. Outra explicação seria a falta de algum micronutriente existente no soro e não descrito na literatura.

#### **4.1.3.4.4. – Influência do ácido fenil acético (AFA)**

Uma vez que o meio de produção que se passou a utilizar contém aminoácidos livres, foi considerado importante reavaliar a influência do AFA na produção de PGA, tal como havia sido feito com o meio com caseína hidrolisada. Os ensaios 94 a 96 seguiram a seguinte ordem: sem adição de AFA, concentração normal utilizada (2,7 g/L) e o dobro da normal (5,4 g/L). Para o ensaio 97 a concentração de AFA foi a normal, porém foi adicionado glicose com o intuito de verificar se com essas condições consideradas ótimas iria ocorrer repressão na síntese da enzima. Os resultados são apresentados na Tabela 4.33.

Tabela 4.33. Influência do ácido fenil acético e da glicose na produção de PGA em meio contendo aminoácidos livres

Ensaio	MG	MP	t (h)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	A.Esp. (UI/ g células)
94	GA8 a.a. (10g/L) soro Sais	PA12 a.a (10 g/L) soro sais (2x )	0	7,9	0,4	-	-
			24	8,7	3,2	100	31,3
			48	9,2	2,1	97	46,2
95	GA8 a.a. (10g/L) soro Sais	PA10 a.a (10 g/L) soro sais (2x ) AFA (2,7 g/L)	0	7,8	0,6	-	-
			24	8,4	3,9	222	56,9
			48	9,1	3,0	193	64,3
96	GA8 a.a. (10g/L) soro Sais	PA13 a.a (10g/L) soro sais (2x ) AFA (5,4 g/L)	0	7,7	0,4	-	-
			24	8,3	3,4	139	40,9
			48	8,9	3,6	218	60,6
97	GA8 a.a. (10g/L) soro Sais	PA14 a.a. (10g/L) soro glicose sais (2x ) AFA (2,7 g/L)	0	7,7	0,5	-	-
			24	7,5	5,5	48	8,7
			48	8,3	5,2	82	15,8

O comportamento do microrganismo perante essas variáveis em meio com aminoácidos livres foi semelhante ao do meio com hidrolisado de caseína, ou seja, a produção de PGA na ausência de AFA reduziu-se praticamente à metade e quando se adiciona glicose ocorre repressão, ou falta de indução, uma vez que os resultados vêm indicando que só ocorre produção da enzima quando o microrganismo cresce consumindo aminoácidos como fonte de carbono e de nitrogênio. Quando foi adicionado o dobro de AFA (ensaio 96) pode-se observar que ocorreu um atraso na produção de PGA (tempo de 24 horas), porém ao final do cultivo obteve-se a mesma concentração de enzima. A presença de AFA é importante e uma concentração de 2,7 g/L continuou a ser a mais adequada.

## 4.2. Produção de PGA por *B. megaterium* em Biorreator

Previamente à apresentação dos resultados referentes a essa etapa será apresentado uma Tabela ( 4.34) com as condições utilizadas em cada ensaio. Essa Tabela tem como finalidade facilitar o entendimento das mudanças aplicadas em cada ensaio. Há que salientar aqui que se utilizou duas fontes de nitrogênio ao longo dos ensaios no biorreator. Para os ensaios de 1-7 utilizou-se o meio contendo caseína hidrolisada como fonte de nitrogênio e para os ensaio 8, 9 e 10 utilizou-se o meio com aminoácidos.

As variáveis investigadas na produção de PGA por *B. megaterium* em biorreator foram a concentração de oxigênio dissolvido no meio (ensaios 1, 2 e 3), o pH (ensaios 5 e 6) e diferentes estratégias de alimentação dos nutrientes (ensaios 4, 7, 8, 9 e 10).

Tabela 4.34. Condições utilizadas nos diferentes ensaios realizados em biorreator

<p>Ensaio 1</p> <p>- “slant”</p> <p>- 20% de oxigênio nas primeiras 8 horas e depois controlado em 10%</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adição de AFA após 8 horas</li> <li>- Ausência de controle de pH <ul style="list-style-type: none"> <li>- Meio GC1 e PC1</li> </ul> </li> </ul>	<p>Ensaio 2</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3ª batelada de criotubos</li> <li>- agitação fixada em 300 rpm nas primeiras 10 horas e depois controle em 20% de O<sub>2</sub> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adição de AFA no início</li> <li>- Ausência de controle de pH <ul style="list-style-type: none"> <li>- Meio GC2 e PC5</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
<p>Ensaio 3</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3ª batelada de criotubos</li> <li>20% de oxigênio nas primeiras 12 horas e depois controlado em 10%</li> <li>- Adição de AFA no início</li> <li>- Ausência de controle de pH <ul style="list-style-type: none"> <li>- Meio GC2 e PC5</li> </ul> </li> </ul>	<p>Ensaio 4</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3ª batelada de criotubos</li> <li>- 20% de oxigênio em todo o cultivo <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adição de AFA no início</li> <li>- Ausência de controle de pH <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alimentação de AFA <ul style="list-style-type: none"> <li>- Meio GC2 e PC5</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
<p>Ensaio 5</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3ª batelada de criotubos</li> <li>- agitação fixada em 450 rpm nas primeiras 8 horas e depois em 600 rpm <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adição de AFA no início</li> <li>- Controle de pH em 8 até 30 horas <ul style="list-style-type: none"> <li>- Meio GC2 e PC5</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	<p>Ensaio 6</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3ª batelada de criotubos</li> <li>- agitação fixada em 450 rpm nas primeiras 8 horas e depois em 600 rpm <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adição de AFA no início</li> <li>- Houve formação de espuma <ul style="list-style-type: none"> <li>- Controle de pH em 8 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Meio GC2 e PC5</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>
<p>Ensaio 7 -</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 3ª batelada de criotubos</li> <li>- 20% de oxigênio em todo o cultivo <ul style="list-style-type: none"> <li>- Adição de AFA no início <ul style="list-style-type: none"> <li>- Sem controle de pH <ul style="list-style-type: none"> <li>- Meio GA8 e PA10 (a.a.).</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	<p>- Ensaio 8</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Igual ao ensaio 7 + alimentação de aminoácidos</li> </ul>
<p>- Ensaio 9</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Igual ao ensaio 7 + alimentação de aminoácidos (concentração diferente)</li> </ul>	<p>- Ensaio 10</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Igual ao ensaio 7 + alimentação de aminoácidos e soro de queijo</li> </ul>

#### **4.2.1. Influência da concentração do oxigênio dissolvido (ensaios 1,2,3)**

Antes da padronização do inóculo foi realizado um ensaio no biorreator com o microrganismo que até então tinha apresentado melhor resultado na produção de PGA (ensaio 12). Como os valores de atividades enzimáticas encontrados não foram satisfatórios decidiu-se verificar a influência da concentração de oxigênio dissolvido no processo. Como citado no item 2.3 essa é uma variável de suma importância e esperava-se com essa mudança atingir maior produção de PGA, uma vez que era possível o microrganismo estar com limitação de O<sub>2</sub> nos ensaios em “shaker”. As condições empregadas nesse ensaio foram as melhores encontradas por Hojo,1997 :

- aeração na faixa de 3 a 1 L/min;
- temperatura controlada em 30°C;
- oxigênio dissolvido foi controlado em 20% da saturação no início do ensaio e 10% após 8 horas de inoculação;
- adição de ácido fenil acético após 8h de inoculação
- ausência de controle de pH

Com relação aos meios utilizados nesse ensaio foram os mesmos do ensaio 12 (GC1 e PC1), pois até o momento não tínhamos verificado a influência dos nutrientes nos meios. O volume da fermentação foi de 4,5L sendo 4,0L de meio de produção e 0,45L de inóculo. O ensaio teve a duração de 96 horas com retiradas de amostras em intervalos regulares de 2 horas no início e 4 horas após 12 horas de corrida. Foram realizadas análises de concentração de lactose, biomassa, concentrações de proteínas (Métodos Lowry e Bradford) e atividade enzimática. Os resultados são apresentados na Tabela 4.35.

Tabela 4.35. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado a 20% de oxigênio dissolvido nas primeiras 8 horas e depois controlado em 10%, ausência de controle de pH e adição de AFA após 8 horas de cultivo. Ensaio 1

t (horas)	pH	Cx (g/L)	A.E. (UI/L)	A.Esp. (UI / g células)	Proteínas (g/L) Lowry	Proteínas (g/L) Bradford	Lactose (g/L)
Inóculo	-	1,7	-	-	26,9	0,5	4,7
0	8,1	0,2	-	-	12,4	0,6	14,9
2	8,2	0,4	-	-	12,6	0,7	14,9
4	8,1	0,4	-	-	12,4	0,7	15,1
6	8,1	0,7	-	-	12,3	0,7	15,1
8	8,2	0,7	-	-	12,0	0,7	14,9
10	8,1	0,9	-	-	11,7	0,7	14,9
12	7,4	1,0	-	-	11,4	0,7	15,1
16	7,5	1,2	-	-	11,6	0,7	15,1
20	7,6	1,4	-	-	11,4	0,7	14,8
24	7,7	1,4	-	-	10,8	0,7	14,8
28	7,9	1,5	17	11,3	10,8	0,7	14,7
34	8,0	1,6	23	14,4	10,5	0,7	14,7
36	8,0	1,7	27	15,9	10,5	0,7	14,8
40	8,1	1,7	20	11,8	10,6	0,7	14,7
44	8,2	1,8	29	16,1	9,4	0,7	14,4
48	8,2	1,8	33	18,3	9,4	0,7	14,2
52	8,3	1,9	42	22,1	9,6	0,7	14,2
56	8,4	1,9	42	22,1	8,9	0,8	14,2
68	8,5	1,6	52	32,5	9,0	0,8	14,1
72	8,5	1,6	54	33,8	8,3	0,8	14,1
76	8,5	1,8	46	25,6	8,4	0,8	14,2
92	8,6	1,7	59	34,7	8,2	0,8	14,2
96	8,6	1,7	53	31,2	7,7	0,8	14,2

Na Figura 4.9 estão representadas algumas variáveis (pH,  $Y_{CO_2}$ ,  $Y_{O_2}$ , oxigênio dissolvido) que foram obtidas pelo sistema de aquisição de dados, juntamente com a atividade enzimática e concentração celular obtidas pela análise em laboratório.

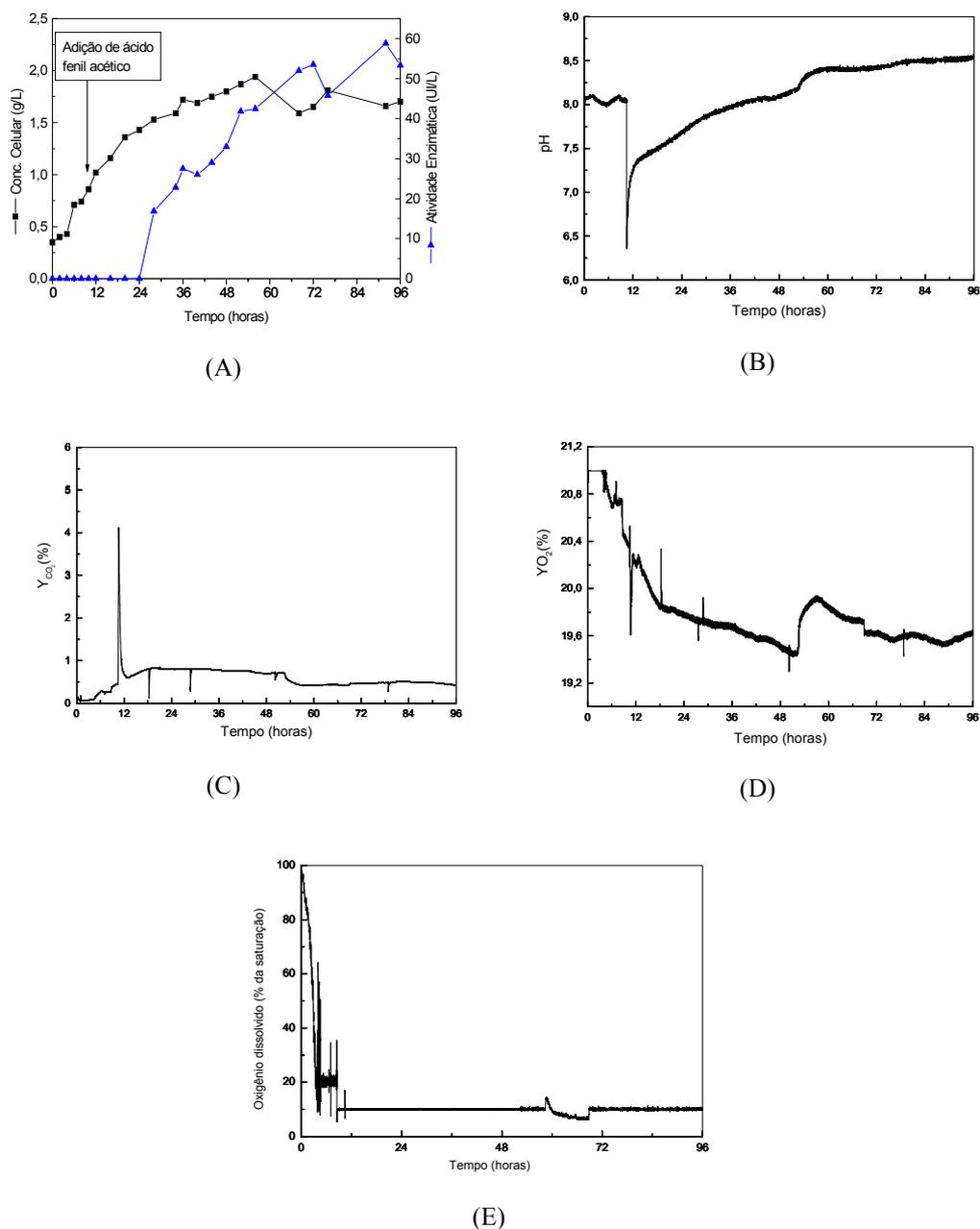


Figura 4.9: Resultados experimentais do primeiro ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO<sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O<sub>2</sub>, (E) concentração de oxigênio dissolvido, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 4.35, observa-se que não houve nem aumento de produção da enzima e nem aumento celular em relação ao ensaio em “shaker” (ensaio 12). O baixo crescimento do microrganismo evidencia

que este deve estar tendo seu crescimento limitado pela ausência de algum elemento vital.

No gráfico de pH (Figura 4.9-B) pode-se observar uma variação brusca, imediatamente após a adição de ácido fenil acético, no entanto, logo após a queda, este gradativamente retorna para a faixa normal pela ação do tampão carbonato que foi adicionado ao meio.

Também podemos observar um pico nos valores de CO<sub>2</sub> (Figuras 4.9-C) logo após a adição de AFA. Esta evolução é devida à presença do carbonato de cálcio que foi adicionado ao meio para controle do pH. Estes resultados indicam que a monitorização da concentração de CO<sub>2</sub> pode induzir a interpretações errôneas, se a liberação desse gás em decorrência do efeito tampão do carbonato de cálcio não for levado em conta. A evolução dessa variável não é consequência do metabolismo das células, mas sim da adição do AFA.

O segundo ensaio realizado no biorreator já foi realizado com o microrganismo proveniente de criotubos (3<sup>a</sup> batelada) e após verificar em shaker aumento da atividade adicionando-se sais no meio de produção (PC5). O ácido fenil acético foi adicionado no início do cultivo, pois conforme os ensaios em “shaker” este não mostrou afetar a produção de PGA se adicionado no início ou após 8h de inoculação do microrganismo. Nesse ensaio fixou-se a agitação em 300 rpm com o intuito de manter a mesma agitação que no shaker. Os resultados são apresentados na Tabela 4.36 e na Figura 4.10. A Figura 4.10 mostra os resultados da concentração celular e atividade enzimática obtidas após análises de laboratório, além dos valores das variáveis pH, fração molar dos gases de saída e oxigênio dissolvido, obtidas com o sistema de aquisição de dados.

Tabela 4.36. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado a uma agitação de 300 rpm nas primeiras 10 horas e depois controle em 20% de oxigênio dissolvido, ausência de controle de pH e adição de AFA no início do cultivo. Ensaio 2

T (horas)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	A. Esp. (UI / g células)	Proteínas (g/L) Lowry	Proteínas (g/L) Bradford	Lactose (g/L)
Pré-inóculo		6,7	-	-	33,6	0,32	5,7
Inóculo	8,4	5,8	-	-	30,8	0,52	6,0
0	7,9	0,6	-	-	43,9	0,98	12,3
2	7,9	0,6	-	-	42,7	0,98	12,4
4	7,9	1,0	-	-	43,4	0,98	12,5
6	8,0	1,1	-	-	43,8	0,94	13,5
8	7,8	0,9	-	-	42,2	0,95	13,0
10	8,0	1,4	-	-	43,1	0,95	13,2
12	7,9	1,9	34	17,9	43,2	0,98	13,1
17	8,3	4,9	50	10,2	42,0	0,99	13,5
20	8,6	6,1	54	8,9	38,0	1,03	13,2
24	8,9	7,2	58	8,1	36,1	1,03	12,8
28	8,9	6,4	50	7,8	33,9	1,1	13,5
37	9,0	6,5	55	8,5	34,1	1,13	13,0
41	9,0	6,2	54	8,7	34,2	1,1	12,3
44	9,0	6,4	64	10,0	34,1	1,12	12,8
48	9,0	6,2	53	8,5	34,4	1,09	13,0
62	9,1	6,3	60	9,5	33,4	1,09	13,2
64	9,1	6,2	61	9,8	34,0	1,13	13,5
68	9,2	6,1	56	9,2	34,0	1,17	13,4
72	9,2	6,5	56	8,6	34,2	1,12	13,0

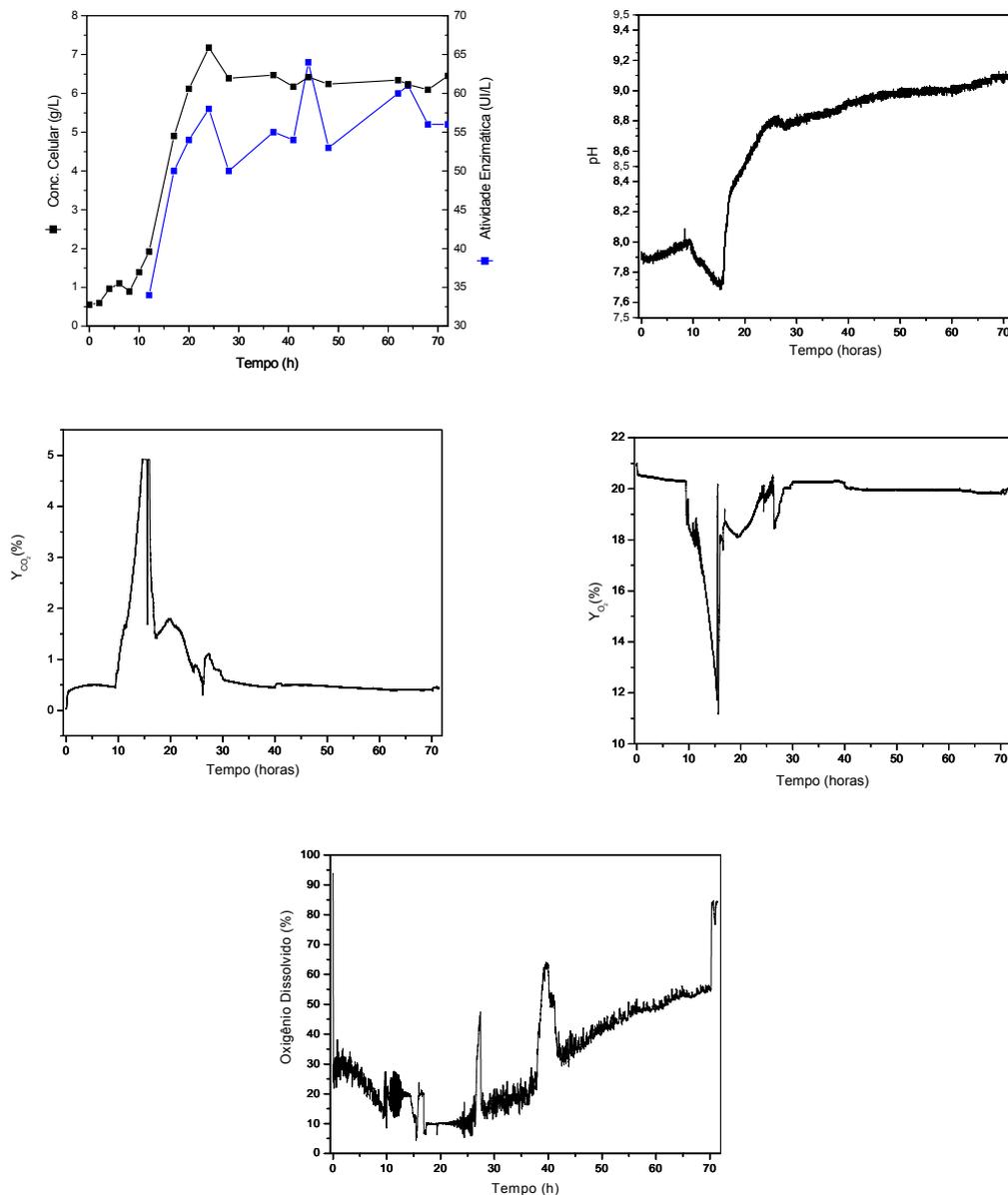


Figura 4.10: Resultados experimentais do segundo ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO<sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O<sub>2</sub>, (E) concentração de oxigênio dissolvido, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

Através dos resultados obtidos pode-se observar que possivelmente o crescimento do microrganismo (nas primeiras 10 horas) foi limitado pelo oxigênio dissolvido. A agitação em 300 rpm fez com que o oxigênio dissolvido apresentasse uma queda muito acentuada, implicando numa estagnação do CO<sub>2</sub> e da concentração celular nas primeiras horas e começando até mesmo ocorrer uma

diminuição das mesmas entre o tempo de 6 à 8 horas. Sendo assim, resolveu-se fixar o oxigênio dissolvido em 20% , condição utilizada no ensaio anterior, e pode-se observar que a partir de então o microrganismo apresentou crescimento exponencial até aproximadamente 24h.

Em virtude da limitação de O<sub>2</sub> resolveu-se realizar um ensaio utilizando as melhores condições de oxigênio obtidas por Visnardi, 1997, que é 20% de oxigênio dissolvido nas primeiras 12 horas e depois controlado em 10%. Os resultados desse ensaio são apresentados na Tabela 4.37 e na Figura 4.11. A Figura 4.11 mostra os resultados da concentração celular e atividade enzimática obtidas após análises de laboratório, além dos valores das variáveis pH, fração molar dos gases de saída e oxigênio dissolvido, obtidas com o sistema de aquisição de dados.

O procedimento experimental foi o mesmo utilizado nos 2 primeiros ensaios, ou seja, utilizou-se um volume de meio de 4,5 L (4,0 L de meio de produção e 0,45 L de inóculo), sendo retiradas amostras em intervalos regulares de 2 horas no início e aproximadamente 4 horas após 12 horas de corrida. Para essas amostras foram realizadas análises de concentração de lactose, biomassa, concentrações de proteínas (Método de Lowry e Bradford) e atividade enzimática.

Tabela 4.37. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado a 20% de oxigênio dissolvido nas primeiras 12 horas e depois controlado em 10%, ausência de controle de pH e adição de AFA no início do cultivo. Ensaio 3

T (horas)	pH	Cx (g/L)	A.E (UI/L)	A.Esp. (UI/ g células)	Proteínas (g/L) Lowry	Proteínas (g/L) Bradford	Lactose (g/L)
Pré-inóculo		7,0	-	-	39,0	0,53	7,0
Inóculo	8,5	6,8	-	-	36,2	0,34	6,2
0	7,8	0,7	-	-	48,6	0,84	15,5
2	7,7	0,6	-	-	49,2	0,83	15,6
4	7,8	1,4	-	-	47,2	0,86	15,8
6	7,7	2,9	-	-	45,3	0,86	15,6
8	7,7	5,0	-	-	44,4	0,90	15,8
10	8,0	6,3	-	-	43,0	0,94	14,8
12	8,2	7,8	47	6,0	39,8	0,93	15,1
17	8,7	8,5	49	5,8	37,7	1,01	14,6
20	8,7	8,4	47	5,6	38,5	1,00	14,9
24	8,8	7,1	53	7,5	38,0	1,02	14,8
28	8,8	6,9	54	7,8	38,7	1,08	14,6
31	8,9	7,6	56	7,4	38,0	1,00	14,8
36	8,9	7,5	53	7,1	38,5	1,00	14,8
47	9,1	7,2	47	6,5	38,0	1,04	14,6
51	9,1	7,4	41	5,5	37,8	1,00	14,6

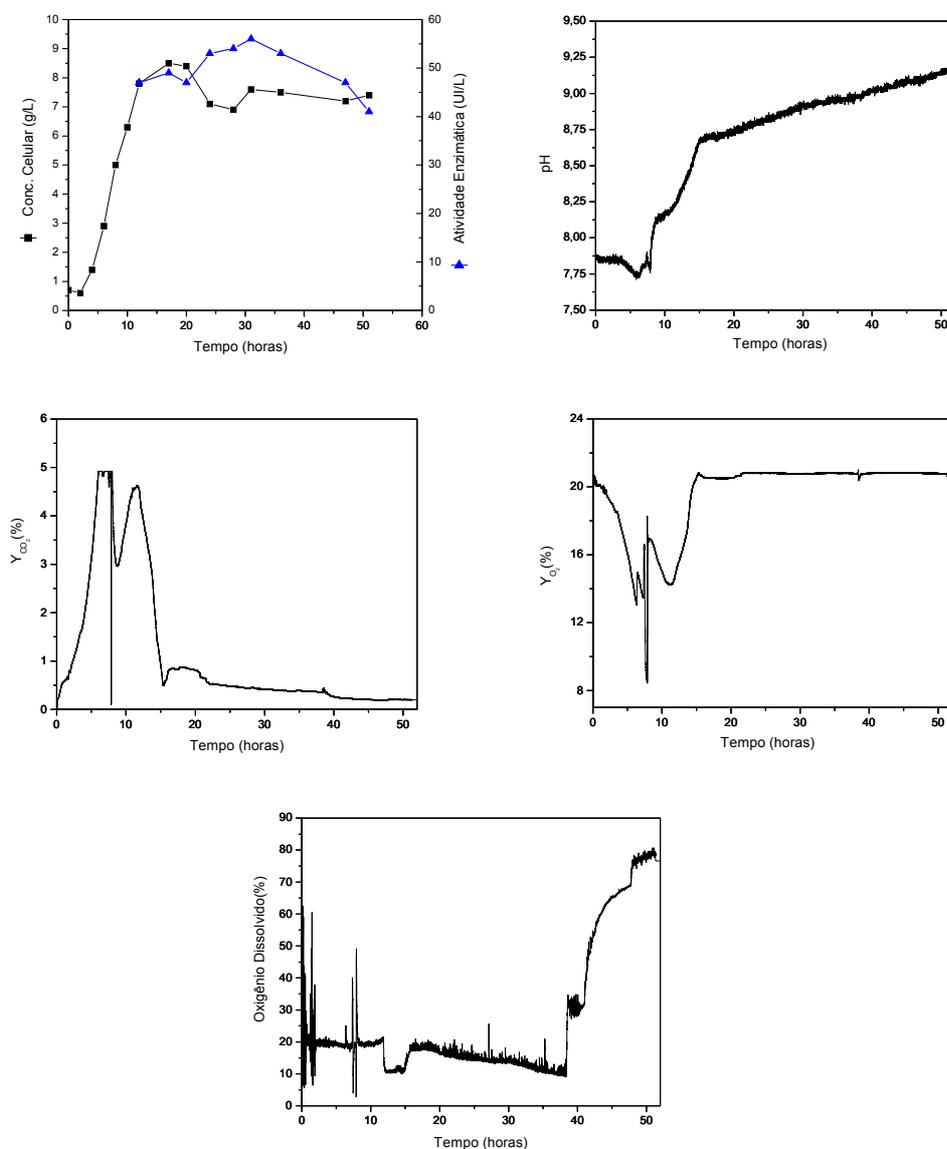


Figura 4.11. Resultados experimentais do terceiro ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO<sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O<sub>2</sub>, (E) concentração do oxigênio dissolvido, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

Nesse ensaio, onde a concentração do oxigênio dissolvido foi mantida inicialmente em torno de 20%, não se percebeu uma fase estacionária como ocorreu no segundo ensaio (aproximadamente 12 horas), observando-se o crescimento exponencial do microrganismo desde o início. No entanto, o nível de PGA encontrado foi praticamente o mesmo do segundo ensaio, diferenciando-se

apenas na velocidade de produção da enzima. No terceiro ensaio a enzima produzida já atingiu seu patamar (em torno de 50 UI/L) nas primeiras 12 horas, enquanto que no outro ensaio esse mesmo patamar só foi atingido em torno de 17 horas. Esse resultado é coerente devido a provável limitação do crescimento do microrganismo ocasionado pelo oxigênio dissolvido no ensaio anterior. Em ambos os casos após atingir esse nível de PGA não houve aumento na produção da enzima.

Apesar desses resultados obtidos em biorreator serem menores que os obtidos em “shaker”, utilizando-se microrganismo proveniente da 3ª batelada de criotubos (Tabela 4.19 – ensaio 44), existe um comportamento semelhante entre ambos. Quando o cultivo do microrganismo é realizado em “shaker” pode-se observar que também não há aumento expressivo da produção de enzimas após 24 horas de cultivo. Esses resultados levam a crer que a produção da enzima continua limitada por algum nutriente, e que este poderia ser algum(s) peptídeo(s). Passou-se, por isso, a se investigar em HPLC o consumo dos peptídeos ao longo do tempo.

Antes de analisar as amostras provenientes do cultivo de *B. megaterium*, analisaram-se primeiro os nutrientes (caseína hidrolisada, soro de queijo e soro de queijo + ácido fenil acético) para verificar o tempo de retenção de cada um e se haveria alguma interferência dos mesmos. Os cromatogramas são apresentados abaixo. No cromatograma da caseína (Figura 4.12) incluiu-se 4 peptídeos de peso molecular conhecidos para dar uma noção em que faixa de peso molecular se encontram os peptídeos resultantes da hidrólise de caseína com alcalase®. Posteriormente analisaram-se as amostras oriundas do terceiro ensaio e plotaram-se 3 tempos (0, 10 e 20 horas) para mostrar o comportamento do consumo dos nutrientes ao longo do cultivo. Conforme se pode observar no cromatograma (Figura 4.15) houve consumo dos peptídeos abaixo de 1600 e acima de 500 de peso molecular. Esse consumo de peptídeos nessa faixa nos induziu a relacionar a produção da enzima ao consumo de uma faixa específica de peso molecular de peptídeos. Essa foi uma fase confusa do trabalho. A análise de peptídeos é complicada e a separação das faixas não é completamente associada ao tamanho do peptídeo. Devido à interação de alguns aminoácidos com a coluna ocorre

também saída de alguns deles na faixa de 600 de peso molecular. Por outro lado aminoácidos presentes que não absorvem no UV não são detectados, uma vez que o método usa detecção por absorção de luz ultravioleta. Foi desenvolvida no grupo metodologia para cálculo da concentração de peptídeos por faixa de peso molecular, mas sempre ocorre alguma indefinição. Aparentemente não havia consumo, ao longo do tempo de cultivo, do substrato na faixa de peso molecular correspondente aos aminoácidos (últimos picos do cromatograma), mas de fato o que poderia estar ocorrendo era a hidrólise dos peptídeos maiores e consumo dos aminoácidos e di'-tripeptídeos resultantes, coincidindo com aparente não consumo dessa faixa menor. De todo modo aparentemente não havia consumo de aminoácidos e sim apenas de uma determinada faixa peptídeos. Essa hipótese era reforçada pelos ensaios em shaker com meio sintético onde nem germinação ocorria na presença de aminoácidos. Assim, passou-se a investigar em shaker a influência da composição de peptídeos nos hidrolisados, seja usando diferentes proteases para hidrólise de caseína, seja alterando a fonte protéica (soro de queijo, peptona e triptona). Os resultados desse estudo, apresentados no item 4.1.3.4.2, não mostraram correlação entre composição de peptídeos e produção da enzima.

Também se pode observar uma exaustão do ácido fenil acético ( $t_{\text{retenção}} = 76\text{min}$ ) já nas primeiras 10 horas de cultivo, indicando uma possível limitação da produção da enzima pelo seu indutor.

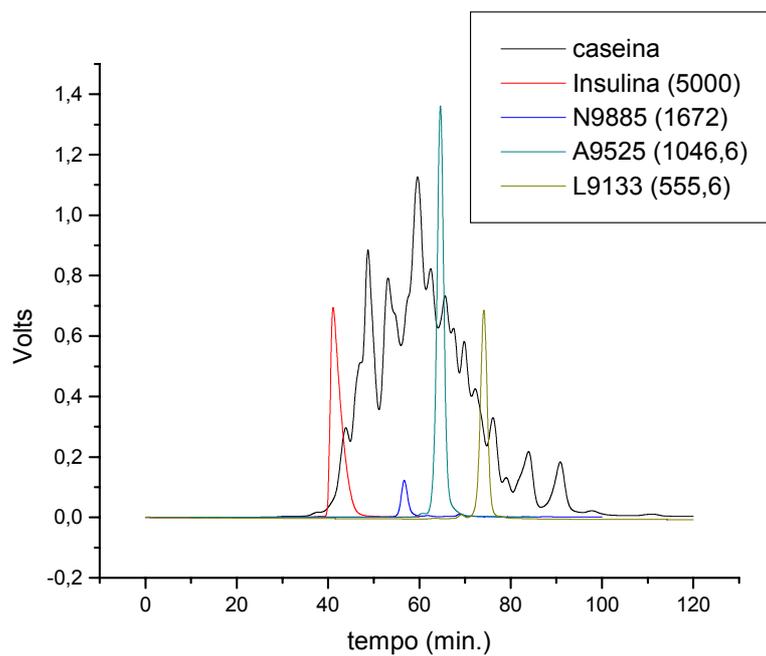


Figura 4.12 - Cromatograma da caseína hidrolisada com alcalase<sup>®</sup> e quatro peptídeos de peso molecular conhecidos

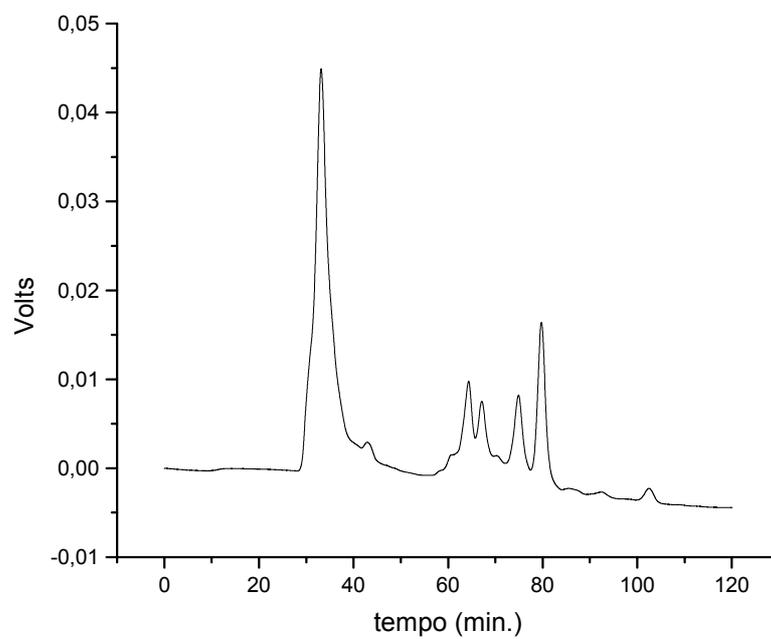


Figura 4.13 – Cromatograma do soro de queijo

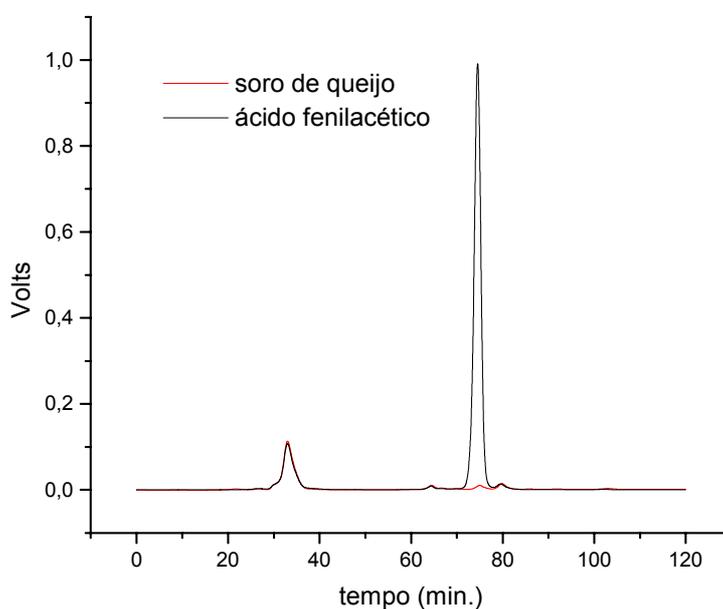


Figura 4.14 – Cromatograma do soro de queijo e do ácido fenil acético

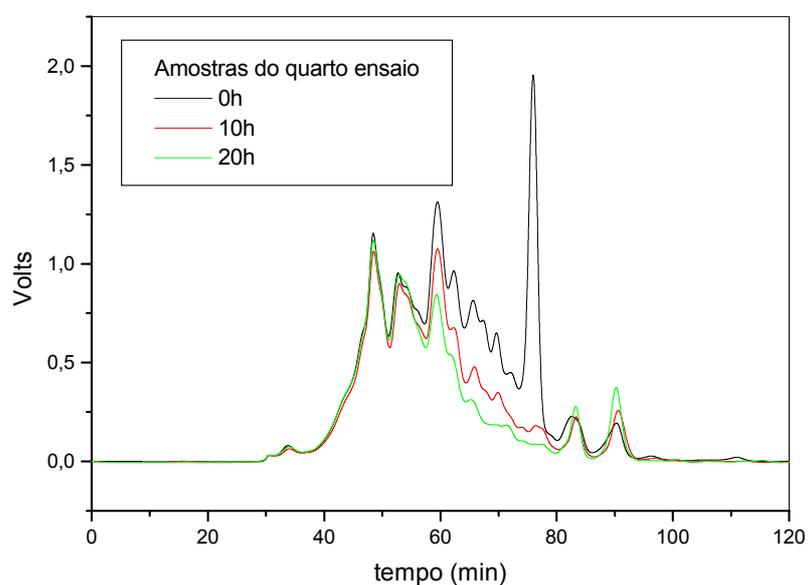


Figura 4.15. Cromatograma de amostras de cultivo do *B. megaterium*

Esse resultado obtido em relação ao rápido consumo do ácido fenil acético faz com que seja necessário estudar estratégias de adição do ácido durante o cultivo de *B. megaterium*. Esse estudo deve ser realizado devido às implicações

que o ácido pode ocasionar, pois como já mencionado, este age como inibidor da produção da enzima se adicionado em altas concentrações, porém a baixas concentrações estimula o crescimento do microrganismo e a produção da enzima. Dessa maneira, o quarto ensaio foi realizado com a adição de AFA a partir de 8 horas de cultivo e será apresentado no item 4.2.3 juntamente com os outros ensaios de batelada alimentada.

A discussão sobre a variável oxigênio dissolvido será retomada no próximo item pois ela continuou a ser enfocada quando se estudou a influência do pH.

#### **4.2.2. Influência do pH (ensaios 5 e 6)**

O estudo da influência do pH na produção de PGA também era nosso objetivo. A intenção inicial no ensaio 5 era que todas as condições, exceto o controle de pH, fossem idênticas ao ensaio 4, mas isso não foi possível devido a problemas com o eletrodo de oxigênio dissolvido. Desta forma, fixamos a agitação em torno 450 rpm nas primeiras 8 horas e depois em 600 rpm (valores obtidos da média do ensaio 4) e controlamos o pH do caldo de cultivo em 8. Os resultados são apresentados na Tabela 4.38 e nas Figuras 4.16 e 4.17. A Figura 4.16 mostra os resultados da concentração celular e atividade enzimática obtidas após análise de laboratório, além dos valores das variáveis pH e fração molar dos gases de saída obtidos com o sistema de aquisição de dados. Na Figura 4.17 tem-se o acompanhamento do consumo do ácido fenil acético ao longo do quinto cultivo do *B. megaterium*.

Tabela 4.38. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado a 450 rpm nas primeiras 8 horas e depois em 600 rpm, controle de pH em 8 e adição de AFA no início do cultivo. Ensaio 5

T (horas)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	A. E. (UI/L)	A.Esp. (UI / g células)	Proteínas (g/L) Lowry	Lactose (g/L)
Pré-inóculo	-	6,8	-	-		
Inóculo	-	6,5	-	-	33,7	6,1
0	7,9	0,6	-	-	47,5	14,9
2	8,0	1,0	-	-	47,6	14,6
4	8,0	1,6	-	-	46,9	14,4
6	8,0	2,3	-	-	47,1	14,3
8	8,1	3,3	56	17,0	47,4	14,4
10	8,1	4,8	73	15,2	43,8	13,6
14	8,2	6,8	95	14,0	42,4	13,4
16	8,2	7,2	62	8,6	39,5	13,6
20	8,1	8,2	60	7,3	37,7	13,6
24	8,1	8,8	46	5,2	31,6	13,6
28	8,1	8,3	50	6,0	29,1	13,5
32	8,1	8,3	42	5,1	29,4	13,3
36	7,5	8,1	31	3,8	28,7	13,5
43	7,6	7,9	33	4,2	28,6	13,2
48	7,6	7,1	33	4,6	28,1	13,4

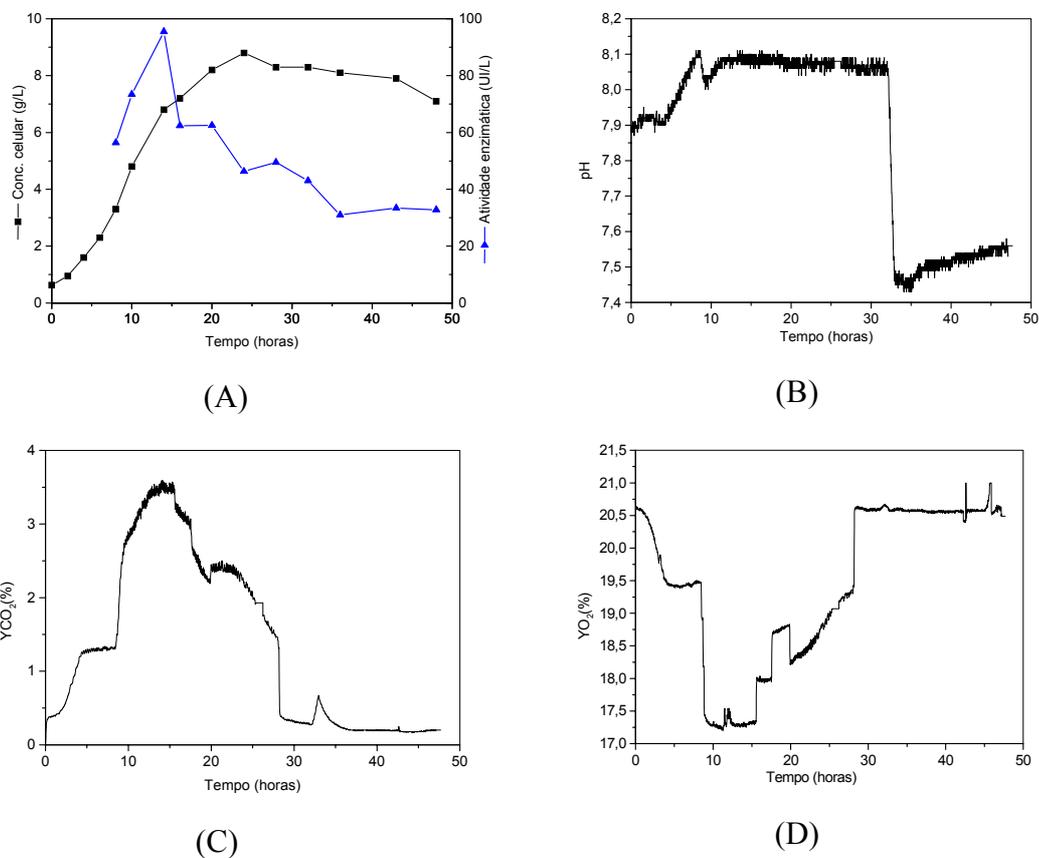


Figura 4.16: Resultados experimentais do quinto ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO<sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O<sub>2</sub>, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

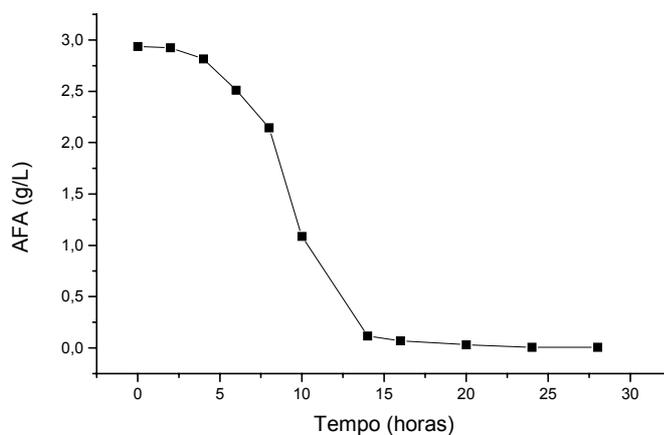


Figura 4.17. Acompanhamento do consumo do ácido fenil acético ao longo do quinto cultivo

Neste ensaio é possível verificar a influência tanto do oxigênio dissolvido como do pH. Nas primeiras horas o pH do caldo foi igual aos demais ensaios, não necessitando da adição de HCl até o tempo de aproximadamente 10h, portanto inicialmente podemos dizer que temos só a influência do oxigênio. Como podemos observar na Tabela 4.38 e na Figura 4.16(A), este ensaio, em 14 horas de cultivo, resultou na mais alta atividade enzimática encontrada até o momento. Este resultado provavelmente está relacionado com a quantidade de oxigênio dissolvido no meio. Nos ensaios 3 e 4 a agitação atingiu até 600 rpm para manter os 20% de saturação de oxigênio dissolvido, já neste ensaio (quinto) iniciou-se o processo com 450 rpm e só mudou-se para 600 rpm após 8 horas de cultivo, pois observou-se uma estagnação de CO<sub>2</sub>. Estes valores de agitação podem ter limitado o oxigênio dissolvido favorecendo a produção de PGA, que atingiu 95UI/L em 14 horas de processo. Há que se salientar aqui que quando se utilizou uma agitação de 300 rpm (2º ensaio) o crescimento do microrganismo foi muito limitado pelo oxigênio dissolvido, não se observando nenhum aumento da massa celular até o momento em que se resolveu aumentar a agitação. Esses dados indicam, portanto, que a concentração ideal de oxigênio é aquela obtida para uma agitação entre 450 rpm e 600 rpm, que correspondem a valores próximos de 20% da saturação.

Embora tenhamos atingido a mais alta concentração enzimática, observou-se também um alto decréscimo da atividade enzimática após atingir o pico. Em todos os outros ensaios realizados em biorreator ocorria uma pequena queda da atividade ao longo do processo, mas nenhum apresentou uma queda tão acentuada. Uma possível explicação seria a produção de proteases no meio de cultivo, que pode estar relacionada com o menor pH do meio neste ensaio (pH 8 após 10 horas). Assim nesse ensaio teriam sido oferecidas melhores condições ou para a produção de proteases ou para a hidrólise de PGA por proteases produzidas pelo microrganismo.

Após 30 horas de cultivo resolveu-se alterar o controle do pH para 7,5, pois não vínhamos notando nenhuma diferença no metabolismo do microrganismo. Não foi detectada nenhuma alteração no metabolismo quando se aplicou essa mudança.

O fato de termos obtido um aumento da produção nos motivou a realizar o sexto ensaio reproduzindo todas as condições utilizadas no anterior. Essa reprodução nos permitiria desta vez acompanhar o oxigênio dissolvido ao longo do cultivo, o que não foi possível anteriormente devido a problemas com o sensor, e também verificar se ocorreria novamente a queda brusca na atividade devido ao controle de pH. Os resultados são apresentados na Tabela 4.39 e na Figura 4.18

Tabela 4.39. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado a 450 rpm nas primeiras 8 horas e depois em 600 rpm, controle de pH em 8 e adição de AFA no início do cultivo. Ensaio 6

Tempo (h)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	A.E (UI/L)	A. Esp. (UI/ g células)	Proteínas Lowry (g/L)	Lactose (g/L)
Pré-inóculo	-	5,9	-	-	29,3	-
Inóculo	-	6,4	-	-	25,8	7,4
0	7,4	0,5	-	-	45,7	15,8
2	7,63	1,0	-	-	45,5	15,8
4	7,68	1,0	23	23,0	46,4	15,9
6	7,68	2,0	38	19,0	46,2	15,9
8	7,84	3,2	36	11,3	45,7	15,5
10	7,84	4,5	45	10,0	45,0	15,9
12	8,09	6,2	68	11,0	42,5	15,8
14	8,07	7,1	70	9,9	37,4	15,5
16	8,09	8,2	49	6,0	34,8	15,5
19	8,15	9,0	51	5,7	30,2	14,3
22	8,15	8,6	48	5,6	26,6	13,7
27	8,12	8,2	56	6,8	26,3	13,3
42	8,30	8,1	45	5,6	19,6	13,4

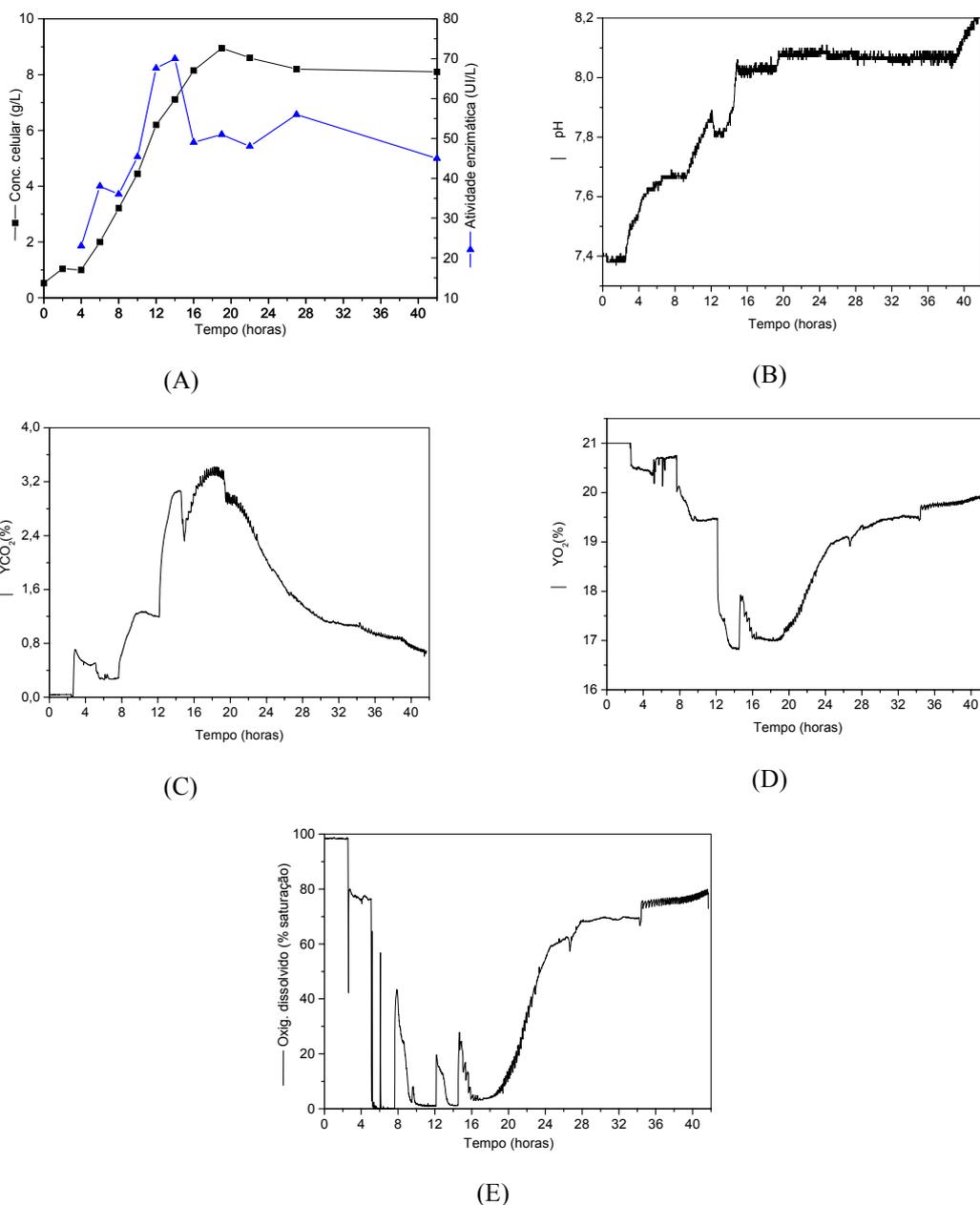


Figura 4.18: Resultados experimentais do sexto ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de  $CO_2$  nos gases de saída; (D) concentração de  $O_2$ , (E) concentração do oxigênio dissolvido, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

Neste ensaio, o oxigênio dissolvido caiu mais lentamente no início devido ao fato de ter sido fixado a agitação (fato também ocorrido no sexto ensaio). Um problema que ocorreu nesse ensaio foi a formação de espuma, sendo necessário

praticamente parar a agitação até que o problema fosse resolvido. Conseqüentemente, nesse período (4 – 8 horas) o oxigênio dissolvido também caiu muito. Essa queda provavelmente é que ocasionou a menor produção de PGA. O declínio acentuado de atividade também foi verificado nesse ensaio, como no ensaio anterior. Portanto, concluímos que o controle do pH, neste valor escolhido, não é adequado para a produção de PGA. Hojo, 1997, também verificou que o controle de pH em um valor fixo não era uma boa estratégia para se ter uma boa produção de enzima.

### **4.2.3. Influência de diferentes estratégias de alimentação (ensaios 4,7,8,9 e 10)**

Nos intervalos desses ensaios em biorreator foram realizados os ensaios em shaker, com o objetivo de se estudar os requerimentos nutricionais do *B. megaterium* que conduziram a uma melhor produção de PGA. O grande número de variáveis estudado nos permitiu descobrir que o crescimento do microrganismo consumindo uma solução de aminoácidos em torno de 10 g/L ao invés de hidrolisado enzimático de caseína, na presença de soro de queijo, de 0,4 g/L de sais e de 2,7 g/L de AFA, nos permite atingir em torno de 200 UI/L de PGA, nível nunca atingido até então. Portanto, esse meio passou a ser o nosso padrão. Foi assim realizado o sétimo ensaio para teste desse novo meio em biorreator. Antes da apresentação desse ensaio serão discutidos os resultados obtidos no ensaio 4, onde continuou-se a utilizar caseína hidrolisada no meio porém com alimentação de AFA.

Conforme verificado no item 4.2.1., o ácido fenil acético é consumido rapidamente pelo microrganismo. Esse resultado juntamente com os já obtidos anteriormente (item 4.1.3.4.4.), onde se verificou que este nutriente age como inibidor da produção da enzima se adicionado em altas concentrações, fez com que realizássemos um ensaio com alimentação de AFA mas somente a partir de 8 horas de cultivo. Nesse tempo (8 horas) o AFA adicionado inicialmente já se encontra praticamente esgotado, não ocasionando inibição por altas concentrações. A velocidade de alimentação foi de 0,33 mL/min de uma solução

0,1 M (5x mais concentrada que o utilizado no início). O volume adicionado até 48 horas de cultivo foi de aproximadamente 800 mL. O AFA não foi adicionado até o final do processo (52 horas), pois não se observou nenhuma melhora na produção de PGA.

O modo como se procedeu ao ensaio, os meios utilizados e as condições operacionais foram as mesmas do ensaio 3, exceto pelo fato de que se optou por controlar o oxigênio dissolvido em 20% durante todo cultivo. Essa escolha foi feita devido ao problema ocorrido no terceiro ensaio, onde, após 12 horas de cultivo, a concentração de oxigênio foi controlada em 10% da saturação. Contudo, observou-se acentuado declínio do metabolismo do microrganismo, que foi atribuído à exaustão de algum nutriente limitante. Uma vez que se observou alta velocidade de consumo do AFA, esse era um provável candidato, decidindo-se por isso alimentá-lo após 8 horas de cultivo. Para não se correr o risco de então vir a ocorrer limitação por oxigênio já que o nutriente limitante seria alimentado, decidiu-se manter a concentração de O<sub>2</sub> em 20% durante todo o cultivo.

Apesar da alimentação do AFA no quarto ensaio, este também apresentou o mesmo problema descrito acima, observando-se um grande aumento do oxigênio dissolvido ao longo do cultivo, em consequência do declínio do metabolismo celular (Figura 4.19 E).

Os resultados referentes a esse ensaio são apresentados na Tabela 4.40 e nas Figuras 4.19 e 4.20. A Figura 4.19 mostra os resultados da concentração celular e atividade enzimática obtidas após análises de laboratório, além dos valores das variáveis pH, fração molar dos gases de saída e oxigênio dissolvido, obtidas com o sistema de aquisição de dados. Na Figura 4.20 tem-se o comportamento do ácido fenil acético ao longo do cultivo.

Tabela 4.40. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado em 20% de oxigênio em todo o cultivo, ausência de controle de pH, adição de AFA no início do cultivo e alimentação de AFA. Início e término da alimentação = 8 e 48 horas. Ensaio 4

t (horas)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	A. E. (UI/L)	A. Esp. (UI/ g células)	Proteínas (g/L) Lowry	Proteínas (g/L) Bradford	Lactose (g/L)
Pré Inóculo	-	7,2	-	-			
Inóculo	-	6,3	-	-	32,3	0,5	6,0
0	7,7	0,3	-	-	45,1	0,9	13,9
2	7,8	1,0	-	-	45,6	0,9	13,7
4	7,9	1,7	-	-	44,5	1,0	13,3
6	7,8	3,5	-	-	42,1	1,0	13,7
8	8,1	5,8	30	5,2	41,2	1,0	13,7
10	8,2	6,5	48	7,4	37,7	1,0	13,8
12	8,3	7,7	47	6,1	35,3	1,0	13,7
16	8,6	7,8	56	7,2	31,5	1,1	13,1
20	8,9	7,3	41	5,6	29,5	1,0	13,5
24	8,9	6,8	57	8,4	29,7	1,0	13,2
28	8,9	6,4	48	7,5	29,7	1,1	12,7
32	9,0	6,6	-	-	29,2	1,1	12,9
36	9,0	6,7	57	8,5	29,4	1,1	12,8
48	9,1	5,2	43	8,3	27,9	1,1	12,8
52	9,1	5,1	49	9,6	27,7	1,1	12,6

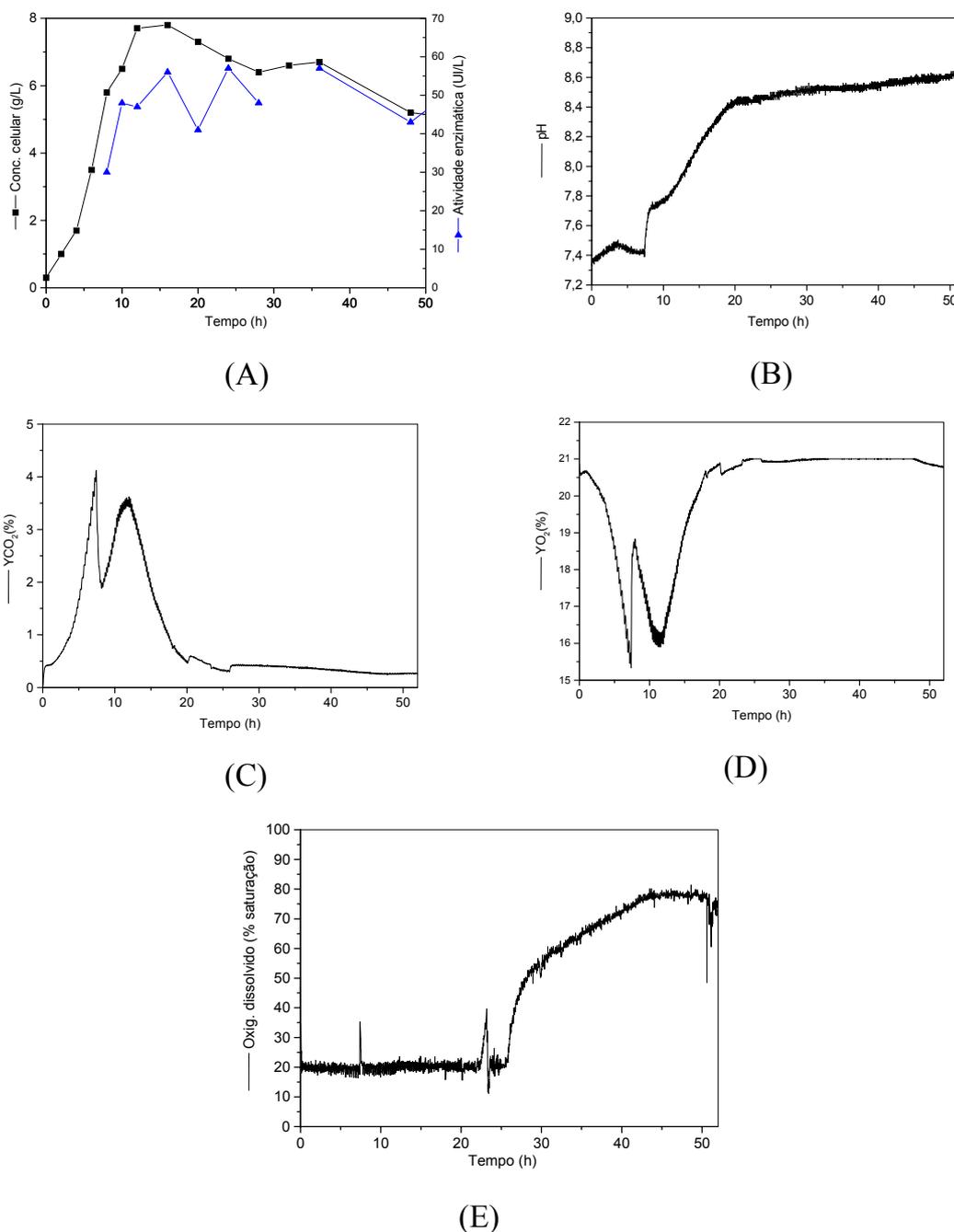


Figura 4.19: Resultados experimentais do quarto ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de  $CO_2$  nos gases de saída; (D) concentração de  $O_2$ , (E) concentração do oxigênio dissolvido, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

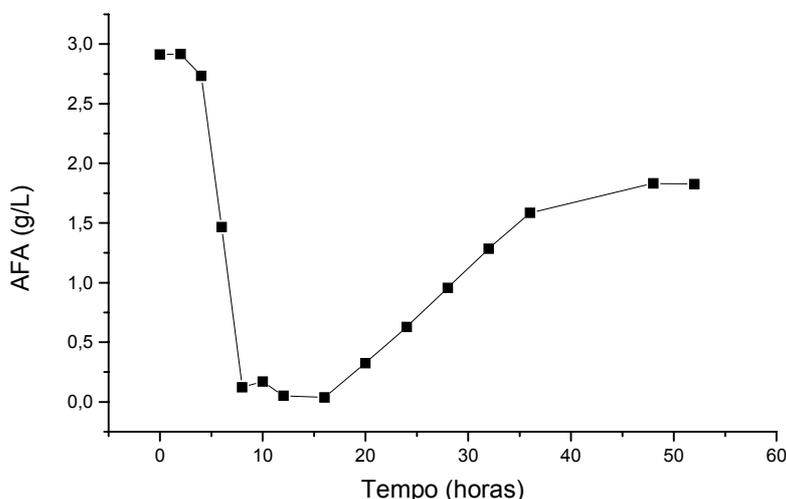


Figura 4.20. Comportamento da concentração de AFA no quarto ensaio de cultivo do *B. megaterium*

Cabe observar que o aumento na concentração de AFA no decorrer do ensaio (Figura 4.20) não resultou em melhores níveis de atividade e massa celular, apresentando comportamento semelhante ao terceiro ensaio em relação a todas as variáveis.

Juntamente com esse ensaio foi feito um cultivo em shaker utilizando os mesmos meios para verificar se a capacidade produtiva do microrganismo tinha decaído. Os resultados obtidos em shaker mostraram que o nível de atividade enzimática obtida se manteve constante (102 UI/L), indicando que os baixos níveis encontrados no biorreator não é devido ao microrganismo, mas pode estar relacionado à exaustão de algum nutriente e/ou as condições operacionais utilizadas. De qualquer maneira, este foi o único ensaio batelada alimentada utilizado-se o meio contendo caseína hidrolisada. Conforme explicado no início desse item, no decorrer dos ensaios em biorreator foram realizados em paralelo os ensaios em shaker com o objetivo de se estudar os requerimentos nutricionais do *B. megaterium*. Esse estudo nos mostrou que o microrganismo quando cultivado em um meio com concentrações baixas de aminoácidos (10 g/L) e na presença de soro de queijo produz em torno de 200 UI/L de PGA, nível nunca atingido até

então. Portanto, esse meio passou a ser o nosso padrão (PA10). O ensaio apresentado a seguir (sétimo) foi realizado sem alimentação de nutrientes pois tinha-se o objetivo somente de estudar o comportamento do microrganismo nesse meio quando cultivado em biorreator operando com as condições operacionais do ensaio 4 , ou seja, sem controle de pH, o oxigênio dissolvido em torno de 20% da saturação e aeração de 4 L/min. Com essas condições a única diferença seria os componentes do meio. Os resultados obtidos nesse ensaio são apresentados na Tabela 4.41 e na Figura 4.21.

Paralelamente a este ensaio foi realizado um ensaio em shaker para verificar se haveria diferença na produção de PGA quando o microrganismo é cultivado no biorreator ou no shaker. Esse ensaio em paralelo tornou-se necessário, uma vez que foram observadas algumas oscilações nas atividades para lotes diferentes da mesma solução de aminoácidos. Portanto, esse ensaio em shaker é um controle para sabermos qual o nível máximo de atividade atingida utilizando a mesma solução de aminoácidos (até agora a atividade enzimática atingida no shaker tem sido sempre maior que no biorreator). Os resultados são apresentados na Tabela 4.42.

Tabela 4.41 Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado em 20% de oxigênio em todo o cultivo, ausência de controle de pH , adição de AFA no início do cultivo e uso dos novos meios padrões (GA8 e PA10). Ensaio 7

Tempo (h)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	A.E (UI/L)	A. Esp. (UI / g células)	Lactose (DNS – g/L)	a.a. (g/L)	AFA (g/L)
Pré-Inóculo	-	5,0	-	-	4,9	-	-
Inóculo	-	3,3	-	-	5,0	-	-
0	7,9	0,2	-	-	14,3	10,4	2,8
2	8,0	0,2	-	-	14,0	9,4	2,8
4	7,9	0,6	14	23,3	14,3	10,2	2,6
6	8,0	1,8	19	10,6	14,0	6,2	2,4
8	8,1	2,8	61	21,8	14,0	4,1	1,8
10	8,2	3,5	127	36,3	14,1	3,1	0,9
13	8,5	4,3	175	40,7	13,9	1,3	0
17	8,7	4,1	159	38,8	13,5	0,7	0
20	8,8	4,2	164	39,0	14,2	0,7	0
24	8,9	4,2	155	36,9	14,3	0,6	0
28	9,1	4,1	166	40,5	14,2	0,5	0
37	9,2	3,7	147	39,7	14,5	0,3	0
41	9,2	3,5	157	44,9	14,5	0,3	0

Tabela 4.42. Resultados obtidos na produção de PGA em shaker realizado em paralelo com o biorreator - uso dos mesmos meios (GA8 e PA10).

Tempo (h)	PH	C <sub>x</sub> (g/L)	Atividade enzimática (UI/L)	A. Esp. (UI/g células)	Lactose (g/L)
Pré-inóculo	-	5,0	-	-	-
Inóculo	8,1	3,3	-	-	-
0	7,8	0,4	-	-	11,0
10	8,1	2,6	42	16,2	11,6
24	8,4	3,5	171	48,9	11,5
37	8,9	4,0	179	44,8	11,3

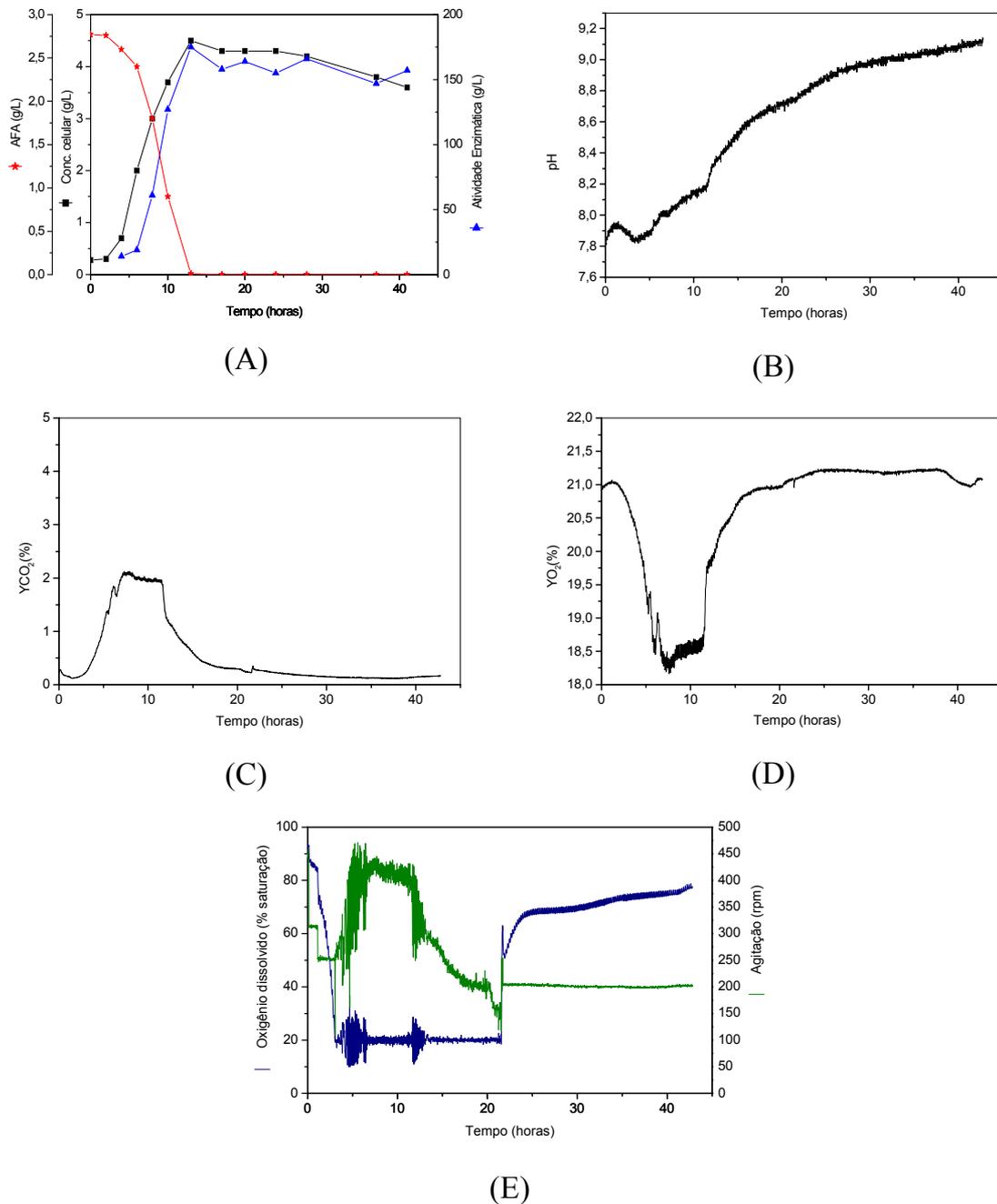


Figura 4.21: Resultados experimentais do sétimo ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular, AFA e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de  $CO_2$  nos gases de saída; (D) concentração de  $O_2$ , (E) concentração do oxigênio dissolvido, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

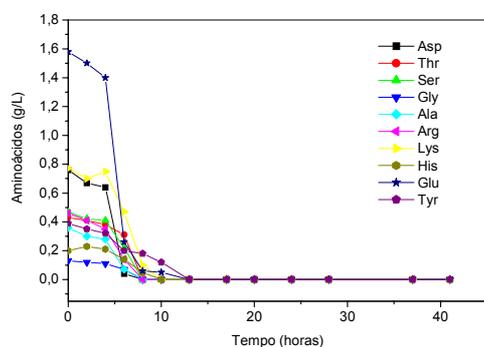
Os resultados obtidos nesse ensaio foram bastante satisfatórios. Os níveis de atividade encontrados em ambos os ensaios (shaker e biorreator) foram semelhantes, diferenciando-se apenas na velocidade de produção da enzima. A máxima produção de enzima (175 UI/L) no biorreator foi atingida em 13 horas enquanto que no shaker a mesma produção foi provavelmente alcançada em torno de 24 horas de cultivo. Esse resultado é coerente devido à provável limitação do crescimento do microrganismo ocasionado pelo oxigênio dissolvido fornecido em shaker.

Pode-se observar na Tabela 4.41 que após a enzima produzida atingir seu patamar (175 UI/L) houve um pequeno decréscimo da mesma. Esse fato ocorreu em todas os ensaios realizados em shaker (ensaios 72 a 97) que utilizaram 10 g/L de aminoácidos. No ensaio que foi realizado em paralelo não observamos esse comportamento devido provavelmente ao tempo de retirada de amostra –37 horas, sendo que em todos os demais ensaios essa retirada de amostra era após 48 horas de cultivo.

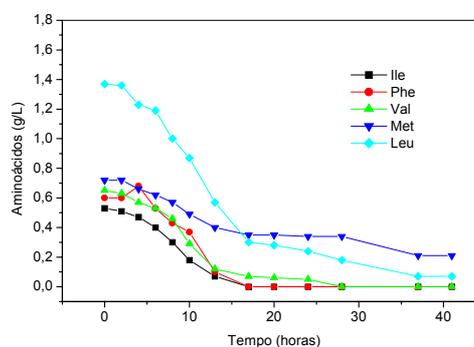
Em relação ao consumo dos nutrientes, na Tabela 4.41 é apresentado o consumo dos aminoácidos totais ao longo do cultivo do *B. megaterium* de modo a dar uma visão geral da concentração dos mesmos, agora na Tabela 4.43 tem-se o consumo individual de cada aminoácido. Esta análise nos permite saber quais os aminoácidos preferenciais do microrganismo bem como a velocidade de consumo dos mesmos. Os aminoácidos cistina e triptofano não foram possíveis de quantificar devido a baixa concentração utilizada dos mesmos. A Figura 4.22 mostra os aminoácidos consumidos mais rapidamente e os consumidos mais lentamente.

Tabela 4.43. Consumo dos aminoácidos em g/L ao longo do ensaio 7

	0h	2h	4h	6h	8h	10h	13h	17h	24h	28h	37h	41h
Asp	0,76	0,67	0,64	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0
Thr	0,43	0,41	0,38	0,31	0	0	0	0	0	0	0	0
Ser	0,47	0,42	0,41	0,22	0	0	0	0	0	0	0	0
Glu	1,58	1,5	1,4	0,26	0,06	0,05	0	0	0	0	0	0
Pro	1,1	1,1	1,1	1,04	0,93	0,73	-	-	-	-	-	-
Gly	0,13	0,12	0,11	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0
Ala	0,36	0,3	0,28	0,07	0	0	0	0	0	0	0	0
Val	0,65	0,63	0,57	0,53	0,46	0,29	0,12	0,07	0,05	0	0	0
Met	0,72	0,72	0,66	0,62	0,57	0,49	0,4	0,35	0,34	0,34	0,21	0,21
Ile	0,53	0,51	0,47	0,4	0,3	0,18	0,07	0	0	0	0	0
Leu	1,37	1,36	1,23	1,19	1,0	0,87	0,57	0,3	0,24	0,18	0,07	0,07
Tyr	0,39	0,35	0,32	0,2	0,18	0,12	0	0	0	0	0	0
Phe	0,6	0,6	0,68	0,53	0,43	0,37	0,1	0	0	0	0	0
His	0,2	0,23	0,21	0,14	0,05	0	0	0	0	0	0	0
Lys	0,77	0,7	0,75	0,47	0,1	0	0	0	0	0	0	0
Arg	0,46	0,41	0,35	0,14	0	0	0	0	0	0	0	0
CyS	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trp	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



(A)



(B)

Figura 4.22. (A): Aminoácidos consumidos mais rapidamente; (B) Aminoácidos consumidos mais lentamente

Quanto ao ácido fenil acético, o seu comportamento é apresentado na Tabela 4.41 e na Figura 4.21 A. Conforme podemos observar na Figura 4.21A, a exaustão do AFA se dá em torno de 10 horas de cultivo do *B. megaterium*. Nesse tempo de cultivo também ocorre a exaustão dos aminoácidos consumidos preferencialmente e tanto a atividade enzimática como a concentração celular atingem uma estagnação nos seus valores. Esses resultados levam a crer que a fase de crescimento exponencial parou devido a falta de algum(s) nutriente(s) essencial no metabolismo do microrganismo. A alimentação de AFA no ensaio 4 não resultou em melhoras na produção de PGA e também é sabido que concentrações maiores de aminoácidos no início do processo causam inibição na produção da enzima, portanto, optou-se por realizar um ensaio (8ºensaio) com alimentação de aminoácidos a partir da 8ª hora de cultivo (concentração de a.a. já se encontra baixa no meio). A solução de alimentação foi a mesma do início e continha 40g/L de a.a. (de modo a manter a concentração no biorreator em 10 g/L). O volume total adicionado foi de 1000 mL a uma velocidade de alimentação de 1,76 mL/min.

Exceto a alimentação de aminoácidos, este ensaio mantém todas as condições utilizadas no 7º ensaio. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.44 e na Figura 4.23.

Tabela 4.44. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado em 20% de oxigênio em todo o cultivo, ausência de controle de pH , adição de AFA no início do cultivo e uso dos novos meios padrões (GA8 e PA10) com alimentação de aminoácidos. Início e término da alimentação = 8 e 17 horas.  
Ensaio 8

Tempo (h)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	A.E. (UI/L)	A. Esp. (UI/ g células)	Lactose (DNS- g/L)	a.a. (g/L)	AFA (g/L)
Pré-inóculo	8,4	5,3	-	-	4,7	-	-
Inóculo	-	-	-	-	-	-	-
0	7,7	0,2	-	-	14,3	11,1	3,2
2	8,0	0,3	-	-	14,9	11,5	2,6
4	8,0	0,9	14	15,6	14,9	10,6	2,5
6	8,2	2,2	25	11,4	14,6	6,5	2,2
8	8,2	3,3	75	22,7	14,0	4,7	1,6
10	8,4	4,1	136	33,2	13,9	3,6	0,5
12	8,4	4,2	166	39,5	13,2	2,3	0,3
16	8,7	3,9	207	53,1	13,3	5,2	0,1
20	8,8	3,9	203	52,1	13,4	4,8	0,1
24	8,9	3,5	210	60,0	12,9	4,2	0
30	9,0	3,5	212	60,6	13,5	4,1	0
34	9,1	3,4	221	65,0	13,2	3,3	0
46	9,2	3,3	205	62,1	13,6	3,6	0

Tabela 4.45. Resultados obtidos na produção de PGA em shaker realizado em paralelo com o biorreator - uso dos mesmos meios (GA8 e PA10) porém sem alimentação

Tempo (h)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	Atividade enzimática (UI/L)	A.Esp. (UI/ g células)	Lactose (g/L)
0	8,0	0,3	-	-	12,4
10	8,3	2,7	60	22,2	12,8
24	8,6	3,8	177	46,6	12,4
46	9,1	3,8	165	43,4	12,1

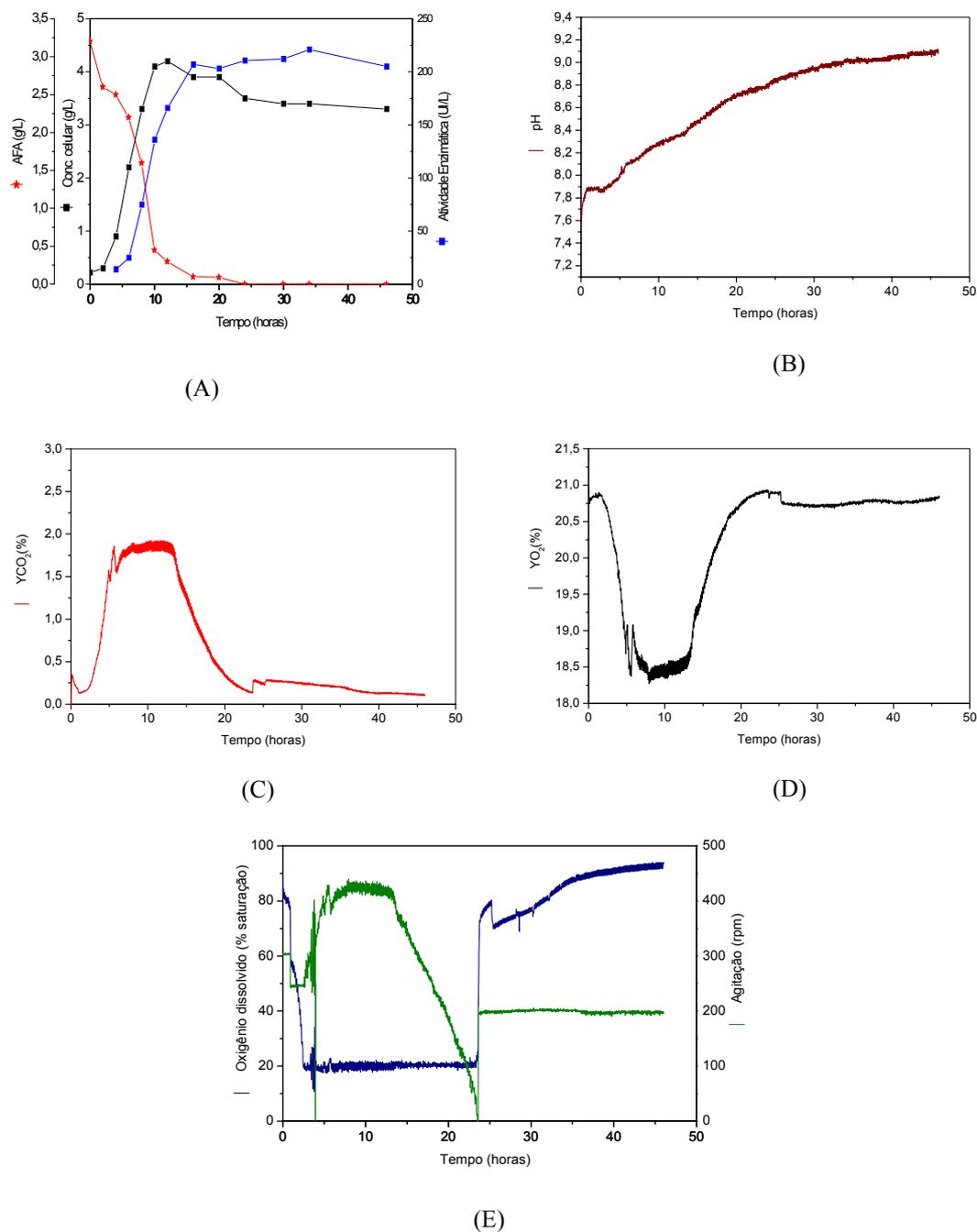


Figura 4.23: Resultados experimentais do oitavo ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular, atividade enzimática e AFA obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de  $CO_2$  nos gases de saída; (D) concentração de  $O_2$ , (E) concentração do oxigênio dissolvido e agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

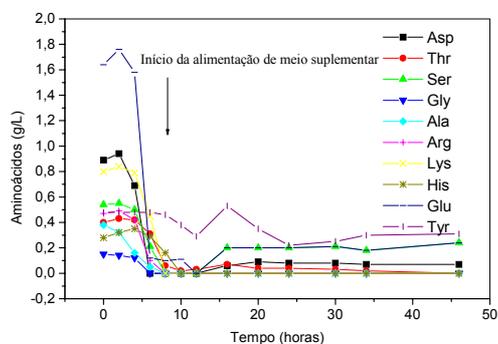
Da mesma forma que nos ensaios anteriores, foi realizado um ensaio em paralelo no shaker (Tabela 4.45). Este foi o primeiro ensaio realizado em biorreator que atingiu maiores níveis de atividade que o ensaio realizado em

shaker, embora a diferença seja muito pequena (220 UI/L para 177UI/L). Quanto as demais variáveis, o comportamento foi muito semelhante ao ensaio 7. O crescimento exponencial se deu nas primeiras 10 horas atingindo um valor de 2% de CO<sub>2</sub> (Figura 4.23 (C)), porém permanecendo mais tempo neste patamar. Ao longo do cultivo também foi necessário fixar a agitação em torno de 200 rpm (Figura 4.23 (E)), pois a agitação tinha parado para tentar manter o oxigênio dissolvido em 20% da saturação.

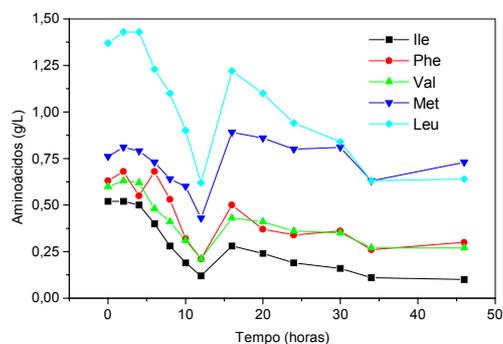
Em relação ao consumo dos aminoácidos ao longo tempo, o que podemos observar é que os a.a. que são consumidos preferencialmente continuam sendo consumidos rapidamente durante a alimentação, tendo pequeno acúmulo somente do ácido glutâmico e da tirosina. Com relação aos aminoácidos que são consumidos lentamente, estes acabam se acumulando no meio quando se realiza alimentação. Estes resultados podem ser observados na Tabela 4.46. e na Figura 4.24.

Tabela 4.46. Consumo dos aminoácidos em g/L ao longo do ensaio 8 (batelada alimentada)

	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	16h	24h	30h	34h	46h
Asp	0,94	0,89	0,69	0	0	0	0	0,06	0,08	0,08	0,07	0,07
Thr	0,43	0,42	0,4	0,31	0,06	0,02	0,03	0,07	0,04	0,03	0,02	0
Ser	0,55	0,54	0,5	0,21	0	0	0	0,02	0	0	0	0
Glu	1,76	1,64	1,58	0,12	0,10	0,11	0	0,20	0,20	0,21	0,18	0,24
Pro	1,24	1,22	1,19	0,94	0,95	0,78	0,39	1,0	1,0	1,0	0,87	0,92
Gly	0,15	0,14	0,12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ala	0,38	0,32	0,16	0,05	0	0	0	0	0	00	0	0
Val	0,63	0,62	0,6	0,48	0,41	0,31	0,20	0,43	0,36	0,35	0,27	0,27
Met	0,81	0,79	0,76	0,73	0,64	0,60	0,43	0,89	0,80	0,81	0,63	0,73
Ile	0,52	0,52	0,50	0,40	0,28	0,19	0,12	0,28	0,19	0,16	0,11	0,10
Leu	1,43	1,43	1,37	1,23	1,10	0,9	0,6	1,22	0,94	0,84	0,63	0,64
Tyr	0,48	0,48	0,48	0,48	0,46	0,38	0,30	0,53	0,22	0,25	0,30	0,31
Phe	0,68	0,68	0,63	0,55	0,53	0,32	0,21	0,50	0,34	0,36	0,26	0,30
His	0,35	0,32	0,29	0,28	0,16	0	0	0	0	0,05	0	0
Lys	0,84	0,80	0,79	0,45	0	0	0	0	0	0	0	0
Arg	0,49	0,47	0,42	0,10	0	0	0	0	0	0	0	0
CyS	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trp	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



(A)



(B)

Figura 4.24 (A): Aminoácidos consumidos mais rapidamente; (B) Aminoácidos consumidos mais lentamente

Por conta dos resultados obtidos na análise dos aminoácidos, onde teve acúmulo de alguns deles e o esgotamento de outros, decidiu-se por realizar um ensaio com as mesmas condições iniciais anteriores porém, a concentração dos aminoácidos do meio de alimentação foi baseada na velocidade de consumo de cada um deles. Este cálculo teve como referência o ensaio 8 e considerou-se a fase exponencial de crescimento (primeiras 10 horas). Os valores das concentrações para cada aminoácido estão apresentados na Tabela 4.47, tanto para o meio inicial como para o meio de alimentação.

Tabela 4.47. Concentração de aminoácidos no meio inicial e no meio de alimentação

Aminoácidos	Meio inicial (g/L)	Meio de alimentação (g/L)
Alanina	1,16	2,5
Ácido aspártico	2,53	7,17
Cistina	0,13	0,13
Glicina	0,44	1,07
Histidina HCl	0,98	0,6
Lisina HCl	3,02	3,0
Metionina	2,49	0,46
Fenilalanina	2,44	0,3
Prolina	4,3	2,15
Serina	2,5	2,7
Treonina	1,91	0,92
Tirosina	1,96	0,3
Triptofano	0,53	0,48
Valina	2,76	1,07
Arginina	1,64	3,1
Ácido glutâmico	4,47	12,4
Leucina	4,18	1,4
Isoleucina	2,13	0,92

Como podemos observar na Tabela 4.47 a concentração dos aminoácidos de alimentação variaram bastante da concentração do meio inicial. Além dessa diferença na concentração, no ensaio 9 iniciou-se a alimentação mais cedo que o ensaio 8 (a partir da 5ª hora). Escolheu-se essa hora para evitar o esgotamento de alguns aminoácidos, pois conforme podemos observar na Tabela 4.46 em 6 horas de cultivo o consumo dos aminoácidos já tinha sido bastante grande.

Um outro cuidado que se teve neste ensaio foi em relação a solução salina utilizada. Com a estratégia adotada da alimentação dos aminoácidos esperávamos uma alta concentração celular e conseqüentemente uma maior produção de enzima, e para que não ocorresse uma limitação do crescimento por algum nutriente que faz parte da solução salina resolveu-se dobrar a concentração dos sais. Estudos em shaker mostram que o aumento da concentração dos sais utilizados não causam nenhum efeito inibitório na produção de PGA.

Os resultados obtidos no 9º ensaio são apresentados na Tabela 4.48 e na Figura 4.25.

Tabela 4.48. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado em 20% de oxigênio em todo o cultivo, ausência de controle de pH, adição de AFA no início do cultivo e uso dos novos meios padrões (GA8 e PA10) com alimentação de aminoácidos (concentração baseada na velocidade de consumo). Início e término da alimentação = 5 e 14 horas. Ensaio 9

Tempo (h)	PH	C <sub>X</sub> (g/L)	A.E. (UI/L)	A. Esp. (UI / g células)	Lactose (DNS- g/L)	a.a (g/L)	AFA (g/L)
Pré-inóculo	-	-	-	-	-	-	-
Inóculo	8,5	3,1	-	-	5,8	-	-
0	7,8	0,3	-	-	15,6	10,4	2,8
2	8,0	0,3	-	-	15,5	10,1	2,7
4	8,1	0,8	22	27,5	14,5	7,9	2,4
6	8,2	1,8	22	12,2	14,5	6,3	2,5
8	8,4	2,7	41	15,2	13,7	6,0	2,3
10	8,5	3,3	130	39,4	13,5	4,9	1,8
12	8,6	3,2	137	42,8	13,0	4,3	1,7
16	8,8	3,6	191	53,1	13,0	3,7	0,9
21	9,0	3,9	175	44,9	13,0	4,1	0,4
25	9,2	3,6	153	42,5	13,1	3,2	0,3
38	9,5	3,8	171	45,0	13,3	2,7	0,3

Tabela 4.49. Resultados obtidos na produção de PGA em shaker realizado em paralelo com o biorreator - uso dos mesmos meios (GA8 e PA10) porém sem alimentação

Tempo (h)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	Atividade enzimática (UI/L)	A.Esp. (UI/ g células)	Lactose (g/L)
24	8,6	4,3	188	43,7	13,3
38	9,1	4,1	210	51,2	12,2

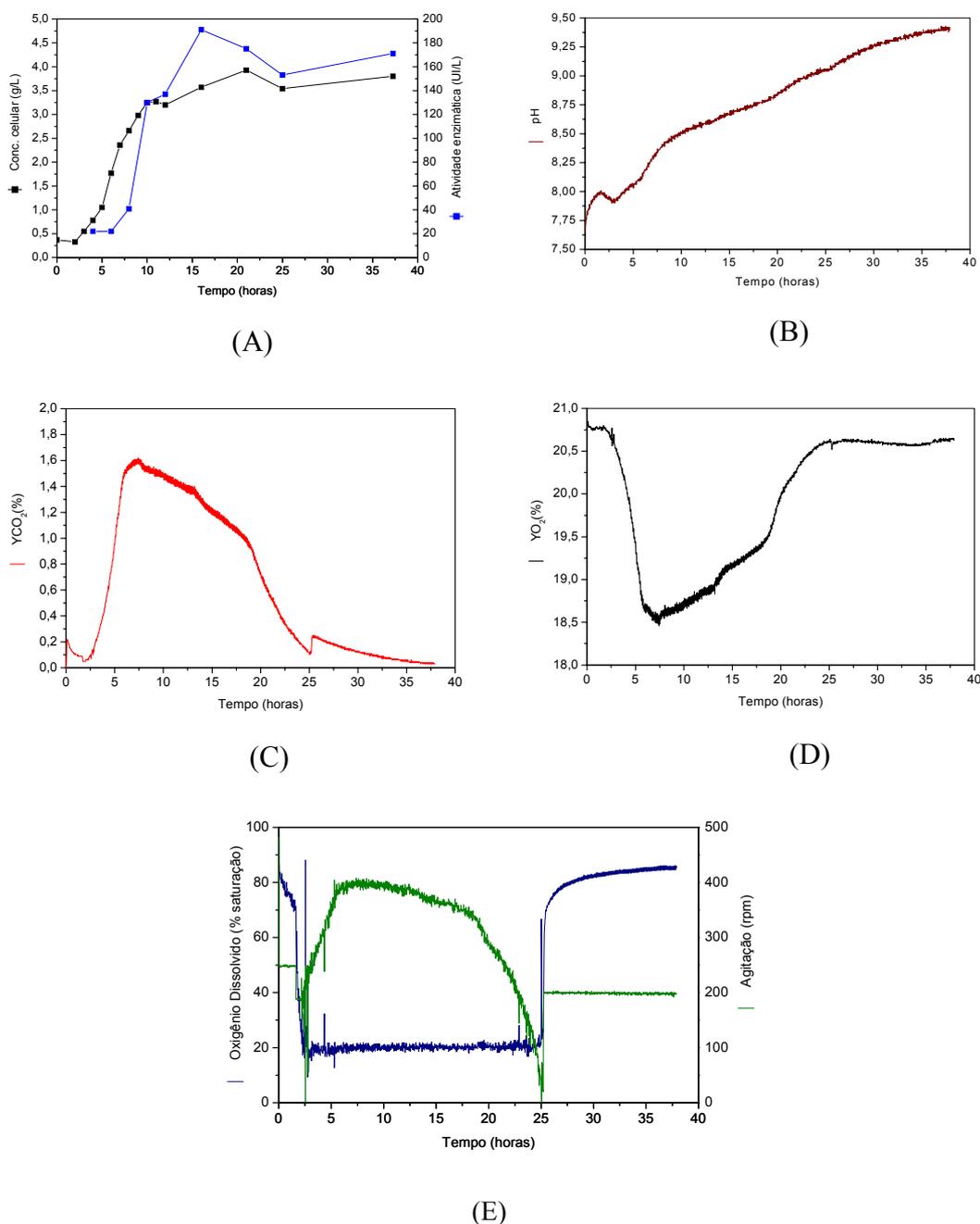


Figura 4.25: Resultados experimentais do nono ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO<sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O<sub>2</sub>, (E) concentração do oxigênio dissolvido e agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.

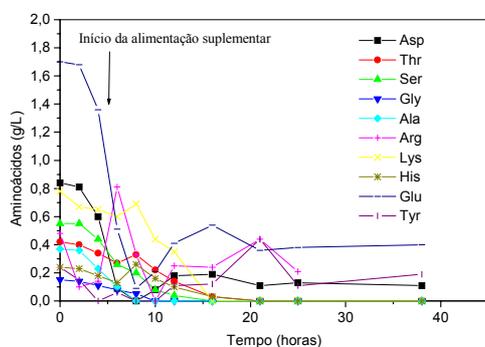
O que podemos observar é que o microrganismo não apresentou nenhuma melhora, pelo contrário, a produção no biorreator foi um pouco menor do que a obtido em shaker.

Em relação as variáveis do processo (pH, oxigênio dissolvido,  $Y_{CO_2}$ ,  $Y_{O_2}$ , agitação), o comportamento foi muito semelhante ao ensaio anterior. Neste ensaio também necessitou-se fixar a agitação, em torno de 25 horas de cultivo, para manter o oxigênio em 20% da saturação.

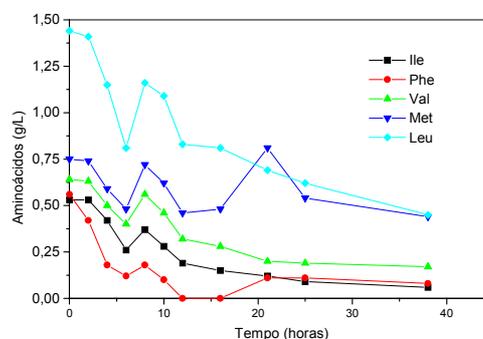
Na Tabela 4.50 também pode-se observar semelhanças no consumo dos aminoácidos, apesar da concentração de alimentação de alguns deles serem diferentes. Os aminoácidos que foram esgotados no ensaio 8, aqui também tiveram exaustão total (treonina, serina, glicina, alanina, histidina, lisina e arginina). Para os demais, o acúmulo no meio foi um pouco diferente, devido a concentração fornecida. Na Figura 4.26A e 4.26B é possível observar o comportamento dos aminoácidos consumidos mais rapidamente e os consumidos mais lentamente, respectivamente.

Tabela 4.50. Consumo dos aminoácidos em g/L ao longo do ensaio 9 (batelada alimentada).

	0h	2h	4h	6h	8h	10h	12h	16h	21h	25h	38h
Asp	0,84	0,81	0,6	0,09	0	0,08	0,18	0,19	0,11	0,13	0,11
Thr	0,42	0,40	0,34	0,27	0,33	0,22	0,14	0,03	0	0	0
Ser	0,55	0,55	0,44	0,26	0,2	0,08	0,04	0	0	0	0
Glu	1,68	1,7	1,36	0,51	0,09	0,21	0,41	0,54	0,36	0,38	0,4
Pro	1,29	1,24	1,05	0,95	1,41	1,18	0,89	0,87	0,82	0,85	0,78
Gly	0,15	0,14	0,11	0,08	0,05	0	0	0	0	0	0
Ala	0,37	0,36	0,23	0,1	0	0	0	0	0	0	0
Val	0,64	0,63	0,5	0,4	0,56	0,46	0,32	0,28	0,20	0,19	0,17
Met	0,75	0,74	0,59	0,48	0,72	0,62	0,46	0,48	0,81	0,54	0,44
Ile	0,53	0,53	0,42	0,26	0,37	0,28	0,19	0,15	0,12	0,09	0,06
Leu	1,43	1,44	1,15	0,81	1,16	1,09	0,83	0,81	0,69	0,62	0,45
Tyr	0,24	0,15	-	0,06	-	-	0,11	0,12	0,44	0,11	0,19
Phe	0,56	0,42	0,18	0,12	0,18	0,10	0	0	0,11	0,11	0,08
His	0,24	0,23	0,18	0,13	0,26	0,16	0,10	0,03	0	0	0
Lys	0,78	0,67	0,65	0,60	0,69	0,44	0,35	0	0	0	0
Arg	0,48	0,2	0,14	0,81	0,33	-	0,25	0,24	0,44	0,21	0
CyS	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Trp	0,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



(A)



(B)

Figura 4.26. (A): Aminoácidos consumidos mais rapidamente; (B) Aminoácidos consumidos mais lentamente

Como visto no decorrer desses ensaios (7, 8 e 9), os valores obtidos de atividades enzimáticas e concentrações celulares foram muito próximos. As estratégias de alimentação não conduziram a melhoras significativas na produção da enzima. É claro, no entanto, que o processo continua sendo limitado por algum outro nutriente ou então, pelo oxigênio dissolvido. Desta forma decidiu-se realizar um outro ensaio com alimentação simultânea de aminoácidos e de soro de queijo, dada a importância desse nutriente no processo de produção de PGA.

Este novo ensaio, portanto, partiu das mesmas condições iniciais que os anteriores e utilizou a mesma solução de alimentação de aminoácidos do ensaio 9 (baseada na velocidade de consumo). A única diferença foi a alimentação de uma solução de soro de queijo a partir da 8ª hora de cultivo. A escolha do tempo inicial de adição não foi a mesma dos aminoácidos (5ª hora) pois se tinha receio de que alimentando-se muito cedo iria ocorrer inibição da produção de PGA. Estudos realizados (item 4.1.3.4.3) mostraram forte efeito inibitório na produção da enzima quando se utilizou o dobro da concentração de soro, portanto resolveu-se esperar maior metabolização dos nutrientes antes do início da alimentação. O volume total adicionado foi de 350 mL de uma solução com concentração igual a 176,8 g/L. Os resultados obtidos neste ensaio são apresentados na Tabela 4.51 e na Figura 4.27. Na Tabela 4.52 são apresentados os resultados obtidos no ensaio realizado em paralelo no shaker.

Tabela 4.51. Resultados obtidos na produção de PGA em biorreator operado em 20% de oxigênio em todo o cultivo, ausência de controle de pH, adição de AFA no início do cultivo e uso dos novos meios padrões (GA8 e PA10) com alimentação de aminoácidos (concentração baseada na velocidade de consumo) e de soro de queijo. Início e término da alimentação a.a. = 5 e 14 horas. Início e término da alimentação soro de queijo = 8 e 11 horas. Ensaio 10

Tempo (h)	pH	C <sub>X</sub> (g/L)	A.E. (UI/L)	A.Esp. (UI/ g células)	Lactose (DNS- g/L)	a.a. (g/L)	AFA (g/L)
Pré-inóculo	-	5,4	-	-	4,9	-	-
Inóculo	8,4	3,9	-	-	6,6	-	-
0	7,6	0,4	-	-	14,6	10,4	2,8
2	7,9	0,5	-	-	14,9	10,2	2,7
4	8,0	0,9	0	0,0	14,7	9,1	2,7
6	8,2	2,4	23	9,6	14,5	5,7	2,5
8	8,4	3,0	59	19,7	13,3	7,1	2,0
10	8,4	4,6	122	26,5	17,7	5,3	1,4
12	8,5	5,4	185	34,3	18,2	3,8	0,4
14	8,8	5,9	184	31,2	18,7	3,7	0,2
16	9,0	5,8	200	34,5	18,3	2,6	0,2
20	9,2	5,8	215	37,1	18,9	2,9	0,2
24	9,4	5,6	188	33,6	18,9	2,7	0,2
28	9,5	5,4	195	36,1	18,3	2,6	0,2
35	9,5	5,6	188	33,6	18,3	2,5	0,2
46	9,6	5,3	169	31,9	18,5	2,0	0,2

Tabela 4.52. Resultados obtidos na produção de PGA em shaker realizado em paralelo com o biorreator - uso dos mesmos meios (GA8 e PA10) porém sem alimentação.

Tempo (h)	C <sub>X</sub> (g/L)	Atividade enzimática (UI/L)	A.Esp. (UI/ g células)
24	3,6	220	61,1
46	3,4	151	44,4

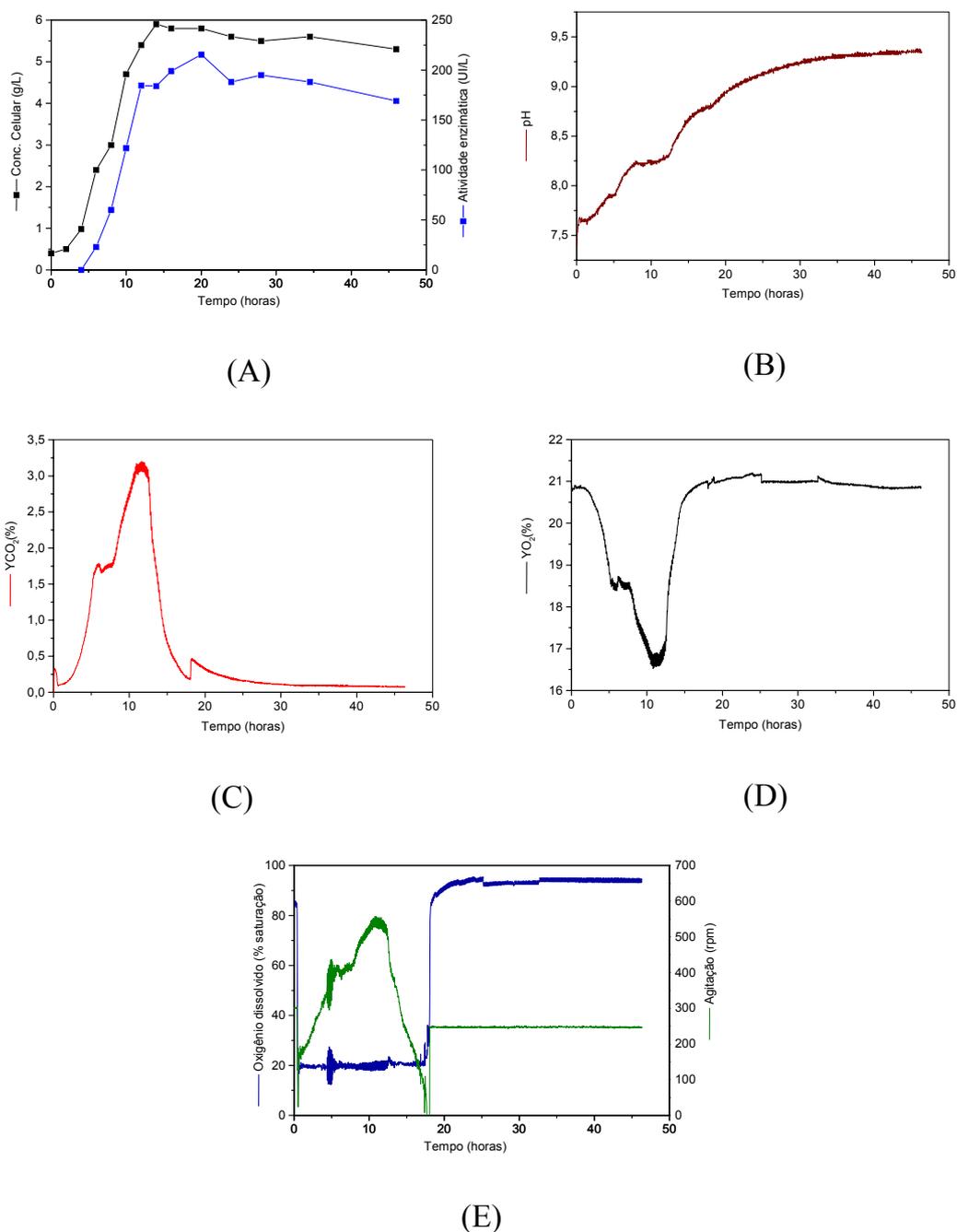


Figura 4.27: Resultados experimentais do décimo ensaio realizado no fermentador. (A) concentração celular e atividade enzimática obtidas em análises de laboratório; (B) pH; (C) concentração de CO<sub>2</sub> nos gases de saída; (D) concentração de O<sub>2</sub>, (E) concentração do oxigênio dissolvido e agitação, obtidos pelo sistema de aquisição de dados.



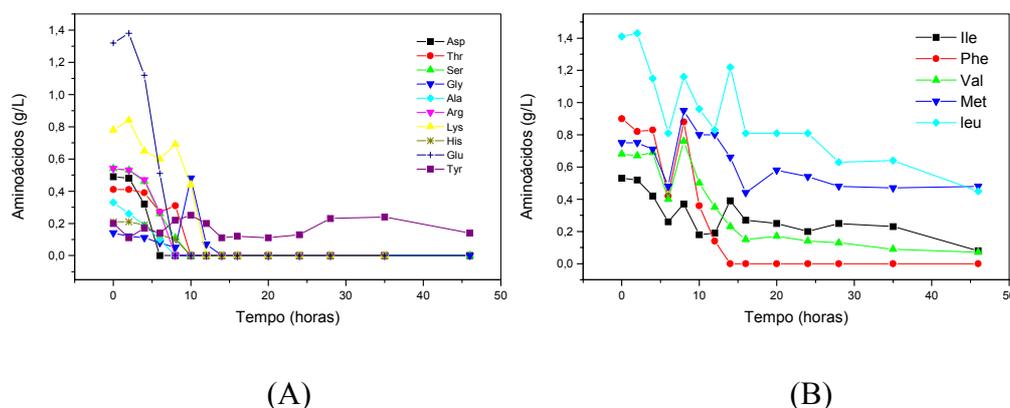


Figura 4.28. (A): Aminoácidos consumidos mais rapidamente; (B) Aminoácidos consumidos mais lentamente

As diferenças verificadas no consumo dos aminoácidos para os ensaios 9 e 10 foram muito pequenas. Algumas diferenças podem até mesmo ser consideradas erro experimental, não sendo significativas na análise do consumo. Verificou-se assim que com alimentação conjunta de soro de queijo conseguiu-se prorrogar a fase exponencial do microrganismo. Contudo, alguma outra variável deve estar controlando a expressão da enzima.

Baseando-se no estudo de Fisher, 1999, sobre a regulação por nitrogênio da expressão de enzima, é possível que somente para uma estreita faixa de concentração de aminoácidos ocorra liberação da transcrição da enzima. Isso recomenda prosseguimento dos estudos em batelada alimentada, variando-se a velocidade de alimentação de modo a se manter fixo diferentes valores dessa concentração, o que permitiria encontrar esse valor ótimo. Outra possibilidade é alimentar apenas AFA e soro, pois embora já se tenha feito alimentação de AFA não houve a alimentação conjunta de soro. Assim, embora um grande número de ensaios tenha sido feito, acreditamos que seja possível melhorar ainda mais a produção de PGA manipulando-se as condições operacionais. Ressaltamos contudo que para o primeiro ensaio realizado em biorreator com inóculo padronizado obtivemos o máximo de 56 UI/L e 8,6 UI/g célula. Ao final desse trabalho, após uma série de ensaios variando-se diferentes condições, alcançamos atividade enzimática de 220 UI/L e atividade específica de 65 UI/g de células (ensaio 8). Esse ganho substancial foi atingido quando se utilizou o meio com 10

g/L de aminoácidos, 19,6 g/L de soro de queijo, 2,7 g/L de AFA e 0,9 g/L de sais e as condições operacionais foram: ausência de controle de pH, controle de oxigênio dissolvido em 20% durante todo o cultivo, adição de AFA no início do cultivo e alimentação de aminoácidos.

### 4.3. Produção de PGA de *E. coli* em câmara rotativa

#### 4.3.1. Verificação da estabilidade de *E. coli*

Os ensaios de produção de PGA utilizando a *E. coli* foram realizados no Centro de Engenharia Biológica e Química do Instituto Superior Técnico de Lisboa - Portugal. Este estudo faz parte do plano proposto para a realização do estágio efetuado de setembro de 2002 a janeiro de 2003 que tinha como título “Produção de penicilina acilase de *Escherichia coli* e processo integrado de separação dos fragmentos celulares e recuperação de enzima por coluna de leito expandido”. O nosso objetivo em relação à etapa de produção era apenas a obtenção da enzima para estudar a purificação. Do ponto de vista deste projeto (Produção de PGA por *B. megaterium*) nosso maior interesse em conhecer as condições de cultivo de *E. coli* para produção da enzima era poder aplicá-las para o *B. megaterium*, uma vez que os mecanismos regulatórios deveriam ser semelhantes para ambos os microrganismos.

Nos primeiros ensaios de produção de PGA por *E. coli* se utilizaram diferentes lotes de uma mesma linhagem de *E. coli* ATCC 9637, com o intuito de verificar se algum desses lotes apresentaria uma melhor produção, uma vez que os mesmos estavam estocados há muito tempo no freezer e poderiam apresentar queda na produtividade. Esses lotes consistiam de microrganismos que foram cultivados em meios diferentes e então armazenados no próprio meio juntamente com glicerol (0,5 mL de meio + 0,5 mL de glicerol). Os lotes foram denominados de YE1, o qual foi cultivado em 20 g/L de extrato de levedura e 1 g/L de ácido fenil acético, YE2 no mesmo meio porém em época diferente, GLU foi cultivado em 20 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de ácido fenil acético e 3 g/L de glutamato e o último foi AFA com 10 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de ácido fenil acético.

Os resultados obtidos são apresentados nas Tabelas 4.54 (meio de crescimento) e 4.55 (meio de produção). A partir desses ensaios de produção de PGA por *E. coli* a concentração celular não foi mais determinada pela pesagem da massa seca mas sim através da densidade ótica, portanto, nas Tabelas mostradas a

seguir serão apresentados os valores de densidade ótica. Os meios e as condições utilizadas são descritas nos itens 3.1.2 e 3.2.8.

Tabela 4.54. Resultados obtidos no meio de crescimento de diferentes lotes de *E. coli* (tempo de cultivo = 5 a 7 horas)

Lotes	pH	Concentração celular	
		D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
MCYE1	6,2	3,3	1,0
MCYE2	5,8	3,4	1,0
MCGLU	5,8	3,5	1,1
MCAFA	5,7	3,7	1,1

Tabela 4.55. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando diferentes lotes de *E. coli* (temperatura = 26°C, volume de meio = 100mL)

Lotes	t (h)	PH	Atividade (UI/L)	A.Esp. (UI/g células)	Concentração celular	
					D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
MPYE1	18	7,8	-	-	5,2	1,6
	21	8,0	-	-	5,9	1,8
	24	8,0	-	-	7,0	2,1
	25	8,0	125	56,8	7,2	2,2
	40	8,1	149	46,6	10,8	3,2
MPYE2	22	8,0	-	-	5,9	1,8
	23	8,0	116	61,1	6,2	1,9
	38	8,1	137	50,7	9,0	2,7
MPGLU	22	8,1	-	-	5,8	1,7
	23	8,0	108	56,8	6,2	1,9
	38	8,1	101	37,4	8,9	2,7
MPAFA	22	8,1	-	-	6,2	1,9
	23	8,0	130	68,4	6,3	1,9
	38	8,1	111	39,6	9,3	2,8

Os valores encontrados de atividades enzimáticas para todos os lotes testados apresentaram uma queda brusca quando comparados com os valores obtidos com os mesmos microrganismos no período de 1995, que era em média de 800 UI/L para as mesmas condições utilizadas (Fonseca, 1995). Esses resultados mostraram que houve uma atenuação dos microrganismos e que seria necessário um estudo mais aprofundado do que se pretendia para conseguir aumentar a produção de PGA. Deste modo, passou-se a estudar diversas variáveis, sendo que as primeiras foram a temperatura e o volume de meio no erlenmeyer.

#### 4.3.2. Efeito da temperatura e volume do meio no erlenmeyer na produção de PGA de *E. coli*

Nas Tabelas 4.56 e 4.57 são apresentados os resultados dos ensaios de cultivo utilizando os mesmos lotes de microrganismos, porém mudando a temperatura 26°C para 24°C e o volume de meio de 100 mL para 80mL (erlenmeyers de 250 mL). Nos ensaios anteriores (Tabela 4.55) já se pretendia realizar o cultivo dos microrganismos em 24°C, no entanto, por problemas operacionais o processo foi feito a 26°C. Fonseca,1995, verificou um aumento apreciável de produção de enzima quando pesquisou o efeito dessas duas variáveis na produção de PGA. Como pode ser visto na Tabela 4.57 também obtivemos melhoras na produção de PGA, porém os níveis enzimáticas ainda estão abaixo do esperado.

Tabela 4.56. Resultados obtidos no meio de crescimento de diferentes lotes de *E. coli* (tempo de cultivo = 5 horas)

Lotes	pH	Concentração celular	
		D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
MCYE1	6.4	4,5	1,4
MCYE2	6.4	3,3	1,0
MCGLU	6.2	3,6	1,1
MCAFA	6.5	3,2	1,0

Tabela 4.57. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando diferentes lotes de *E. coli* (temperatura = 24°C, volume de meio = 80mL)

Lotes	t (h)	pH	Atividade (UI/L)	A. Esp. (UI/g células)	Concentração celular	
					D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
MPYE1	3	6,6	-	-	0,7	0,2
	19	8,0	-	-	8,4	2,5
	21	8,0	116,5	44,8	8,5	2,6
	24	8,1	164,2	54,7	9,9	3,0
	27	8,0	213,3	66,7	10,5	3,2
	45	8,2	190,9	40,6	15,5	4,7
MPYE2	21	7,9	162,8	74,0	7,3	2,2
	24	8,0	202,1	77,7	8,7	2,6
	27	8,0	240,0	77,4	10,4	3,1
	45	8,7	227,3	59,8	12,6	3,8
MPGLU	21	8,0	144,5	68,8	7,0	2,1
	24	8,0	168,4	64,8	8,6	2,6
	27	8,1	206,3	71,1	9,6	2,9
	45	8,7	203,5	50,9	13,4	4,0
MPAFA	21	7,9	100,0	58,8	5,6	1,7
	24	8,0	138,9	63,1	7,3	2,2
	27	8,0	165,6	69,0	8,1	2,4
	45	8,4	186,6	45,5	13,6	4,1

### 4.3.3. Influência do meio de crescimento na etapa de produção de PGA

A não obtenção de níveis enzimáticos satisfatórios (conforme já explicado no item 4.3.1 o nível esperado de atividade de PGA de *E. coli* era 800 UI/L) nos levou a testar a influência das condições (pH e concentração celular) em que se

encontrava o meio de crescimento no momento da sua inoculação no meio de produção. Esse estudo foi realizado pois, segundo Fonseca e alguns outros autores (Kaufmann e Bauer, 1964 ; Robas et al.;) ocorre uma diminuição do pH no meio de cultura numa fase inicial do crescimento de *E. coli* devido ao metabolismo de glicose, glicerol e outros carboidratos presentes no meio de cultura. O consumo destes substratos está associado à produção de ácidos carboxílicos, em especial o ácido acético. Este fenômeno pode ser responsável pela diminuição do metabolismo das células e a sua inoculação no momento em que as células ainda estão metabolizando os carboidratos irá influenciar na produção de PGA. Desta forma, realizaram-se diversos ensaios com o lote YE1, onde o meio de produção foi inoculado com o meio de crescimento em diferentes fases. A Tabela 4.58 mostra a evolução do pH e da concentração celular do meio de crescimento e a Tabela 4.59 apresenta os resultados obtidos de produção de PGA quando se inoculou o meio após 4, 5 e 9 horas de cultivo do microrganismo. Esses tempos de cultivo selecionados compreendem as fases em que o microrganismo está metabolizando os carboidratos, devido ao abaixamento do pH (tempo de cultivo de 4 e 5 horas) e também na fase ascendente do perfil do pH (9 h). Nos ensaios descritos anteriormente (Tabela 4.55 e 4.57) o meio de produção foi inoculado com o meio de crescimento ainda na fase decrescente do pH (5/7 hs de cultivo).

Tabela 4.58. Resultados obtidos no meio de crescimento de *E. coli* em diferentes tempos

Tempo de crescimento	pH	Concentração celular	
		D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
3 horas	6,9	2,1	0,6
4 horas	6,7	3,3	1,0
5 horas	6,3	4,2	1,3
6 horas	6,1	5,2	1,6
7 horas	5,8	6,4	1,9
8 horas	6,0	7,3	2,2
9 horas	6,1	7,6	2,3

Tabela 4.59. Influência do tempo de cultivo de *E. coli* na produção de PGA

Variável	t (h)	pH	A.E (UI/L)	A. Esp. (UI/g células)	Concentração celular	
					D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
Inoculação após 4 horas de cultivo	20	8,0	84,2	42,1	6,8	2,0
	24	8,0	115,1	50,0	7,8	2,3
	27	8,1	120,7	44,7	8,9	2,7
	42	8,2	195,1	54,2	12,0	3,6
Inoculação após 5 horas de cultivo	19	8,0	94,0	44,8	7,1	2,1
	23	8,1	119,3	47,7	8,3	2,5
	26	8,1	131,9	48,9	9,1	2,7
	41	8,2	185,2	50,1	12,3	3,7
Inoculação após 9 horas de cultivo	19	8,0	88,4	42,1	6,9	2,1
	22	8,1	110,9	48,2	7,8	2,3
	37	8,1	204,9	58,5	11,7	3,5

Os resultados apresentados na Tabela 4.59 mostram que não houve influência das condições em que se encontrava o microrganismo no momento da sua inoculação. Os valores de concentração celular e atividade enzimática foram semelhantes para todos os ensaios. Esses resultados divergem dos obtidos por Fonseca,1995, pois provavelmente o fato do microrganismo estar metabolicamente menos ativo em relação à produção de enzima faz com que as mudanças aplicadas não afetem significativamente a produção da enzima.

Em face destes resultados, uma outra alternativa era testar as concentrações dos nutrientes utilizados.

#### 4.3.4. Efeito da concentração de extrato de levedura e do ácido fenil acético na produção de PGA

Conforme já explicado e verificado no item 4.3.3, no início do cultivo do microrganismo ocorre uma diminuição do pH devido ao metabolismo dos carboidratos contidos no meio. Dependendo da quantidade de carboidratos fornecida a diminuição do pH pode ser tal que causa uma inibição total da síntese da enzima e simultaneamente a esse efeito tem-se repressão catabólica da síntese da enzima causada pelos carboidratos (Fonseca, 1995). Portanto, quando fornecemos quantidades diferentes de extrato de levedura no meio de cultivo, estamos não só fornecendo concentrações diferentes de nitrogênio mas também de carboidratos (contido na fonte complexa do extrato de levedura), o que poderá ocasionar efeitos inibitórios da síntese de enzima e do crescimento do microrganismo. Para testar tal efeito optou-se por realizar diversos ensaios onde utilizaram-se 3 concentrações diferentes de extrato de levedura e 3 de ácido fenil acético. O planejamento dos ensaios com suas respectivas concentrações está apresentado abaixo, sendo que até o momento estávamos utilizando um meio com 10 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de AFA (ensaio 8). O efeito da concentração do AFA também foi testado com objetivo de verificar se não estava ocorrendo inibição pelo indutor, pois do mesmo modo que a produção de PGA de *B. megaterium* é inibida por altas concentrações de AFA, a síntese de PGA de *E. coli* também sofre esse efeito (Fonseca, 1995). Na Tabela 4.60 são apresentados os resultados obtidos desses ensaios.

Planejamento dos ensaios:

F1 – 5g/L de YE e 2 g/L de AFA

F2 - 5g/L de YE e 3 g/L de AFA

F3 - 5g/L de YE e 4 g/L de AFA

F7 - 10g/L de YE e 2 g/L de AFA

F8 - 10g/L de YE e 3 g/L de AFA

F9 – 10g/L de YE e 4 g/L de AFA

F4- 7,5g/L de YE e 2 g/L de AFA

F5- 7,5g/L de YE e 3 g/L de AFA

F6- 7,5g/L de YE e 4 g/L de AFA

Tabela 4.60. Efeito da concentração dos nutrientes do meio na produção de PGA por *E. coli*

Ensaio (YE/AFA)	t (h)	pH	Atividade (UI/L)	A. Esp. (UI/g células)	Concentração celular	
					D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/ L meio)
F1 (5/2)	14	7,8	87,0	51,2	5,8	1,7
	21	8,0	209,1	90,9	7,6	2,3
	37	8,6	178,2	66,0	9,1	2,7
F2 (5/3)	14	7,7	49,1	40,9	4,1	1,2
	21	7,9	153,0	85,0	6,1	1,8
	37	7,9	216,1	69,7	10,5	3,1
F3 (5/4)	14	7,2	8,4	12,0	2,2	0,7
	21	7,8	81,4	74,0	3,8	1,1
	37	8,0	152,9	54,6	9,3	2,8
F4 (7,5/2)	14	7,9	61,7	34,3	6,1	1,8
	21	8,1	175,4	87,7	6,7	2,0
	37	8,1	162,8	50,9	10,8	3,2
F5 (7,5/3)	14	7,7	54,7	39,1	4,5	1,4
	21	8,1	138,9	73,1	6,3	1,9
	37	8,1	176,8	57,0	10,3	3,1
F6 (7,5/4)	14	7,5	26,7	26,7	3,2	1,0
	21	8,0	138,9	77,2	6,0	1,8
	37	8,1	145,9	47,1	10,4	3,1
F7 (10/2)	14	7,9	50,5	23,0	7,3	2,2
	21	8,1	138,9	60,4	7,6	2,3
	37	8,2	112,3	32,1	11,6	3,5
F8 (10/3)	14	7,8	60,3	33,5	6,0	1,8
	21	8,1	138,9	60,4	7,8	2,3
	37	8,3	137,5	41,7	11,0	3,3
F9 (10/4)	14	7,6	21,1	17,6	4,0	1,2
	21	8,0	115,1	60,6	6,4	1,9
	37	8,2	123,5	37,4	10,9	3,3

Pelos resultados obtidos podemos concluir que para concentrações maiores de AFA (4 g/L) ocorre uma inibição do crescimento do microrganismo e da produção de PGA. Esse efeito é mais acentuado no início do processo e também para concentrações mais baixas de extrato de levedura (comparação do ensaio F1 com o F3). Com relação às diferentes concentrações de extrato de levedura, observamos um crescimento mais rápido do microrganismo quando utilizamos concentrações mais elevadas, no entanto, esse crescimento não resultou em

maiores níveis de atividade (comparação dos ensaios F5 e F8). Como os resultados obtidos não foram muito diferenciados entre os vários ensaios optou-se por continuar a investigação de produção de PGA utilizando-se as mesmas concentrações dos nutrientes (10 g/L de extrato de levedura e 3 g/L de AFA) de modo a facilitar a comparação com os demais ensaios. Seguindo a mesma linha de raciocínio, do conteúdo de carboidratos contido no extrato de levedura, decidiu-se realizar alguns ensaios utilizando-se diferentes extratos de levedura.

#### **4.3.5. Influência de diferentes marcas de extrato de levedura na produção de PGA**

Fonseca, 1995, verificou que o extrato de levedura da marca Difco, de uso corrente neste trabalho, apresentou melhor desempenho na produção de PGA quando comparado com a marca Constantino. Apesar de estarmos utilizando uma marca que anteriormente apresentou melhor desempenho resolvemos testar outras com o objetivo de encontrar uma marca que melhorasse a produção de PGA. O que pode ter ocorrido também são variações de nutrientes para diferentes lotes de uma mesma marca, portanto, para elucidar essa dúvida utilizamos dois lotes diferentes da marca Difco. Os extratos de levedura utilizados foram da marca Sigma, Merck Farma e Química, Difco 1 (novo lote) e Difco 2 (antigo) e os resultados são apresentados na Tabela 4.61.

Tabela 4.61. Influência de diferentes marcas de extrato de levedura na produção de PGA por *E. coli*

Variável	t (h)	pH	Atividade (UI/L)	A. Esp. (UI/g células)	Concentração celular	
					D.O. (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
Sigma	20	7,8	71,6	34,1	6,9	2,1
	37	8,5	58,9	18,4	10,6	3,2
Merck	20	8,1	138,9	69,5	6,8	2,0
	37	8,1	178,2	46,9	12,6	3,8
Difco 1	20	8,0	112,3	48,8	7,5	2,3
	37	8,1	154,4	42,9	12,1	3,6
Difco 2	20	8,1	98,2	51,7	6,4	1,9
	37	8,1	145,9	42,9	11,4	3,4

Exceto o cultivo realizado com o extrato de levedura da marca Sigma, que apresentou uma queda na produção de PGA, todos os outros ensaios apresentaram resultados muito semelhantes entre si e em consonância com todos os ensaios de produção de PGA por *E.coli*. Novamente, essas diferenças não significativas fez com que continuássemos o estudo de produção de enzima com o extrato de levedura da marca Difco (2), utilizado até o momento.

#### 4.3.6. Seleção de colônias produtoras de *E. coli*

A última variável a ser estudada na produção de PGA de *E.coli* em câmara rotativa foi a busca por uma colônia mais produtora. Para tal, foi feito o plaqueamento de YE1 e selecionado as diferentes colônias encontradas. Macroscopicamente observou-se dois tipos de colônias, denominadas de YE1 pequena e YE1 maior. A partir dessas diferentes colônias fez-se todo o processo de produção de PGA de *E.coli* separadamente. Os resultados encontrados são apresentados na Tabela 4.62.

Tabela 4.62. Resultados obtidos na produção de PGA utilizando duas colônias aparentemente diferentes (YE1 pequena e YE1 maior respectivamente)

Variável	t (h)	pH	Atividade (UI/L)	A. Esp. (UI/g células)	Concentração celular	
					D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/ L meio)
YE1 pequena	14	7,7	73,0	56,2	4,3	1,3
	20	7,9	124,9	62,5	6,5	2,0
	39	8,1	189,5	52,6	12,1	3,6
YE1 maior	14	7,8	75,8	42,1	6,1	1,8
	20	8,0	123,5	47,5	8,8	2,6
	39	8,1	188,0	48,2	12,9	3,9

Conforme podemos observar nos resultados obtidos (Tabela 4.62), os valores de atividades enzimáticas são praticamente iguais para as duas colônias. Quanto às concentrações celulares, foi atingido valores levemente superiores no ensaio em que se utilizou a colônia YE1 maior, mas que não estava associado a aumento de produção de enzima. Após várias tentativas de aumento de produção de enzima, com nenhuma melhora significativa, decidiu-se realizar ensaios no biorreator. Desta forma, seria possível controlar o oxigênio dissolvido e o pH do caldo de cultivo.

#### 4.4. Produção de PGA de *E.coli* em Biorreator

Nesta etapa do trabalho, diferentemente da produção de PGA de *B. megaterium* em biorreator, foram acompanhadas somente as variáveis pH, concentração celular e atividade enzimática. Na etapa de produção de PGA por *B. megaterium* além de coletarmos amostras em espaços de tempo curtos também tínhamos um sistema de aquisição de dados acoplados ao biorreator (item 4.2). No entanto, o objetivo principal desta etapa era obtermos a enzima no meio de cultivo para aplicarmos no leito expandido e não estudarmos o metabolismo do microrganismo.

O primeiro ensaio no biorreator utilizou as condições citadas abaixo e basearam-se no trabalho de Fonseca, 1995.

- aeração de 4 litros/min
- temperatura controlada em 30°C
- agitação de 200 rpm
- controle do pH na faixa de 6,5 a 8,5
- ausência de controle de oxigênio

O meio utilizado foi o mesmo dos ensaios em câmara rotativa, descritos no item 3.2.8 e o volume total foi de 4 litros. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela abaixo (Tabela 4.63).

Tabela 4.63. Resultados obtidos na produção de PGA de *E. coli* realizado em biorreator operado a uma agitação de 200 rpm, ausência de controle de oxigênio e controle de pH na faixa de 6,5 a 8,5. Ensaio 1

Ensaio	t (h)	pH	Atividade (UI/L)	A. Esp. (UI/ gcélulas)	Concentração celular	
					D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
1	15	8,2	112,3	66,1	5,5	1,7
	20	8,3	109,5	60,8	5,9	1,8
	23	8,3	103,8	57,7	5,9	1,8

Como podemos observar na Tabela 4.63 os valores de atividade enzimática e de concentração celular estão estagnados nos tempos em que foram coletadas as amostras. O fato de verificarmos essa estagnação juntamente com os baixos valores encontrados para essas variáveis nos levam a crer que houve um crescimento muito rápido do microrganismo resultando na exaustão do oxigênio (não foi fixado o oxigênio). A falta de oxigênio pode ter ocasionado a morte das células. Decidiu-se então, realizar outra fermentação com as mesmas condições anteriores porém fixando um valor de oxigênio dissolvido em 5%. Esta concentração de oxigênio no meio de cultura manteve-se por variações da velocidade de agitação. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.64.

Fonseca, 1995, investigou uma faixa de 3 a 30% de concentração de oxigênio na produção de PGA por *E. coli* e conclui que quanto maior é a concentração de oxigênio menor são os valores das atividades e atividades específicas celulares obtidos no final da fermentação. O pesquisador também detectou um aumento no valor de D.O em cerca de 50 a 75% quando comparado com os ensaios realizados na câmara rotativa. Este fato comprovou a limitação do crescimento do microrganismo pelas baixas taxas de aeração nos erlenmeyers.

Para altas concentrações de oxigênio os valores altos de D.O (12 a 14) foram atingidos rapidamente, no entanto os valores de atividades foram inferiores, atingindo 1,05 UI/mL com 3% de oxigênio dissolvido e 0,66 UI/mL com 30%.

É também de suas conclusões que a concentração de 3% está de acordo com outros valores encontrados na literatura, como por exemplo o valor de 2% otimizado por Klein e Wagner, 1980. Fonseca, 1995, também considerou próximo dos 10 e 13% obtidos por Gebauer et al, 1987, e Kleiner et al, 1972, tendo em conta que a concentração do oxigênio no meio de fermentação é uma grandeza relativa e por isso dependente, entre outros parâmetros, da pressão em cúpula no fermentador, dos métodos de calibração e também da própria composição do meio de cultura.

Tabela 4.64. Resultados obtidos na produção de PGA de *E. coli* realizado em biorreator operado a 5% de oxigênio dissolvido e controle de pH na faixa de 6,5 a 8,5. Ensaio 2

Ensaio	t (h)	pH	Atividade (UI/L)	A. Esp. (UI/g células)	Concentração celular	
					D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
2	14	8,1	96,8	80,7	4,0	1,2
	19	8,3	122,1	71,8	5,8	1,7
	23	8,3	122,1	58,1	6,9	2,1
	38	8,4	245,6	68,2	11,9	3,6

Nesta fermentação conseguiu-se obter uma melhora na produção de PGA quando comparada com a primeira fermentação no biorreator (Tabela 4.63).

Ainda, os valores de atividades foram ligeiramente superiores aos obtidos nas fermentações realizadas em shaker (item 4.3).

Embora não tenhamos atingido valores satisfatórios de enzima, a partir dessa fermentação iniciou-se a realizar as etapas propostas referentes à purificação (resultados apresentados no item 4.6). As demais fermentações (ensaios 3-5) realizadas em biorreator não tinham como objetivo fazer nenhuma modificação nas condições utilizadas, mas sim obter volume suficiente de meio de cultivo. Porém, convém salientar que o ensaio 3 (Tabela 4.65) apresentou melhoras significativas na produção de PGA, mesmo utilizando as mesmas condições. Uma possível explicação para obtenção desses resultados é a reativação do microrganismo devido aos repiques sucessivos que o mesmo vinha sofrendo. Quando se iniciou o processo de produção de PGA por *E. Coli*, o microrganismo estava armazenado no ultrafreezer por um período de tempo bastante prolongado. Ao longo deste trabalho, sempre que se iniciou uma fermentação, foi realizado um novo repique em meio sólido contendo AFA (item 3.2.8.1). Até chegarmos nesta etapa (3º ensaio) o microrganismo sofreu diversos repiques. O fato do meio sólido para repiques conter ácido fenil acético na sua composição favorece não só a propagação de microrganismos que estão aptos ao consumo do AFA como também uma pré-adaptação aos componentes do meio de cultivo.

Tabela 4.65. Resultados obtidos na produção de PGA de *E. coli* realizado em biorreator operado a 5% de oxigênio dissolvido e controle de pH na faixa de 6,5 a 8,5. Ensaio 3

Ensaio	t (h)	pH	Atividade (UI/L)	A. Esp. (UI/g células)	Concentração celular	
					D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
3	15	7,9	164,2	78,2	6,9	2,1
	21	8,2	430,8	105,1	13,5	4,1
	38	8,5	446,3	139,5	10,5	3,2

Para os ensaios 4 e 5 não foi possível controlar o oxigênio dissolvido pois o eletrodo apresentou problemas. Desta forma, resolveu-se fixar a agitação em

400 rpm e manter as demais variáveis iguais. Os resultados desses ensaios são apresentados na Tabela 4.66.

Tabela 4.66. Resultados obtidos na produção de PGA de *E. coli* realizado em biorreator operado a uma agitação de 400 rpm, ausência de controle de oxigênio e controle de pH na faixa de 6,5 a 8,5. Ensaios 4 e 5

Ensaios	t (h)	pH	Atividade (UI/L)	A. Esp. (UI/g células)	Concentração celular	
					D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
4	20	8,4	381,7	109,1	11,5	3,5
	37	8,4	286,3	98,7	9,5	2,9
5	16	8,0	416,8	134,5	10,3	3,1
	20	8,1	416,8	109,7	12,7	3,8

Nesses ensaios podemos observar que os valores de atividades foram semelhantes ao do ensaio 3 (Tabela 4.65). Porém, cabe observar que o fato de submeter o meio de cultivo, muito tempo (ensaio 5 - 37 horas), a uma agitação de 400 rpm provocou uma queda na atividade enzimática, o que pode ser explicado pela maior tensão de cisalhamento. Uma outra possível explicação pode ser a carência de elementos essenciais à multiplicação e manutenção celular, ultrapassada somente à custa do consumo das enzimas e também da própria autólise dos microrganismos. Esse fato também explica, para tempos longos de fermentação, a quebra dos valores de concentração celular em diversos ensaios. Esta constatação também foi observada no cultivo de *B. megaterium*.

#### **4.5. Produção de PGA de *B. megaterium* em câmara rotativa utilizando as condições de cultivo de *E. coli*.**

Conforme já explicado no item 4.3.1 o nosso maior interesse em conhecer as condições de cultivo de *E. coli* para produção da enzima era poder aplicá-las

para o *B. megaterium*, uma vez que os mecanismos regulatórios poderiam ser semelhantes para ambos os microrganismos. Desta forma, após o retorno do estágio realizado em Lisboa –Portugal, as condições utilizadas no cultivo de *E. coli* foram aplicadas aqui no nosso laboratório para o *B. megaterium* (ensaio 1). Convém salientar que não só os nutrientes foram os mesmos, mas também as condições operacionais, tais como pH, temperatura, agitação e volume de meio nos erlenmeyers (conforme item 3.2.8). Paralelamente a esse ensaio testou-se o efeito da concentração do extrato de levedura (ensaio 2). Os resultados destes ensaios são apresentados na Tabela 4.67 (meio de germinação) e 4.68 (meio de produção).

Tabela 4.67. Resultados obtidos no meio de crescimento de *B. megaterium* utilizando todas as condições de cultivo de *E. coli*

Meio	Tempo	pH	Concentração celular	
			D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
MC 1-2 40 g/L Y.E. 1 g/L de AFA	4h	7,4	0,5	0,2
	9h	7,6	2,1	0,6
	12h	7,6	4,6	1,4

Tabela 4.68. Resultados obtidos na produção de PGA por *B. megaterium* utilizando todas as condições de cultivo de *E. coli*

Ensaio	Tempo (h)	pH	Concentração celular		A. E. (UI/L)
			D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)	
1 10 g/L Y.E. 3 g/L de AFA	21	8,0	6,7	2,0	0
2 7,5 g/L Y.E. 3 g/L de AFA	21	8,0	6,3	1,9	0

Como pode ser visto nas Tabelas 4.67 e 4.68 os resultados obtidos no cultivo de *B. megaterium* são muito diferentes dos obtidos por *E. coli* (item 4.3), o que indica que os microrganismos possuem metabolismos diferenciados. No meio de crescimento não se observa declínio do pH e a concentração celular é muito baixa (comparação com os resultados da Tabela 4.58). No meio de produção a concentração celular atinge valores semelhantes ao de *E. coli* (exemplo Tabela 4.59) porém não ocorre síntese de enzima. Esses resultados nos motivaram a realizar outros ensaios com a mesma composição de meio de *E. coli* porém com as condições operacionais padrões utilizadas no nosso laboratório que eram pH inicial em torno de 8,0, temperatura de 30°C (item 3.2.1) e agitação de 300 rpm. Paralelamente a este ensaio testou-se a concentração de extrato de levedura (ensaio 4), a adição de sais e sais com soro de queijo (ensaios 5 e 6 respectivamente). Resolveu-se adicionar sais e soro devido a grande importância desses nutrientes na produção de PGA por *B. megaterium*. Os resultados obtidos no meio de crescimento são apresentados na Tabela 4.69 e no meio de produção na Tabela 4.70.

Tabela 4.69. Resultados obtidos no meio de crescimento de *B. megaterium* utilizando composição do meio de *E. coli* e as condições operacionais do *B. megaterium* ( pH inicial = 8,2 ; temperatura de 30°C, agitação = 300 rpm)

Meio	Tempo (h)	pH	Concentração celular	
			D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
MC 3-6 40 g/L Y.E. 1 g/L de AFA				
	0h	8,2	-	-
	3h	8,2	0,5	0,2
	6h	8,1	0,9	0,3
	9h	8,0	3,3	1,0
	25h	8,3	19,8	5,9

Tabela 4.70. Resultados obtidos na produção de PGA por *B. megaterium* utilizando composição do meio de *E. coli* e as condições operacionais do *B. megaterium* ( pH inicial de aproximadamente 8,0 ; temperatura = 30°C ; agitação = 300 rpm)

Ensaio	Tempo (h)	pH	Concentração celular		A. E. (UI/L)
			D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)	
3 10 g/L Y.E. 3 g/L de AFA	0	7,9	2,1	0,6	-
	24	8,7	7,6	2,3	13
4 7,5 g/L Y.E. 3 g/L de AFA	0	8,0	2,3	0,7	-
	24	8,6	7,6	2,3	0
5 10 g/L Y.E. 3 g/L de AFA 0,4 g/L sais	0	7,9	2,3	0,7	-
	24	8,5	13,6	4,1	28
6 10 g/L Y.E. 3 g/L de AFA 0,4 g/L sais 19,6 g/L soro	0	7,8	-	-	-
	24	8,5	15,2	4,6	76

O fato de aplicarmos as condições operacionais otimizadas no cultivo do *B. megaterium* não ocasionou melhoras na produção de PGA e no crescimento do microrganismo (comparação dos ensaios 3 e 4 com os ensaios 1 e 2). Quanto aos ensaios 5 e 6, com adição de sais e sais/soro, podemos observar um aumento de 2 vezes na concentração celular, atingindo valores maiores que no cultivo de *E. coli* (em média de 3,8 g/L), no entanto, não obtivemos melhoras satisfatórias de atividades enzimáticas.

Após a obtenção desses resultados, ficou claro, portanto, que esse meio de cultivo de *E. coli* não é adequado para o *B. megaterium* produzir a PGA. Assim, resolveu-se voltar a utilizar o nosso meio otimizado (aminoácidos, soro de queijo, AFA e sais) e aplicar os demais conhecimentos adquiridos no Centro de

Engenharia Biológica e Química de Lisboa – Portugal, com o objetivo, sempre, de aumentar a produção de PGA por *B. megaterium*. A primeira tentativa foi investigar o tempo de inoculação do microrganismo no meio de produção. No início deste trabalho (item 4.1.2) já tínhamos investigado essa variável, com o intuito de otimizar o tempo total de cultivo, o qual conseguimos diminuir de 72 para 24 horas. Na época em que esse estudo foi realizado não tínhamos o conhecimento da possível influência negativa de inocularmos o microrganismo enquanto o mesmo ainda se encontrava metabolizando os carboidratos contidos no meio, indicado pela diminuição do pH do meio. Desta forma, acompanhamos o pH do meio de germinação e inoculamos o meio de produção com o meio em diferentes estágios. Os resultados obtidos no meio de crescimento são apresentados na Tabela 4.71 e na Tabela 4.72 tem-se os resultados referentes a produção de PGA.

Tabela 4.71. Resultados obtidos no meio de crescimento de *B. megaterium* utilizando o meio de cultivo otimizado do *B. megaterium* (GA8)

Tempo	pH	Concentração celular	
		D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
0h	8,5	1,2	0,4
3h	8,3	1,2	0,4
6h	7,9	1,9	0,7
8h	7,8	3,3	1,3
11	7,8	4,3	1,6
24	7,8	9,4	3,6

Tabela 4.72. Resultados obtidos na produção de PGA de *B. megaterium* para os diferentes tempos de inoculação utilizando meio de cultivo otimizado do *B. megaterium* (PA8).

Tempo de germinação	Tempo de Produção					
	23h			43h		
	PGA (UI/L)	Cx (g/L)	pH	PGA (UI/L)	Cx (g/L)	pH
6 h de crescimento	170	3,9	8,3	168	4,3	8,8
11 h de crescimento	260	3,9	8,3	259	4,4	8,6
24 h de crescimento	254	3,9	8,4	221 (49h)	3,7 (49h)	9,1

Pode-se observar na Tabela 4.72 que apenas o tempo de germinação de 6 horas resultou em atividades enzimáticas menores, para os dois tempos de produção testados. Para o tempo de germinação de 24 horas e tempo de produção 49h obtivemos uma diminuição dos valores de atividade e de concentração celular devido ao maior tempo de produção (os demais ensaios foram analisados em 43 horas). Conforme já explicado no item 4.4 esse fenômeno é comum de acontecer em tempos mais longos de cultivo.

Fica claro, portanto, que a partir de 11 horas de germinação já é possível fazer a inoculação do microrganismo no meio de produção. Nota-se na Tabela 4.71 que neste tempo de germinação o pH do caldo está constante, não ocorrendo mais diminuição do mesmo.

Paralelamente a esses ensaios tentou-se reativar o microrganismo da mesma maneira obtida em Lisboa, ou seja, realizando repiques sucessivos em meio sólido com ácido fenil acético. Para realizar tal estudo foi feito um repique em meio comum (item 3.2.1.1) e então cultivado o microrganismo e analisado a produção de PGA (ensaio 7). Seqüencialmente, o microrganismo foi repicado cinco vezes no mesmo meio sólido, porém substituindo a glicose por ácido fenil acético. Após cada repique o microrganismo foi cultivado e fez-se a análise de produção de PGA (ensaios 8-12). Os resultados são apresentados na Tabela 4.73 A partir desses ensaios (ensaios 7-12) também foi adicionado AFA no meio de crescimento (1g/L) com o intuito de diminuir a fase lag do microrganismo.

Tabela 4.73. Resultados obtidos na produção de PGA após sucessivos repiques de *B. megaterium*

Ensaio	Variável	pH	A. E. (UI/L)	A. Esp (UI/gcélula)	Concentração celular	
					D.O (600nm)	Massa seca (g células secas/L meio)
7	1° repique meio comum	8,5	281	65,3	14,4	4,3
8	2° repique meio com AFA	8,6	345	62,7	18,2	5,5
9	3° repique meio com AFA	8,6	262	57,0	15,5	4,6
10	4° repique meio com AFA	8,4	347	72,3	16	4,8
11	5° repique meio com AFA	8,2	263	48,7	17,9	5,4
12	6° repique meio com AFA	8,4	276	55,2	16,6	5,0

Os resultados obtidos (Tabela 4.73) nos mostram que o fato de repicar diversas vezes o *B. megaterium* no meio contendo AFA não influenciou na produção de PGA (comparação do ensaio 7 com os demais). As diferenças ocorridas nos ensaios 8 e 10 são provavelmente decorrentes das oscilações que ocorrem normalmente nos cultivos com aminoácidos, uma vez que para os demais ensaios (9, 11 e 12) não houve alteração nas atividades enzimáticas.

O comportamento do *B. megaterium* frente a essa situação foi diferente do de *E. coli* (item 4.4). O fato da *E. coli* estar armazenada em ultrafreezer por um período de tempo muito longo resultou em uma atenuação do microrganismo, onde os repiques sucessivos auxiliaram na reativação de *E. coli*. Quanto ao *B. megaterium*, o fato do mesmo estar sendo repicado mensalmente, (metabolicamente ativo) fez com que não resultasse em melhoras na produção de PGA.

## 4.6 Extração e Purificação de PGA de *E. coli* ATCC 9637

### 4.6.1. Extração da penicilina G acilase

A *E. coli* ATCC 9637 utilizada neste trabalho produz e acumula a enzima no espaço periplásmico, sendo necessário realizar a ruptura do microrganismo para extrair a enzima. O método utilizado para tal foi a sonicação e as condições utilizadas foram baseadas no trabalho de Fonseca,1995, que eram 200 W de potência do gerador, tempo de sonicação de aproximadamente 12 minutos e concentração celular em torno de 30 g de células seca/L. A Figura 4.29 apresenta a evolução da atividade enzimática no interior do microrganismo e no sobrenadante e também a concentração de proteína liberada durante o processo. Conforme podemos verificar na Figura 4.29 não houve perda de enzimas durante a ruptura celular. No final de 12 minutos de sonicação a concentração de enzimas no interior de *E. coli* era pequena ( 240 UI/L) tendo sido a maior parte liberada para o sobrenadante (1100 UI/L). Em virtude desses resultados positivos passou-se a utilizar sempre este método para a obtenção da enzima intracelular.

Após a obtenção do homogenato (material resultante da sonicação) sempre realizava-se a centrifugação do mesmo para remoção dos fragmentos celulares, exceto quando se desejava estudar a influência desses fragmentos na adsorção. O homogenato após a centrifugação foi denominado de extrato enzimático ou clarificado.

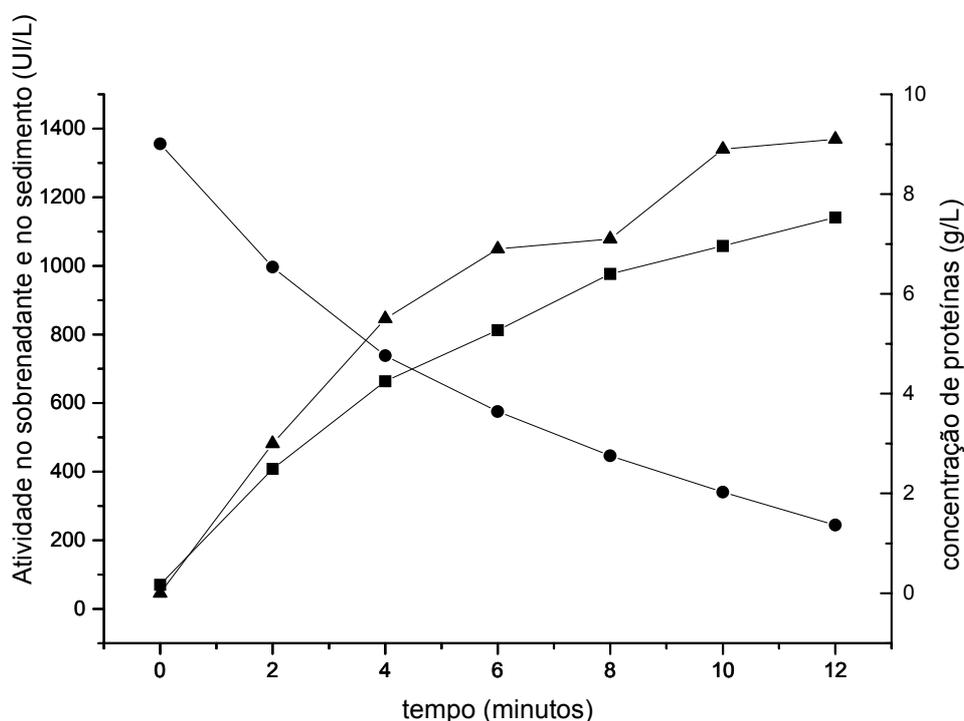


Figura 4.29. Evolução da atividade (■) e de proteínas (▲) no sobrenadante e a atividade de células no sedimento (●) durante a sonicação de suspensão celular

## 4.6.2. Purificação de PGA de *E. coli*

### 4.6.2.1. Adsorção em leito expandido

Conforme já mencionado no item 4.3 o principal objetivo do estágio realizado no Instituto Superior Técnico de Portugal – Lisboa foi o aprendizado de uma nova técnica de purificação. A técnica aplicada foi a adsorção em leito expandido, no qual o professor supervisor Dr<sup>o</sup> Luis Fonseca possui grande experiência.

Para a realização da adsorção em leito expandido (ALE) primeiramente é necessário encontrar as condições ótimas de adsorção e desorção da enzima na resina e a influência da massa celular e/ou dos fragmentos celulares na capacidade

de ligação para só então aplicar a solução na coluna. Essas etapas requeridas são apresentadas nos itens abaixo.

#### **4.6.2.1.1. Influência do pH do extrato enzimático na adsorção de PGA**

Essa etapa do trabalho tinha como objetivo encontrar o melhor pH de adsorção - desorção da enzima PGA no adsorvente catiônico Streamline®SP XL. A avaliação do efeito dessa variável foi através dos resultados de capacidade de adsorção de atividade e de proteína, do rendimento de operação e também do fator de purificação obtido (Tabela 4.75)

O ajuste do pH do extrato enzimático foi feito com HCl para os seguintes valores: 4,5 ; 4,8 ; 5,0 ; 5,5 e 5,8 e a escolha foi baseada no pH isoelétrico da PGA. Sabe-se que o pH isoelétrico da PGA é 6,9 e, portanto, quando a enzima se encontra em um pH abaixo de 6,9 apresenta-se carregada positivamente. O fato do suporte ser de troca catiônica, ou seja, requer íons positivos, fará com que a enzima apresente condições de ser adsorvida. Além do extrato enzimático ser ajustado no pH desejado também estabiliza-se o gel com tampão citrato 20mM no mesmo pH em estudo.

A Tabela 4.74 mostra os resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção para os diferentes pH's e a Tabela 4.75 mostra o efeito dessa variável nos parâmetros quantificados.

Tabela 4.74. Resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de *E. coli* na resina Streamline-SP nos diferentes pH's estudados. Clarificado = solução enzimática no tempo zero; extrato = solução enzimática após passar pelo gel; lavagem = tampão utilizado para lavar o gel; eluído = tampão com NaCl utilizado para eluir a enzima.

Amostras (pH)	Atividade (UI/L)	Proteínas (g/L)	A. Esp. (UI/g proteínas)
Clarificado (sem ajuste de pH)	1289,7	9,2	140.2
Clarificado (4.5)	170,4	1,9	89.7
Extrato (4.5)	5,6	0,2	28.0
Lavagem (4.5)	0	0	0
Eluído 1 (4.5)	168,6	0,3	562.0
Eluído 2 (4.5)	40,8	0,2	204.0
Clarificado (4.8)	540,9	3,7	146.2
Extrato (4.8)	3,7	1,5	2.5
Lavagem (4.8)	0	0,2	0.0
Eluído 1 (4.8)	611,3	1,3	470.2
Eluído 2 (4.8)	135,2	0,3	450.7
Clarificado (5.0)	711,3	4,5	158.1
Extrato (5.0)	27,8	2,6	10.7
Lavagem (5.0)	25,9	0,3	86.3
Eluído 1 (5.0)	596,5	1,1	542.3
Eluído 2 (5.0)	150,0	0,3	500.0
Clarificado (5.4)	1000,4	7,5	133.4
Extrato (5.4)	1000,3	7,2	138.9
Lavagem (5.4)	29,6	0,2	148.0
Eluído 1 (5.4)	0	0	0
Eluído 2 (5.4)	0	0	0
Clarificado (5.8)	1252,2	9,1	137.6
Extrato (5.8)	1126,3	8,0	140.8
Lavagem (5.8)	0	0	0
Eluído 1 (5.8)	0	0	0

Tabela 4.75. Efeito do pH nos parâmetros de adsorção quantificados

pH	Cap. Adsorção (UI/mL gel)	Cap. Adsorção (mg prot./mL gel)	R. eluição (%)	R. adsorção (%)	R. operação (%)	F.P1	F.P2
4,5	0,8	8,5	76	97	74	6,3	2,3
4,8	2,7	7,8	83	99	83	3,2	3,1
5,0	3,0	4,7	75	84	63	3,4	3,2
5,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
5,8	0,6	5,5	0,0	10	0,0	0,0	0,0

R = rendimento

F.P1= fator de purificação 1 (relacionado ao eluído 1)

F.P2 = fator de purificação 2 (relacionado ao eluído 2)

Como pode ser observado na Tabela 4.74, quando se ajustou o pH do clarificado houve uma perda muito grande de enzima, principalmente para os pH's 4,5 ; 4,8 e 5,0. Não obstante, a perda de enzima ocorreu de maneira desproporcional, o que implica concentrações iniciais diferentes, impossibilitando verificar o efeito isolado do pH na adsorção da enzima.

Esses resultados nos mostraram como a enzima é sensível para esses baixos pH's e que se torna necessário não só um maior cuidado no ajuste de pH como também um estudo da estabilidade da PGA em pH ácido. Desta forma, ajustou-se o pH do clarificado para 4,8, pois neste pH foi verificado melhores resultados na etapa de adsorção-desorção, e analisou-se a atividade enzimática durante 7 horas. Nesse intervalo de tempo não houve desativação da enzima, no entanto, ainda ocorre perdas de enzima no momento do ajuste. Essa perda não foi tão acentuada como apresentado na Tabela 4.74 e portanto realizou-se novamente o estudo do pH na adsorção de PGA. Os resultados obtidos nesse segundo processo são apresentados na Tabela 4.76 e os parâmetros quantificados na Tabela 4.77.

Tabela 4.76. Resultados obtidos no segundo processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de *E.coli* na resina Streamline-SP nos diferentes pH's estudados Clarificado = solução enzimática no tempo zero; extrato = solução enzimática após passar pelo gel; lavagem = tampão utilizado para lavar o gel; eluído = tampão com NaCl utilizado para eluir a enzima.

Amostras	Atividade (UI/L)	Proteínas (g/L)	A. Esp. (UI/g proteínas)
Clarificado (sem ajuste de pH)	1424,7	9,7	146,9
Clarificado 4.5	771,3	2,8	275,5
Extrato 4.5	0	0,7	0
Lavagem 4.5	0	0	0
Eluído 1 4.5	973,3	0,8	1216,6
Eluído 2 4.5	136,4	0,2	682,0
Clarificado 4.8	1007,0	4,7	214,3
Extrato 4.8	528,8	3,5	151,1
Lavagem 4.8	0	0,1	0
Eluído 1 4.8	660,1	0,8	825,1
Eluído 2 4.8	84,2	0,1	842,0
Clarificado 5.0	1273,1	7,2	176,8
Extrato 5.0	976,7	6,4	152,6
Lavagem 5.0	16,7	0,2	83,5
Eluído 1 5.0	212,2	0,6	353,7
Eluído 2 5.0	23,6	0,0	0
Clarificado 5.5	1367,4	9,7	141,0
Extrato 5.5	1313,5	9,3	141,2
Lavagem 5.5	0	0,3	0
Eluído 1 5.5	0	0,1	0
Eluído 2 5.5	0	0	0
Clarificado 5.8	1441,5	10,1	142,7
Extrato 5.8	1370,8	9,8	139,9
Lavagem 5.8	0	0,2	0
Eluído 1 5.8	0	0	0

Tabela 4.77. Efeito do pH nos parâmetros quantificados para o segundo processo de adsorção-desorção

pH	Cap. Adsorção (UI/mL gel)	Cap. Adsorção (mg prot./mL gel)	R. Eluição (%)	R Adsorção (%)	R Operação	F.P1	F.P2
4,5	7,7	21	86,3	100	86,3	4,4	2,5
4,8	4,8	10,4	93,4	47,5	44,3	3,9	3,9
5,0	2,7	4,8	52,5	21,2	11,1	2,0	0,0
5,5	0,5	0,0	0,0	3,9	0,0	0,0	0,0
5,8	0,7	0,0	0,0	4,9	0,0	0,0	0,0

R = rendimento

F.P1= fator de purificação 1 (relacionado ao eluído 1)

F.P2 = fator de purificação 2 (relacionado ao eluído 2)

Quando comparado os valores obtidos na Tabela 4.74 com os da Tabela 4.76 pode-se observar que a desnaturação da enzima foi menos acentuada para o segundo processo. Contudo, os clarificados ainda partiram de concentrações de enzima diferentes. Há que se salientar aqui que para os clarificados ajustados para pH's a partir de 5 praticamente não houve adsorção de enzima e são justamente esses clarificados que apresentam concentrações de enzima maiores. Dessa forma é possível descartar o uso desses pH's e comparar a eficiência do processo para a enzima no pH 4,5 e 4,8.

Os parâmetros calculados no processo de adsorção-desorção para esses dois pH's (Tabela 4.77) mostram que o pH 4,5 apresentou capacidade de adsorção e rendimentos mais elevados, no entanto, quando se ajusta o pH do clarificado para 4,5 ocorre uma maior perda de enzima (Tabela 4.76). Desta forma, decidiu-se adotar como melhor pH de adsorção o valor de 4,8 e os tópicos apresentados a seguir, relacionados com adsorção em leito expandido, utilizaram extratos enzimáticos ajustados em pH 4,8.

#### 4.6.2.1.2. Isotermas de Adsorção

Após ter definido o melhor pH (4,8) de adsorção de enzima no suporte Streamline<sup>®</sup>SP foi determinada a isoterma de adsorção para PGA. As

concentrações utilizadas foram obtidas diluindo-se um extrato enzimático em diferentes graus de diluições com tampão de adsorção (tampão citrato 20 mM pH = 4,8). A Tabela 4.78 apresenta essas diferentes concentrações e o comportamento da enzima ao longo do tempo e a Figura 4.30 mostra a variação da capacidade de adsorção da enzima em função da concentração de enzima (atividade) de equilíbrio.

Tabela 4.78. Resultados obtidos na determinação da isoterma de adsorção de PGA de *E. coli* (Temperatura ambiente, pH = 4,8)

Amostras	tempo (min)	Atividade (UI/L)	Proteínas (g/L)	Ads. (UI)	Ads. (mg)	q (UI/mL gel)	Q (mg/mL gel)
1	0	892,5	3,3	4,8	13,7	9,6	27,4
	20	507,7	2,8				
	120	507,7	2,4				
	150	510,3	2,2				
2	0	656,8	2,2	4,5	12,2	8,9	24,4
	20	287,9	1,6				
	120	281,2	1,2				
	150	281,2	1,3				
3	0	572,5	1,6	4,1	6,3	8,2	12,6
	20	182,7	1,2				
	120	187,7	1,0				
	150	187,7	1,0				
4	0	254,3	0,7	1,8	5,9	3,6	11,8
	20	102,7	0,4				
	120	101,0	0,2				
	150	98,5	0,2				
5	0	156,6	0,4	0,81	2,0	1,6	4,0
	20	80,8	0,3				
	120	75,8	0,2				
	150	75,8	0,2				

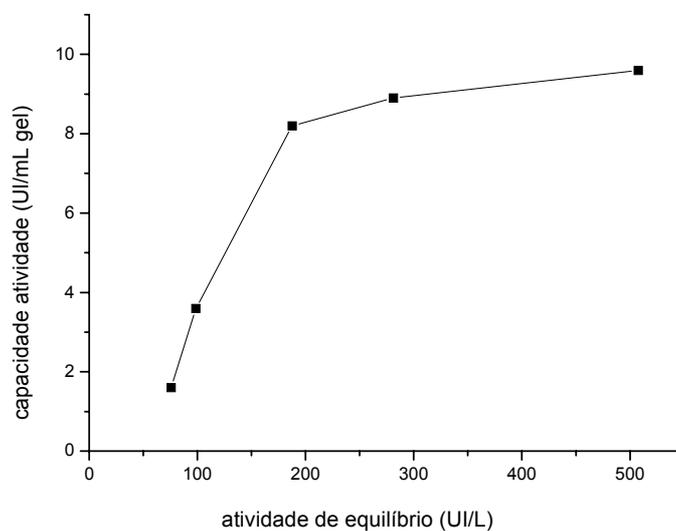


Figura 4.30. Isoterma de adsorção de PGA de *E. coli* (T. ambiente, pH = 4,8)

A isoterma de adsorção de PGA foi determinada utilizando o extrato enzimático. Após o ajuste do pH para 4,8, o extrato enzimático foi centrifugado novamente para descartar as proteínas que precipitaram no ajuste de pH. Portanto, a isoterma apresentada na Figura 4.30 representa uma condição ideal. Contudo, o objetivo de realizar a adsorção em leite expandido é justamente fornecer um caldo de fermentação bruto, contendo as células ou os fragmentos celulares. No caso da PGA de *E. coli*, que é uma enzima intracelular, é necessário, inicialmente, realizar a ruptura do microrganismo, o qual resultará em fragmentos celulares. Dessa forma, determinaram-se novamente as isotermas de adsorção na presença desses fragmentos. As condições testadas foram:

Isoterma 1: Homogenato + precipitado do ajuste do pH (Tabela 4.79)

Isoterma 2: Extrato enzimático + precipitado do ajuste do pH (Tabela 4.80 – centrifugado 1 vez)

Isoterma 3: Extrato enzimático (Tabela 4.81 - centrifugado 2 vezes)

Tabela 4.79. Resultados obtidos na determinação da isoterma de adsorção de PGA de *E. coli* (homogenato + precipitado do ajuste do pH)

Amostras	Tempo (min)	Atividade (UI/L)	Proteínas (g/L)	Ads. (UI)	Ads. mg)	q (UI/mL gel)	Q (mg/mL gel)
1.1	0	1374.1	8.0	0.6	4	1.2	8
	20	1374.1	7.1				
	120	1367.4	7.6				
	150	1313.5	7.6				
1.2	0	936.3	5.7	0.8	9	1.6	18
	20	789.8	5.2				
	120	841.9	4.8				
	150	858.8	4.8				
1.3	0	687.1	4.4	1.1	6	2.2	12
	20	471.5	4.2				
	120	559.9	3.8				
	150	580.9	3.8				
1.4	0	319.9	2.4	1.2	8	2.4	16
	20	167.5	2.1				
	120	193.7	1.9				
	150	197.9	1.6				
1.5	0	168.4	1.4	1.3	7	2.6	14
	20	48.0	0.9				
	120	44.6	0.8				
	150	37.0	0.7				

Tabela 4.80. Resultados obtidos na determinação da isoterma de adsorção de PGA de *E coli* (extrato enzimático + precipitado do ajuste do pH)

Amostras	Tempo (min)	Atividade (UI/L)	Proteínas (g/L)	Ads. (UI)	Ads. (mg)	q (UI/mL gel)	q (mg/mL gel)
2.1	0	1316.9	8.8	1.7	23	3.4	46
	20	1131.6	6.9				
	120	1161.9	7.0				
	150	1146.8	6.5				
2.2	0	875.7	5.5	2.3	10	4.6	20
	20	623.1	5.4				
	120	636.5	4.6				
	150	648.3	4.5				
2.3	0	626.4	4.7	2.4	16	4.8	32
	20	382.3	4.0				
	120	381.4	3.2				
	150	384.8	3.1				
2.4	0	282.9	2.5	2.0	12	4.0	24
	20	112.8	2.0				
	120	89.3	1.3				
	150	82.5	1.3				
2.5	0	166.7	1.0	1.5	4	3.0	8
	20	35.4	0.8				
	120	15.9	0.7				
	150	12.6	0.6				

Tabela 4.81. Resultados obtidos na determinação da isoterma de adsorção de PGA de *E. coli* (extrato enzimático)

Amostras	Tempo	Atividade (UI/L)	Proteínas (g/L)	Ads. (UI)	Ads. (mg)	q (UI/mL gel)	q (mg/mL gel)
3.1	0	1104,7	5.0	4,4	10	8,8	20
	20	910.2	4.0				
	120	665,3	4.0				
	150	665,3	4.0				
3.2	0	700.5	3.6	3,7	11	7,3	22
	20	430.3	2.8				
	120	332,6	2.6				
	150	332,6	2.5				
3.3	0	541.4	2.4	3.2	7	6.4	14
	20	212.2	1.8				
	120	223.9	1.8				
	150	223.1	1.7				
3.4	0	277.0	1.2	2.4	6	4.8	12
	20	47.5	0.9				
	120	40.4	0.6				
	150	41.3	0.6				
3.5	0	140.6	0.6	1.3	4	2.6	8
	20	11.8	0.2				
	120	5.9	0.2				
	150	10.1	0.2				

Na Figura 4.31 tem-se a comparação da capacidade de adsorção versus atividade de equilíbrio para a PGA contida nas três soluções diferentes.

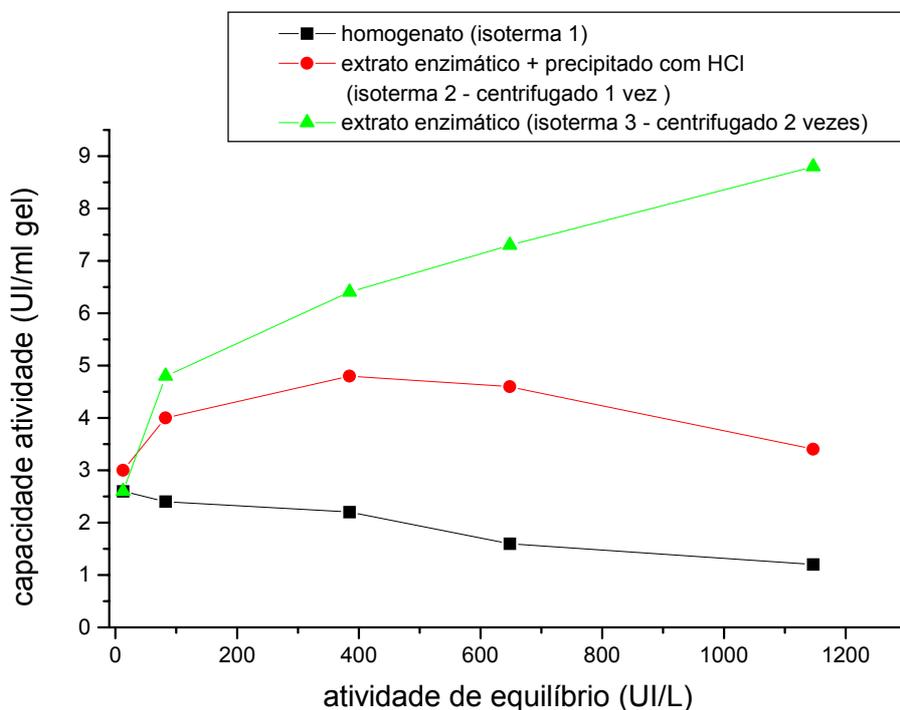


Figura 4.31. Comparação das isotermas de adsorção determinadas para a PGA de *E. coli* contida em 3 soluções diferentes.

Pode-se observar na Figura 4.31 e nas Tabelas 4.79, 4.80 e 4.81 que tanto os fragmentos celulares como o precipitado de proteínas interferiram na capacidade de adsorção da PGA no adsorvente. Estes resultados estão de acordo com os obtidos na literatura (Lin et al.,2001; Shepard et al.,2001;Calado et al.,2002.) e mostram uma possível interação dos fragmentos celulares e de outras proteínas no adsorvente diminuindo dessa maneira a capacidade de adsorção da PGA.

Cabe observar, que as isotermas de adsorção para a PGA contidas no homogenato e no extrato enzimático com proteínas precipitadas (isoterma 1 e 2 – Figura 4.31) além de apresentarem uma menor capacidade de adsorção também apresentaram um comportamento diferente. Para o caso onde a PGA se encontra em um meio mais puro (isoterma 3 – Figura 4.31 e Figura 4.30) foi verificado um comportamento seguindo a isoterma de Langmuir. As isotermas 1 e 2 apresentam um aumento da capacidade de adsorção para soluções mais diluídas. Esse

resultado pode ser explicado pelo fato de que quando diluímos essas soluções estamos diluindo os fragmentos celulares e as proteínas precipitadas, ocasionando desta maneira uma melhor interação da PGA no adsorvente.

Convém salientar, que para todas as isotermas obtidas tentou-se ajustar aos pontos experimentais obtidos os modelos de isotermas de Langmuir, Freundlich e Linear, visando a discriminação do modelo que melhor representasse a cinética de adsorção de PGA na resina Streamline-SP. No entanto, os coeficientes de correlação do ajuste não foram bons e não serão apresentados aqui. É de interesse lembrar que o objetivo maior de realizar as isotermas era a comparação da capacidade de adsorção da PGA nas resinas para as três condições testadas.

#### 4.6.2.1.3 Seleção da força iônica

Conforme já mencionado no item 2.5.4.1 a condutividade da solução interfere na adsorção da enzima no adsorvente. Dessa maneira resolveu-se testar diferentes molaridades do tampão diluente (20 e 10mM), diluição da solução e o fato da solução estar clarificada ou ainda conter os fragmentos celulares (homogenato). O esquema desses ensaios juntamente com a condutividade dessas soluções está apresentado na Tabela 4.82 e os resultados obtidos nesses ensaios na Tabela 4.83.

Tabela 4.82. Condições utilizadas nos ensaios de seleção da força iônica

Ensaio	Condições	Condutividade (mS/cm)
1S	Clarificado 20mM, diluído 2x	4,5
2S	Clarificado 20mM, diluído 4x	3,8
3S	Clarificado 10mM, diluído 2x	2,7
4S	Clarificado 10mM, diluído 4x	2,3
5S	Homogenato 20mM, diluído 4x	3,9
6S	Homogenato 10mM, diluído 4x	2,4

Tabela 4.83. Resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de *E. coli* na resina Streamline-SP em diferentes condutividades

Amostras (condutividade) mS/cm	T (min)	Atividade (UI/L)	Proteínas (g/L)	Ads. (UI)	Ads. (mg)	q (UI/mL gel)	Q (mg/mL gel)
1S (4,5)	0	481,6	1.5	4	7	8	14
	20	80.8	1.1				
	120	80.8	0.8				
	150	80.8	0.8				
2S (3,8)	0	202.1	0.9	2	5	4	10
	20	33.7	0.5				
	120	20.2	0.4				
	150	3.4	0.4				
3S (2,7)	0	550.7	1.4	5,3	10	10,6	20
	20	19.4	0.6				
	120	14.3	0.4				
	150	19.4	0.4				
4S (2,3)	0	277.0	0.7	2,8	6	5,6	12
	20	7.6	0.2				
	120	2.0	0.1				
	150	0	0.1				
5S (3,9)	0	545.6	2.4	3.4	11	6.8	22
	20	208.8	1.9				
	120	205.4	1.4				
	150	205.4	1.3				
6S (2,4)	0	575.9	2.1	2,7	9	5.4	18
	20	548.9	1.8				
	120	313.2	1.2				
	150	306.5	1.2				

A análise dos resultados obtidos (Tabela 4.83) nos permite concluir que para condutividades menores tem-se uma capacidade de adsorção ligeiramente maior (comparação dos ensaios 1S com 3S e 2S com 4S), isso para quando

estamos comparando soluções clarificadas. Agora, quando comparamos a influência da força iônica para soluções não clarificadas (homogenatos) observa-se um efeito contrário, ou seja, uma maior condutividade resulta em maior capacidade de adsorção. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que as cargas elétricas dos fragmentos celulares no homogenato são neutralizadas com forças iônicas superiores 10mM.

Devido à diferença na adsorção não ser muito significativa optou-se por realizar os ensaios na coluna em leito expandido utilizando-se força iônica de 20mM a fim de comparar com os processos de adsorção já realizados até o momento.

#### 4.6.2.1.4 Adsorção contínua

Após ter investigado as condições de adsorção de PGA no adsorvente Streamline<sup>®</sup> SP ( pH; isothermas de adsorção ; força iônica; capacidade de adsorção em diferentes soluções) passou-se a realizar a adsorção de modo contínuo. Esse modo de operação foi estudado para 3 casos diferentes:

- 1- Alimentação de clarificado em leito expandido
- 2- Alimentação de clarificado em leito fixo
- 3- Alimentação de homogenato em leito expandido

O objetivo de se realizar a adsorção de PGA em leito expandido e em leito fixo foi comparar a eficiência dos dois processos e também verificar se o leito expandido atingiria a fluidização e a estabilidade (caso 1 e 2). No caso do homogenato em leito expandido pretendíamos verificar o efeito dos fragmentos celulares na capacidade de adsorção de PGA e na estabilidade do leito.

A capacidade de ligação dinâmica para o caso de adsorção contínua é definida como a quantidade de enzima adsorvida dividida pelo volume de adsorvente, que é representado por (Ghose e Chase 2000 apud Calado, 2001):

$$q = \frac{1}{V_S} \left[ A_0 (V_E - V_0) - \int_{V_0}^{V_E} A(t) . dV \right] \text{ Equação 4.1}$$

Onde  $q$  é a capacidade de ligação dinâmica,  $V_s$  o volume de leito empacotado,  $V_0$  o volume morto total,  $V_E$  é o volume do eluente medido pelo fluxo de alimentação e  $A(t)$  é a concentração de enzima que sai da coluna.

Os resultados obtidos para os três casos estudados são apresentados nas Tabelas 4.84 ; 4.85 ; 4.86 respectivamente. As Figuras 4.32; 4.33 e 4.34 mostram o comportamento da atividade em função do volume total do processo (volume de alimentação, lavagem e eluição). As condições utilizadas são detalhadas anteriormente à cada Tabela.

### **Caso 1 – Alimentação de clarificado em leito expandido**

Vazão de adsorção = 5mL/min

Vazão de eluição = 2,5 mL/min

Volume de suporte = 8mL

Altura inicial da coluna com o suporte = 8,5 cm

Altura final da coluna com o suporte expandido = 16cm

Volume total de clarificado (extrato enzimático) = 90 mL

Volume morto = 15mL

Tabela 4.84. Resultados obtidos na adsorção contínua em leito expandido de PGA de *E. coli* em solução clarificada

Etapa	Amostras (min)	A.E (UI/L)	C.P (g/L)	A.Esp. (UI/g proteínas)	V (mL)	A/A0	P/P0	F.P
Adsorção	E0	528,8	1,3	406,8	90	1	1	
	S(1)	0	0	0,0	5	0	0	0
	S(3)	0	0	0,0	15	0	0	0
	S(5)	0	0,4	0,0	25	0	0,3	0
	S(7)	11,0	0,5	22,0	35	0,02	0,4	0,05
	S(9)	15,1	0,6	25,2	45	0,03	0,5	0,06
	S(11)	24,4	0,6	40,7	55	0,05	0,5	0,1
	S(13)	15,1	0,6	25,2	65	0,03	0,5	0,06
	S(15)	20,2	0,6	33,7	75	0,04	0,5	0,08
	S(18)	16,8	0,6	28,0	90	0,03	0,5	0,07
Lavagem	L(21)	0	0,4	0,0	105			0
	L(24)	0	0,1	0,0	120			0
	L(28)	0	0	0,0	140			0
	L(32)	0	0	0,0	160			0
	L(37)	0	0	0,0	185			0
Eluição	El (39)	0	0	0,0	190			0
	El (41)	2963,8	0,8	3704,8	195			9,1
	El (43)	3570,1	1,8	1983,4	200			4,9
	El (46)	707,3	0,7	1010,4	207,5			2,5
	El (49)	427,7	0,4	1069,3	215			2,6
	El (52)	203,8	0,3	679,3	222,5			1,7
	El (62)	18,5	0	0,0	247,5			0
	El (67)	0	0	0,0	260			0

A.E = atividade enzimática, C.P = concentração de proteínas, V = volume

F.P = fator de purificação

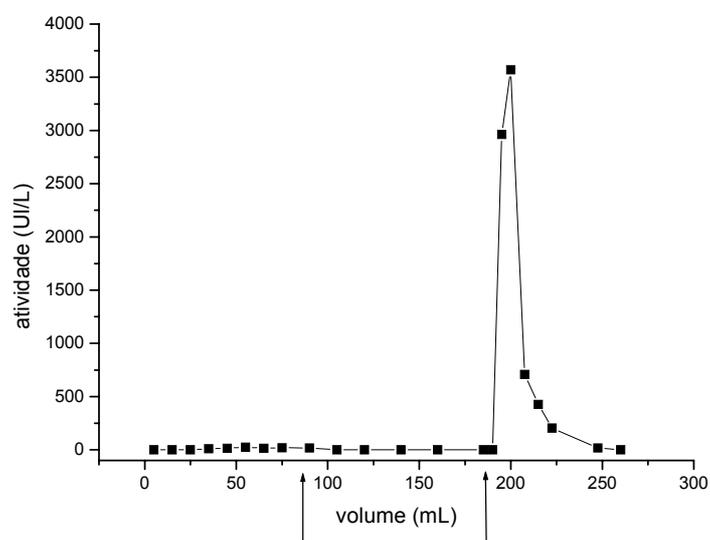


Figura 4.32. Comportamento da atividade versus volume total do processo (caso 1)

### Caso 2 – Alimentação de clarificado em leito fixo

Vazão de adsorção = 5mL/min

Vazão de eluição = 2,5 mL/min

Volume de suporte = 8mL

Altura inicial da coluna com o suporte = 8,5 cm

Volume total de clarificado (extrato enzimático) = 90 mL

Volume morto = 10mL

Tabela 4.85. Resultados obtidos na adsorção contínua em leito fixo de PGA de *E. coli* em solução clarificada

Etapa	Amostras (min)	A.E (UI/L)	C.P (g/L)	A.Esp (UI/g proteínas)	V (mL)	A/A0	P/P0	F.P
Adsorção	E0	599,5	1,6	374,7	90	1	1	
	S(1)	10,1	0	0,0	5	0,02	0	0
	S(3)	19,4	0,7	27,7	15	0,03	0,4	0,07
	S(5)	19,4	0,7	27,7	25	0,03	0,4	0,07
	S(7)	19,4	0,7	27,7	35	0,03	0,4	0,07
	S(9)	26,1	0,7	37,3	45	0,04	0,4	0,1
	S(11)	26,1	0,7	37,3	55	0,04	0,4	0,1
	S(13)	26,1	0,8	32,6	65	0,04	0,5	0,08
	S(15)	32,0	0,8	40,0	75	0,05	0,5	0,1
S(19)	32,0	0,8	40,0	95	0,05	0,5	0,1	
Lavagem	L(22)	15,1	0	0,0	110			0
	L(26)	7,5	0	0,0	130			0
	L(30)	7,5	0	0,0	150			0
	L(34)	7,5	0	0,0	170			0
	L(38)	5,1	0	0,0	190			0
Eluição	El (40)	0	0	0,0	195			0
	El (42)	287,9	0,2	1439,5	200			3,84
	El (44)	4371,7	1,3	3362,8	205			9,0
	El (47)	1353,9	1,1	1230,8	212,5			3,3
	El (50)	562,4	0,7	803,4	220			2,1
	El (53)	266,1	0,4	665,3	227,5			1,8
	El (63)	34,5	0	0,0	252,5			0
	El (68)	12,6	0	0,0	265			0

A.E = atividade enzimática, C.P = concentração de proteínas, V = volume

F.P = fator de purificação

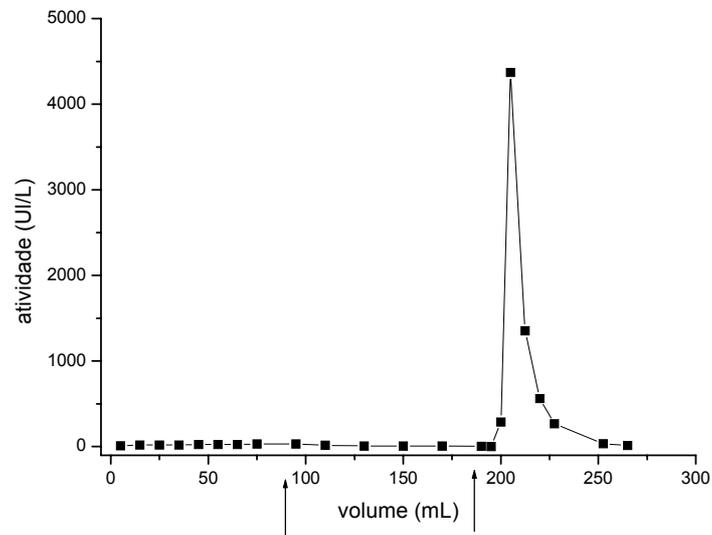


Figura 4.33. Comportamento da atividade versus volume total do processo (caso 2)

### Caso 3 – Alimentação de homogenato em leito expandido

Vazão de adsorção = 5mL/min

Vazão de eluição = 2,5 mL/min

Volume de suporte = 8mL

Altura inicial da coluna com o suporte = 8,5 cm

Altura final da coluna com o suporte expandido = 22 cm

Volume total de clarificado (extrato enzimático) = 90 mL

Volume morto = 15mL

Tabela 4.86. Resultados obtidos na adsorção contínua em leito expandido de PGA de *E. coli* em solução não clarificada (homogenato)

Etapa	Amostras (min)	A.E (UI/L)	C.P (g/L)	A.Esp (UI/g proteínas)	V (mL)	A/A0	P/P0	FP
Adsorção	E0	1229,3	3,3	372,5	90	1	1	1
	S(1)	0	0	0,0	5	0	0	0
	S(3)	0	0	0,0	15	0	0	0
	S(5)	323,3	1,7	190,2	20	0,3	0,5	0,5
	S(7)	415,1	2,2	188,7	30	0,3	0,7	0,5
	S(9)	506,9	2,3	220,4	40	0,4	0,7	0,6
	S(11)	581,8	2,3	253,0	50	0,5	0,7	0,7
	S(13)	634,9	2,6	244,2	60	0,5	0,8	0,7
	S(15)	682,0	2,5	272,8	70	0,6	0,8	0,7
	S(18)	733,4	2,5	293,4	85	0,6	0,8	0,8
Lavagem	L(21)	410,9	1,8	228,3	100			0,6
	L(24)	226,5	0,9	251,7	115			0,7
	L(28)	61,5	0,3	205,0	135			0,6
	L(32)	21,9	0,1	219,0	155			0,6
	L(36)	9,3	0	0,0	175			0
	L(45)	0	0	0,0	220			0
Eluição	El (47)	0	0	0,0	225			0
	El (49)	6419,4	1,1	5835,8	230			15,7
	El (51)	2721,3	0,9	3023,7	235			8,1
	El (54)	996,9	0,5	1993,8	237,5			5,3
	El (57)	493,4	0,4	1233,5	245			3,3
	El (60)	270,3	0,3	901,0	252,5			2,4
	El (70)	47,1	0,1	471,0	277,5			1,3
	El (75)	19,4	0	0,0	290			0

A.E = atividade enzimática, C.P = concentração de proteínas, V = volume

F.P = fator de purificação

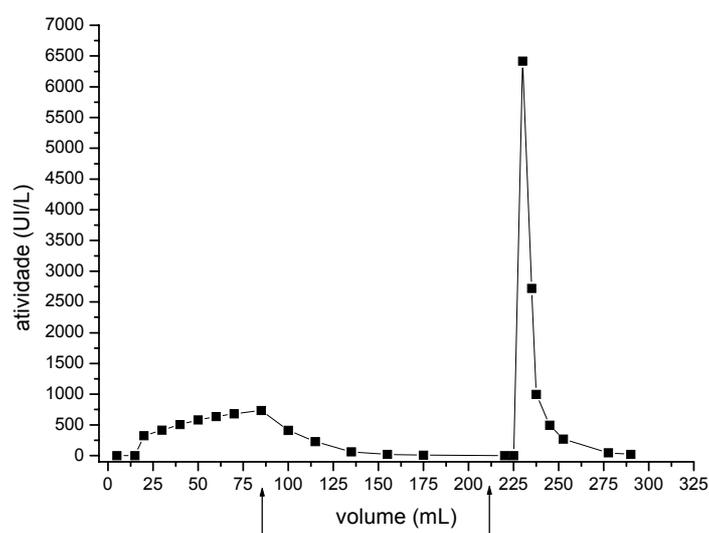


Figura 4.34. Comportamento da atividade versus volume total do processo (caso 3)

A capacidade de ligação dinâmica para os três casos foi calculada segundo a equação 1 e os valores encontrados foram: 5,0 ; 6,3 ; 3,7 UI/mL suporte. O fato do homogenato ser alimentado com uma concentração inicial de enzima maior que as demais soluções impossibilita fazer uma análise comparativa da capacidade de ligação para o caso 1 e 3. Com relação aos clarificados, os valores encontrados de capacidade de adsorção foram próximos para os dois leitos (expandido e fixo). Os rendimentos de recuperação global obtidos foram de 90, 75 e 54% para os três casos respectivamente. Esses diferentes rendimentos mostram que existe interferência dos fragmentos celulares e das proteínas precipitadas na adsorção de PGA.

Ainda para os clarificados foi encontrado fatores de purificação de até 9 vezes, enquanto para o homogenato foram encontrados fatores de aproximadamente 16 vezes. Esse maior grau de purificação se deve ao fato de alimentar com uma solução com maior quantidades de impurezas. No caso dos clarificados, além de retirar os fragmentos celulares também se centrifugava a solução após ajuste do pH. No processo de ajuste de pH já ocorre uma pré - purificação pois ocorre precipitação de proteínas ocasionado pelo baixo pH e a centrifugação elimina essas proteínas.

#### **4.7. Purificação e concentração de penicilina G acilase de *B. megaterium* ATCC 14945**

Os primeiros estudos relacionados com a purificação e concentração de PGA de *B. megaterium* foram realizados pela aluna de iniciação Noemia E. G. Fermoselli. A aluna aperfeiçoou as técnicas estudadas por nós durante o mestrado, que foram diálise, concentração com sacarose e precipitação com solventes orgânicos. O estudo se concentrou mais na técnica de precipitação com solventes, embora tenham sido realizados alguns testes referentes às outras 2 técnicas. As melhores condições encontradas pela pesquisadora foram aplicadas neste trabalho. Há que se salientar que os resultados encontrados por Fermoselli foram obtidos utilizando o meio contendo caseína hidrolisada (51,4 g/L) e soro de queijo (19,6 g/L). Já para os processos apresentados a seguir utilizou-se o novo meio de cultivo, que é composto de aminoácidos (10 g/L) e soro de queijo (19,6 g/L).

Além das técnicas de diálise e precipitação por etanol, também aplicou-se microfiltração, ultrafiltração e a adsorção em leito expandido. A ultrafiltração foi escolhida com o objetivo de concentrar os grandes volumes de caldo obtidos quando se realiza cultivo em biorreator (4,5 L). Micro e ultrafiltração são técnicas adequadas para grandes volumes enquanto que a técnica de concentração por sacarose, estudada durante o mestrado, é muito eficiente mas inviável de aplicar para volumes maiores.

##### **4.7.1. Microfiltração**

A técnica de microfiltração foi realizada previamente à aplicação de ultrafiltração, diálise e precipitação com solventes orgânicos com o objetivo de remover a massa celular dos caldos de cultivos. O tamanho de poro da membrana foi de 0,45  $\mu\text{m}$ . Foram realizados ensaios em triplicata para verificar a reprodutibilidade do método. Tanto a atividade enzimática como a concentração de proteínas foram medidas antes e após o processo para acompanhamento da técnica. Os resultados referentes a essa etapa estão apresentados na Tabela 4.87.

Tabela 4.87. Resultados obtidos na etapa de microfiltração

Ensaio	C.P inicial Lowry (g/L)	C.P final Lowry (g/L)	C.P inicial Bradford (g/L)	C.P final Bradford (g/L)	A.E inicial (UI/L)	A.E. Final (UI/L)
1	3,0	3,0	0,43	0,41	200	170
2	2,7	2,6	0,39	0,34	171	161
3	3,6	3,4	0,6	0,6	169	170

C.P = concentração de proteínas; A.E = atividade enzimática

A concentração de proteínas ao longo da técnica foi acompanhada pelo método de Lowry e Bradford. O método de Lowry dosa aminoácidos e peptídeos, e o método de Bradford só dosa peptídeos acima de 5000 Da de peso molecular. Desta forma, quando ocorre uma diminuição de concentração de proteínas pelo método de Bradford, esta deve estar relacionada com a perda de PGA ou com as proteínas do soro, pois o meio de cultivo é constituído de aminoácidos e soro de queijo.

Os resultados apresentados na Tabela 4.87 permitem-nos observar que ocorreu uma pequena perda de atividade enzimática para o ensaio 1, contudo essa perda não é significativa e é possível de acontecer, uma vez que pode ocorrer adsorção da enzima na membrana ou até mesmo na massa celular aderida na membrana.

A recuperação da enzima no final do processo e os resultados similares para as triplicatas mostram que a técnica foi satisfatória para o objetivo proposto. Desta maneira, a partir do caldo livre de microrganismos iniciaram-se os processos de purificação e concentração propriamente ditos.

#### 4.7.2. Ultrafiltração

Como já explicado anteriormente, o volume de meio gerado em biorreator é muito grande (4,5L) e portanto, a ultrafiltração foi selecionada para concentrar o caldo. A curva de corte da membrana foi de 10.000 Da e a pressão de trabalho foi de 2 kgf/cm<sub>2</sub>. A técnica foi acompanhada pela medida das proteínas e da

atividade enzimática. Os resultados obtidos na primeira ultrafiltração estão mostrados na Tabela 4.88.

Tabela 4.88. Resultados obtidos na ultrafiltração realizada a temperatura ambiente

	V (mL)	F. C	A.E (UI/L)	F.C	C.P <sub>1</sub> (g/L)	F.C	C.P <sub>2</sub> (g/L)	F.C	A.Esp * (UI/g proteínas)	F.P
Inicial	3100		160		3,0		0,42		53,3	
Final	220	14	1100	6,9	10,5	3,5	6,0	14,3	104,8	2,0

C.P1 = Concentração de proteínas medida pelo método de Lowry; C.P2 = Concentração de proteínas medida pelo método de Bradford

F.C = Fator de concentração

F.P = Fator de purificação (atividade específica final/atividade específica inicial)

\* Proteínas medida pelo método de Lowry na atividade específica

Os resultados nos mostram que a técnica de ultrafiltração conseguiu concentrar até 14 vezes o volume do caldo. Este é um bom resultado, uma vez que se passou a trabalhar com um volume de caldo bem menor.

Agora, analisando-se os resultados de concentrações de proteínas (por Bradford) e da atividade enzimática pode-se concluir que ocorreu uma desnaturação da enzima. Conseguiu-se concentrar toda a massa protéica (inclusive PGA), porém ocorreu uma perda de aproximadamente 50% na atividade enzimática.

Com relação ao baixo fator de concentração obtido na dosagem de proteínas pelo método de Lowry já era esperado, uma vez que os aminoácidos contidos no meio conseguem permear a membrana de ultrafiltração.

Devido ao baixo fator de concentração obtido na atividade enzimática em relação ao obtido em termos de volume, decidiu-se realizar a ultrafiltração a frio. Uma explicação para a desnaturação ocorrida seria o super-aquecimento da solução ocasionado pela bomba. Desta forma, o caldo a ser ultrafiltrado ficou submerso em um recipiente com gelo. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.89.

Tabela 4.89. Resultados obtidos na ultrafiltração realizada em banho de gelo

	V (mL)	F. C	A.E (UI/L)	F.C	C.P <sub>1</sub> (g/L)	F.C	C.P <sub>2</sub> (g/L)	F.C	A.Esp * (UI/g proteínas)	F.P
Inicial	3700		163		2,5		0,36		65,2	
Final	280	13,2	1374	8,4	8,7	3,5	4,96	13,7	157,9	2,4

C.P1 = Concentração de proteínas medida pelo método de Lowry; C.P2 = Concentração de proteínas medida pelo método de Bradford

F.C = Fator de concentração

F.P = Fator de purificação (atividade específica final/atividade específica inicial)

\* Proteínas medida pelo método de Lowry na atividade específica

Pela Tabela 4.89, observa-se que o fator de concentração da atividade enzimática aumentou em relação a ultrafiltração anterior (Tabela 4.88). Este resultado nos indica que a temperatura é uma variável a que se deve estar atento, fato este a que não tínhamos dado importância inicialmente.

Quanto à concentração das proteínas, foram obtidos os mesmos fatores de concentração, mostrando boa eficiência na membrana para retenção da proteína.

Em virtude da constatação que a temperatura influencia na técnica de ultrafiltração resolveu-se realizar esse processo tomando maior cuidado com essa variável. Primeiramente, o caldo a ser ultrafiltrado ficou mantido na câmara fria a 4°C, e somente após atingir essa temperatura é que o mesmo ficou submerso no banho de gelo para então começarmos o processo. Os resultados são apresentados na Tabela 4.90.

Tabela 4.90. Resultados obtidos na ultrafiltração realizada a 4°C

	V (mL)	F. C	A.E (UI/L)	F.C	C.P <sub>1</sub> (g/L)	F.C	C.P <sub>2</sub> (g/L)	F.C	A.Esp * (UI/g proteínas)	F.P
Inicial	4200		170		3,4		0,6		50,0	
Final	380	11	1541	9	11,9	3,5	7,2	12	129,5	2,6

C.P1 = Concentração de proteínas medida pelo método de Lowry; C.P2 = Concentração de proteínas medida pelo método de Bradford

F.C = Fator de concentração

F.P = Fator de purificação (atividade específica final/atividade específica inicial)

\* Proteínas medida pelo método de Lowry na atividade específica

Os resultados obtidos nesse etapa vieram a confirmar a importância da temperatura. Como se pode observar, houve somente uma pequena perda de atividade enzimática (o fator de concentração da atividade foi próximo do fator de concentração em volume). Em relação ao fator de concentração de proteínas por Bradford obtivemos um valor maior do que o volume concentrado. No entanto, essa diferença pode ser explicada pelas pequenas variações que ocorrem nas manipulações laboratoriais. Esses resultados obtidos nos mostram que a técnica de ultrafiltração mostrou-se eficiente para concentração da enzima produzida.

### 4.7.3. Diálise

A diálise foi realizada para um caldo micro/ultrafiltrado com o intuito de verificar a influência da diálise prévia na técnica de precipitação por etanol. Conforme já explicado no item 2.5.1 a diálise permite a retirada de solutos de baixo peso molecular e a retenção das moléculas protéicas. O fato de retirar moléculas do meio faz com que se altere a solubilidade das proteínas e conseqüentemente, a precipitação das mesmas. É neste sentido, inclusive, que se realizou a diálise, onde se pretendia verificar se haveria efeito positivo ou não na etapa de precipitação por solventes.

De acordo com os resultados obtidos por Noemia E. G. Feroselli, o fato de realizar diálise antes de aplicar a técnica de precipitação por etanol melhorou significativamente ( de 16% para 39%) a atividade recuperada. Nós resolvemos testar novamente essa variável devido à mudança do meio de cultivo. Os resultados da diálise são apresentados na Tabela 4.91.

Tabela 4.91. Resultados obtidos na diálise do caldo de cultivo micro/ultrafiltrado

	Atividade (UI/L)	pH	Proteínas Lowry (g/L)	Proteínas Bradford (g/L)	A.Esp * (UI/g proteínas)	F.P
Inicial	1100	9,3	10,5	6,0	104,8	
Final	751	7,0	6,3	4,0	119,2	1,1

F.P = Fator de purificação (atividade específica final/atividade específica inicial)

\* Proteínas medida pelo método de Lowry na atividade específica

Para as análises realizadas (atividade e proteínas) ocorreu uma queda na concentração. A redução da concentração protéica mostra que está ocorrendo uma parcial purificação do caldo, como era o desejado. Quanto à atividade enzimática, o decréscimo de aproximadamente 30% foi o mesmo obtido por Noemia E. G. Feroselli quando utilizou o outro meio de cultivo para produção de PGA. Esses resultados também estão coerentes com os relatados na literatura, como apresentado no item 2.5, onde Balasingham et al., 1972, apresentam uma perda de 24% na atividade recuperada após realizar a diálise.

#### **4.7.4. Precipitação com solventes orgânicos**

Para todos os meios resultantes das técnicas anteriores aplicadas (microfiltração, micro/ultrafiltração e micro/ultrafiltração/diálise) foram realizados ensaios de precipitação com solventes orgânicos. Os ensaios a seguir tinham como objetivo estudar o efeito da concentração de PGA (comparação do meio microfiltrado com o micro/ultrafiltrado) e também da concentração dos nutrientes de baixo peso molecular (comparação do meio micro/ultrafiltrado com o meio micro/ultrafiltrado/dialisado) na eficiência da técnica de precipitação. Os resultados são apresentados na Tabela 4.92 e o efeito das variáveis nos parâmetros de precipitação quantificados na Tabela 4.93.

As condições operacionais utilizadas nesse processo foram 4 volumes de etanol para cada volume de solução de enzima, vazão inicial do etanol de 0,03 mL/s, correspondente a 22 mL de etanol em 12 minutos e 0,25mL/s para os 98 mL restante em aproximadamente 6,6 minutos (condições otimizadas por Noemia E. G. Feroselli).

Nota-se na Tabela 4.92 que são apresentados dois valores de atividades iniciais para os respectivos pH's. Essas diferentes atividades encontradas para o mesmo meio foi consequência do ajuste do pH do caldo com HCl. Os melhores resultados encontrados por Noemia E. G. Feroselli na precipitação com solventes foi quando se utilizou soluções com pH = 6. Desta forma, antes de iniciarmos o processo de precipitação, ajustou-se o pH dos meios para 6, o qual ocasionou um decréscimo na atividade enzimática.

O motivo da queda observada não estava claro. Uma possibilidade era que estivesse havendo variação do pH durante a reação de hidrólise de Penicilina G (medida da atividade enzimática) devido aos diferentes pH's iniciais do caldo. O que se pode verificar é que o tampão utilizado para o preparo da solução de Penicilina G mantém o pH reacional constante, indicando desta maneira que houve realmente decréscimo na atividade, provavelmente devido à desnaturação da enzima provocada pelo ácido clorídrico utilizado para ajuste do pH do caldo.

Tabela 4.92. Resultados obtidos na precipitação com solventes orgânicos para caldos de cultivos oriundos após a aplicação de diferentes técnicas (M = microfiltrado; M/U = micro/ultrafiltrado e M/U/D = micro/ultrafiltrado/dialisado).

Ensaio	V sol ml	Vi mL	Vf mL	F.C	A.E <sub>i</sub> (UI/L)		A.E <sub>f</sub> UI/L	Cpi <sup>1</sup> g/L	Cpf <sup>1</sup> g/L	Cpi <sup>2</sup> g/L	Cpf <sup>2</sup> g/L
					pH *	pH 6					
1 M	120	30	3	10	177	67	243	3,0	3,3	0,41	2,26
2 M/U	120	30	4	7,5	1100	602	1223	10,5	24,2	6,0	20,3
3 M/U/D	120	30	3	10	751	630	1350	6,3	6,5	4,0	5,26

\* pH sem ajuste (em torno de 9);

Cpi/Cpf<sup>1</sup> = Concentração inicial/final de proteínas medida pelo método de Lowry

Cpi/Cpf<sup>2</sup> = Concentração inicial/final de proteínas medida pelo método de Bradford

A.E<sub>i</sub> = atividade enzimática inicial; A.E<sub>f</sub> = atividade enzimática final

Tabela 4.93. Efeito das variáveis nos parâmetros de precipitação quantificados

	Vi ML	Vf mL	F. C	Mpi <sup>1</sup> total (mg)	Mpf <sup>1</sup> total (mg)	Prpp	Mpi <sup>2</sup> total (mg)	Mpf <sup>2</sup> total (mg)	Prpp (%)	A.Er (%)	A.Esp UI/g	F.P
1	30	3	10	90	9,9	11	12	7	58	36	107,5	0,7
2	30	4	7,5	315	97	31	180	80	45	27	60,3	0,6
3	30	3	10	189	19,5	10	120	16	13	21	256,7	1,6

Mpi<sup>1</sup> / Mpf<sup>1</sup> = massa inicial/final de proteínas dosadas por Lowry

Mpi<sup>2</sup> / Mpf<sup>2</sup> = massa inicial /final de proteínas dosadas por Bradford

A.Esp = atividade específica (UI/ g de proteínas dosadas por Bradford)

Proteína total precipitada (prpp) = (Mpf/Mpi) x 100

Atividade enzimática recuperada (A.Er) = (A.E<sub>f</sub> x Vf / A.E<sub>i</sub> x Vi) x 100

Fator de purificação (F.P) = (atividade específica final/atividade específica inicial)

Os parâmetros que determinam a eficiência da técnica são a atividade enzimática recuperada (rendimento em atividade), e o fator de purificação. O parâmetro de mais interesse é a atividade enzimática recuperada, pois valores baixos para esse parâmetro significam perdas elevadas do produto (irreversivelmente). Quanto ao fator de purificação, mesmo que não tenha sido obtido valores altos, ainda há a possibilidade de se aplicarem outros métodos de purificação.

Tomando como base essas observações, podemos verificar na Tabela 4.93 que o ensaio 1 (caldo microfiltrado) foi o que apresentou melhores resultados, ou seja, maior recuperação de atividade. Além disso, quando comparamos o ensaio 1 com o ensaio 2 (caldo micro/ultrafiltrado) também conseguimos um maior grau de purificação. Embora tenhamos obtido melhores resultados com o caldo microfiltrado, essa diferença não é tão significativa a ponto de não utilizarmos a técnica de ultrafiltração, a qual permite grande concentração do caldo.

Com relação ao ensaio 3, onde o caldo micro/ultrafiltrado foi dialisado, podemos observar um grande aumento da atividade específica. Isso pode ser atribuído ao fato que na diálise ocorre uma grande perda dos aminoácidos/peptídeos que fazem parte do meio de cultivo e portanto, há uma menor concentração protéica no meio disponível para a precipitação. Noemia E. G. Feroselli quando estudou a diálise prévia à aplicação da técnica de

precipitação com solvente também verificou um aumento na atividade específica. No entanto, a pesquisadora observou um aumento na atividade recuperada, resultado não observado em nosso ensaio. Em nosso meio (aminoácidos ao invés de hidrolisado de caseína) ocorreu uma perda de 6% na atividade recuperada quando comparado com o ensaio 2 e 15% com o ensaio 1. Essa perda na atividade enzimática fez com que optássemos pela não realização de diálise anteriormente à precipitação nos demais caldos de cultivo.

Devido à queda da atividade ocorrida quando se ajusta o pH para 6 (com HCl) decidiu-se realizar as novas precipitações sem o ajuste do pH dos caldos. Desta forma, partiu-se de um pH de aproximadamente 9,3. Os resultados são apresentados na Tabela 4.94 e o efeito das variáveis nos parâmetros de precipitação quantificados na Tabela 4.95.

Tabela 4.94. Resultados obtidos na precipitação com solventes orgânicos para caldos de cultivo sem ajuste de pH ( M= microfiltrado; M/U =micro/ultrafiltrado)

Ensaio	V.sol (mL)	Vi (mL)	Vf (mL)	F. C	A.E <sub>i</sub> UI/L	A.E <sub>f</sub> UI/L	Cpi <sup>1</sup> (g/L)	Cpf <sup>1</sup> (g/L)	Cpi <sup>2</sup> (g/L)	Cpf <sup>2</sup> (g/L)
4 M	60	15	2	7,5	110	25	2,5	1,23	0,34	0,37
5 M/U	120	30	4,5	6,6	1257	375	8,7	14,63	4,96	12,7

Cpi/Cpf<sup>1</sup> = Concentração inicial/final de proteínas medida pelo método de Lowry

Cpi/Cpf<sup>2</sup> = Concentração inicial/final de proteínas medida pelo método de Bradford

A.E<sub>i</sub> = atividade enzimática inicial; A.E<sub>f</sub> = atividade enzimática final

Tabela 4.95. Efeito das variáveis nos parâmetros de precipitação quantificados

	Vi ML	Vf mL	F. C	Mpi <sup>1</sup> total (mg)	Mpf <sup>1</sup> Total (mg)	Prpp	Mpi <sup>2</sup> total (mg)	Mpf <sup>2</sup> total (mg)	Prpp (%)	A.Er (%)	A.Esp (UI/g)	F.P
4	15	2	7,5	40	2	5	5,1	0,7	14,6	3	67	0,2
5	30	4,5	6,6	260	66	25	149	57	38	4,5	30	0,1

Mpi<sup>1</sup> / Mpf<sup>1</sup> = massa inicial/final de proteínas dosadas por Lowry

Mpi<sup>2</sup> / Mpf<sup>2</sup> = massa inicial/final de proteínas dosadas por Bradford

A.Esp = atividade específica (UI/ g de proteínas dosadas por Bradford)

Proteína total precipitada (prpp) = (Mpf/Mpi) x 100

Atividade enzimática recuperada (A.Er) = (A.E<sub>r</sub> x Vf / A.E<sub>i</sub> x Vi) x 100

Fator de purificação (F.P) = (atividade específica final/atividade específica inicial)

Pode-se observar na Tabela 4.95 que houve uma queda muito brusca da atividade recuperada quando se alterou o pH. Os ensaios de precipitação em caldos com pH = 6 obtiveram uma recuperação na atividade de 36%, valor este muito superior ao encontrado aqui. Fica claro, portanto, que as perdas ocorridas pelo ajuste de pH são menores do que as obtidas quando se realiza a precipitação no caldo no seu próprio pH.

Assim, um detalhado estudo foi realizado sobre a aplicação da técnica de precipitação com solventes para a recuperação de PGA produzida por *B. megaterium*. Os valores obtidos mostram que a técnica, após otimização das variáveis, apresenta uma melhor recuperação da enzima (44%) quando a mesma está presente em meio contendo hidrolisado de caseína. Ao se utilizar a técnica, nas mesmas condições previamente otimizadas, para o novo meio (a.a – portanto mais puro) os resultados obtidos foram inferiores (média de 30%), mostrando que a alta concentração de peptídeos presentes no meio influenciaram positivamente na eficiência da técnica. O novo meio, contudo, é mais puro e conduz a melhores produções de enzima e será possivelmente o definitivo a ser usado.

#### **4.7.5. Adsorção em leito expandido**

A técnica de purificação adsorção em leito expandido aplicada para a PGA de *E. coli* também foi aplicada para a PGA de *B. megaterium*. No entanto, nesta etapa não foi possível investigar todas as variáveis estudadas para a PGA de *E. coli* devido ao menor tempo disponível e das dificuldades encontradas. Convém salientar, que como a PGA de *Bacillus megaterium* é uma enzima extracelular não é necessário realizar a ruptura celular para a obtenção da enzima.

Da mesma maneira que na adsorção de PGA de *E. coli*, primeiramente foram selecionadas as melhores condições de adsorção-desorção da enzima no adsorvente Streamline<sup>®</sup>SP para depois realizar a adsorção em leito expandido.

##### **4.7.5.1. Efeito do pH do caldo de cultivo na adsorção de PGA**

A primeira variável a ser testada no processo de adsorção foi o pH do meio onde a PGA se encontrava. A avaliação do efeito dessa variável foi através dos resultados de capacidade de adsorção de atividade e de proteína, do rendimento de operação e também do fator de purificação obtido (Tabela 4.97 )

O ajuste do pH do meio de cultivo foi feito com HCl para os seguintes valores: 4,0; 4,5 ; 4,9 ; 5,5 e 5,9 e a escolha foi baseada nos valores utilizados para PGA de *E. coli*. O suporte adsorvente também era estabilizado com tampão citrato 20mM no mesmo pH em estudo.

A Tabela 4.96 mostra os resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção para os diferentes pH's e a Tabela 4.97 mostra o efeito dessa variável nos parâmetros quantificados.

Tabela 4.96. Resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de *B. megaterium* na resina Streamline-SP nos diferentes pH's estudados Clarificado = solução enzimática no tempo zero; extrato = solução enzimática após passar pelo gel; lavagem = tampão utilizado para lavar o gel; eluído = tampão com NaCl utilizado para eluir a enzima.

Amostras (pH)	Atividade (UI/L)	Proteínas (g/L)	Atividade específica (UI/mg proteínas)
Clarificado (4)	528	1,2	0,44
Extrato (4)	207	1,1	0,19
Lavagem (4)	0	0	0
Eluído 1 (4)	0	0	0
Eluído 2 (4)	0	0	0
Clarificado (4,5)	510,8	1,3	0,39
Extrato (4,5)	189,2	1,1	0,17
Lavagem (4,5)	0	0	0
Eluído 1 (4,5)	0	0	0
Eluído 2 (4,5)	0	0	0
Clarificado (4,9)	526,6	1,4	0,38
Extrato (4,9)	245,9	1,2	0,20
Lavagem (4,9)	0	0	0
Eluído 1 (4,9)	0	0	0
Eluído 2 (4,9)	0	0	0
Clarificado (5,5)	631	1,5	0,42
Extrato (5,5)	541	1,4	0,39
Lavagem (5,5)	0	0,02	0
Eluído 1 (5,5)	0	0	0
Eluído 2 (5,5)	0	0	0
Clarificado (5,9)	623	1,5	0,41
Extrato (5,9)	532	1,4	0,38
Lavagem (5,9)	0	0,02	0
Eluído 1 (5,9)	0	0	0

Tabela 4.97. Efeito do pH nos parâmetros de adsorção quantificados

pH	q (UI/mL gel)	q (mg prot./mL gel)	R. eluição (%)	R. adsorção (%)	R. operação (%)	F.P1	F.P2
4,0	3,2	1	0	61	0	0	0
4,5	3,2	2	0	63	0	0	0
4,9	2,8	2	0	53	0	0	0
5,5	0,9	0,7	0	14	0	0	0
5,9	0,9	0,7	0	15	0	0	0

R = rendimento

F.P1= fator de purificação 1 (relacionado ao eluído 1)

F.P2 = fator de purificação 2 (relacionado ao eluído 2)

A análise dos resultados da Tabela 4.97 nos mostra que a adsorção da enzima ocorre de maneira similar para os pH's entre 4,0 a 4,9, não ocorrendo adsorção significativas nos pH's 5,5 e 5,9. Contudo, não foi possível detectar a eluição da enzima em nenhum dos pH's estudados. Esse resultado nos motivou a realizar novamente esse procedimento porém utilizando tampão eluente com força iônica maior e paralelamente com pH maior. O tampão eluente utilizado até o momento foi o tampão citrato 20mM, no pH em estudo com a adição de 150 mM de NaCl (conforme item 3.2.11.1). O pH escolhido para fazer esse estudo foi o pH 4, com tampão eluente pH = 4 e 600mM de NaCl e tampão eluente pH = 8 e 600 mM de NaCl. Esses resultados são apresentados na Tabela 4.98 e na Tabela 4.99 tem-se os parâmetros quantificados.

Tabela 4.98. Resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de *B. megaterium* na resina Streamline-SP utilizando diferentes tampões eluentes. Clarificado = solução enzimática no tempo zero; extrato = solução enzimática após passar pelo gel; lavagem = tampão utilizado para lavar o gel; eluído = tampão com NaCl utilizado para eluir a enzima.

Variável	Amostra	Atividade (UI/L)	Proteínas (g/L)	Atividade específica (UI/mg proteínas)
Tampão eluente pH =4 com 600mM de NaCl	Clarificado	553	1,2	0,44
	Extrato	207	1,1	0,17
	Lavagem	0	0	0
	Eluído 1	0	0	0
	Eluído 2	0	0	0
Tampão eluente pH =8 com 600mM de NaCl	Clarificado	553	1,3	0,43
	Extrato	207	1,2	0,17
	Lavagem	0	0	0
	Eluído 1	0	0	0
	Eluído 2	0	0	0

Tabela 4.99. Efeito do tampão eluente nos parâmetros de adsorção quantificados

Variável	Q (UI/mL gel)	q (mg prot/mL gel)	R. E. (%)	R. A. (%)	R.O. (%)	F.P1	F.P2
600 mM NaCl pH = 4	3,2	1	0	61	0	0	0
600 mM NaCl pH = 8	3,2	2	0	63	0	0	0

R. E. = rendimento de eluição R. A. = rendimento de adsorção

R. O. = rendimento de operação

F.P1= fator de purificação 1 (relacionado ao eluído 1)

F.P2 = fator de purificação 2 (relacionado ao eluído 2)

Como podemos observar na Tabela 4.99, o fato de substituímos o tampão eluente não resultou em melhoras na eluição ( rendimentos de eluição = 0 %). Os

rendimentos em adsorção foram semelhantes aos ensaios anteriores. No decorrer desses ensaios verificou-se que o pHmetro apresentou problemas de leitura e estava acusando valores menores do que o real. Esse fato nos indicou que possivelmente os pH's acima não estavam corretos e portanto, resolveu-se testar novamente os pH's do meio. Os únicos valores de pH escolhidos foram 4,5 e 4,9, pois o pHmetro estava acusando valores menores do que o real e os ensaios apresentados na Tabela 4.97 mostram que não ocorre adsorção de enzima para pH's alto. Além disso, antes de iniciarmos o processo de adsorção-desorção investigou-se a estabilidade da enzima nesses pH's baixos (a temperatura ambiente e a  $-4^{\circ}\text{C}$ ) e também a influência do NaCl na estabilidade da enzima. Essas duas variáveis foram investigadas uma vez que não era possível eluir a enzima e as mesmas podiam estar interferindo no processo.

Tabela 4.100. Verificação da estabilidade de PGA de *B. megaterium* em pH = 4,5 e 4,9 (temperatura ambiente e a  $-4^{\circ}\text{C}$ ).

Amostra	Tempo (minutos)	Atividade (UI/L)
Caldo pH = 4,5	0	343
Caldo pH = 4,5 T = $-4^{\circ}\text{C}$	20	233
Caldo pH = 4,5 T = $-4^{\circ}\text{C}$	60	131
Caldo pH = 4,5 T = amb.	60	0
Caldo pH = 4,9	0	727
Caldo pH = 4,9 T = $-4^{\circ}\text{C}$	60	634
Caldo pH = 4,9 T = amb	60	344
Caldo pH = 4,9 T = $-4^{\circ}\text{C}$	120	536
Caldo pH = 4,9 T = amb	120	114
Caldo pH = 4,9 T = $-4^{\circ}\text{C}$	240	428

Tabela 4.101. Influência do NaCl na estabilidade da enzima. Concentração final de NaCl na solução = 1,5M

Amostra	Tempo (min)	Atividade (UI/L)
Caldo pH = 4,9 T = - 4°C	0	240
Caldo pH = 4,9 T = - 4°C	20	200

Os resultados obtidos (Tabela 4.100) nos mostram que ocorre muita perda da enzima quando se ajusta o pH para 4,5 (comparação com o caldo a pH = 4,9). Também é verificado uma desnaturação rápida da enzima quando a mesma se encontra nesse pH. Em relação ao pH 4,9, a enzima se manteve mais estável, principalmente a temperaturas baixas (- 4°C). Dessa forma, decidiu-se realizar os ensaios de adsorção-desorção em câmara fria e o caldo de cultivo ajustado para pH 4,9. Cabe observar que o NaCl na molaridade de 1,5 não afetou a atividade enzimática dentro de 20 minutos, tempo este suficiente para realizar o processo de eluição, portanto, pode-se concluir que o NaCl não está ocasionando desnaturação da enzima e utilizou-se na sequência diversas molaridades para estudar o seu efeito na eluição (0,15M; 2M; 3M). Paralelamente, realizou-se um ensaio onde o tampão eluente com NaCl foi substituído por uma solução de NaOH 0,25M/NaCl 0,25M pH = 9. Esses resultados são apresentados na Tabela 4.102 e os parâmetros quantificados estão na Tabela 4.103.

Tabela 4.102. Resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de *B. megaterium* na resina Streamline-SP utilizando diferentes molaridades de NaCl no tampão eluente. Clarificado = solução enzimática no tempo zero; extrato = solução enzimática após passar pelo gel; lavagem = tampão utilizado para lavar o gel; eluído = tampão com NaCl utilizado para eluir a enzima.

Variável (elução)	Amostra	Atividade (UI/L)	Proteínas (g/L)	Atividade específica (UI/mg proteínas)
(1) Tampão eluente com 0,15M de NaCl pH = 4,9	Clarificado	418,9	1,7	0,25
	Extrato	187,3	1,6	0,12
	Lavagem	15,1	0,09	0,17
	Eluído 1	0	0	0
	Eluído 2	0	0	0
(2) Tampão eluente com 2M de NaCl pH = 4,9	Clarificado	396,4	1,6	0,25
	Extrato	204,7	1,58	0,13
	Lavagem	8,5	0,05	0,17
	Eluído 1	18,0	0,03	0,6
	Eluído 2	14,2	0	0
(3) Tampão eluente com 3M de NaCl pH = 4,9	Clarificado	396,4	1,6	0,25
	Extrato	196,7	1,5	0,13
	Lavagem	18,0	0,09	0,20
	Eluído 1	43,5	0,03	1,45
	Eluído 2	19,9	0	0
(4) Solução de NaOH 0,25M /NaCl 0,25M pH =9	Clarificado	387,9	1,1	0,35
	Extrato	166,5	0,95	0,17
	Lavagem	0	0	0
	Eluído 1	33,1	0	0
	Eluído 2	0	0	0

Tabela 4.103. Efeito da molaridade do NaCl no tampão eluente nos parâmetros de adsorção quantificados

Variável (Tampão eluente)	Cap. Adsorção (UI/mL gel)	R. E. (%)	R. A. (%)	R.O. (%)	F.P1	F.P2
(1)	2,1	0	49,5	0	0	0
(2)	1,8	10,8	45,0	4,9	2,4	0
(3)	1,7	22,3	43,1	9,6	5,8	0
(4)	2,1	9,0	57,1	5,1	0	0

R. E. = rendimento de eluição R. A. = rendimento de adsorção

R. O. = rendimento de operação

F.P1= fator de purificação 1 (relacionado ao eluído 1)

F.P2 = fator de purificação 2 (relacionado ao eluído 2)

Observa-se nesses ensaios (Tabela 4.103) que para tampões eluentes com concentrações de NaCl a partir de 2M (2) conseguiu-se eluir a enzima, ainda que em pequenas concentrações. Essa molaridade utilizada é bastante alta quando comparada com a utilizada com a PGA de *E. coli* (0,15M) e mesmo assim não foi possível obter os mesmos rendimentos (média de 80%). Duas possíveis explicações para a PGA de *B. megaterium* apresentar esse comportamento era primeiro o fato dessa enzima ser estruturalmente muito diferente e conseqüentemente apresentar maior número de cargas que se ligam ao suporte, tornando o processo de eluição muito difícil e, segundo, poderia estar ocorrendo desnaturação da enzima na etapa de lavagem (tampão citrato 20 mM pH = 4,9). A estabilidade da enzima já havia sido verificada neste pH, no entanto, quando se testou a estabilidade, a mesma encontrava-se em um caldo de cultivo na presença de vários nutrientes. Na etapa de lavagem a enzima está praticamente pura no gel e isso pode tornar a enzima mais sensível ao pH.

Tomando como base essas duas possíveis hipóteses, resolveu-se ajustar o pH do meio de cultivo (pH = 4,9) com ácido fenil acético (AFA) 0,1M, que é o inibidor competitivo da enzima. O fato do inibidor se ligar no sítio ativo da enzima fará com que a enzima esteja mais protegida e também que ocorra uma mudança conformacional. Pretende-se com a adição de AFA ao meio atuar nos dois possíveis problemas. O efeito somente do ajuste do pH com AFA pode ser

verificado no ensaio 1, onde se utilizou todas as outras condições constantes (lavagem com tampão citrato 20 mM pH = 4,9, e eluição com o mesmo tampão adicionado de 0,15M de NaCl).

Ainda, para ter certeza se era o pH que estava causando desnaturação da enzima fez-se também o processo de adsorção-desorção sem a etapa de lavagem e as eluições não foram mais com tampão citrato 20 mM pH = 4,9 com adição de NaCl e sim com uma solução de NaCl 2M e 0,15M ( pH =6,3). A molaridade do NaCl foi testada novamente uma vez que poderia estar ocorrendo desnaturação da enzima pelo pH e portanto a molaridade do NaCl de 0,15M poderia ser o suficiente para eluir a enzima. Os resultados são apresentados na Tabela 4.104.

Tabela 4.104. Resultados obtidos no processo descontínuo de adsorção-desorção da PGA de *B. megaterium* na resina Streamline-SP em diferentes condições de lavagem e eluição. Clarificado = solução enzimática no tempo zero; extrato = solução enzimática após passar pelo gel; lavagem = tampão utilizado para lavar o gel; eluído = tampão com NaCl utilizado para eluir a enzima.

Variável	Amostra	Atividade (UI/L)	Proteínas (g/L)	A. Esp. (UI/mg proteínas)
(1) padrão lavagem: tampão Eluição: tampão + 150mM NaCl	Clarificado	563	1,9	0,29
	Extrato	129	1,7	0,08
	Lavagem	12,3	0,07	0,18
	Eluído 1	9,5	0	0
	Eluído 2	0	0	0
(2) lavagem: tampão Eluição: NaCl 2M	Clarificado	622	1,9	0,33
	Extrato	168	1,7	0,10
	Lavagem	11	0,03	0,37
	Eluído 1	57	0,03	1,90
	Eluído 2	0	0	0
(3) sem lavagem Eluição: NaCl 2M	Clarificado	571	1,9	0,30
	Extrato	136	1,7	0,08
	Eluído 1	196	0,1	1,96
(4) Sem lavagem Eluição: NaCl 0,15M	Clarificado	549	2,7	0,20
	Extrato	194	2,6	0,07
	Eluído 1	19	0,1	0,19

Tabela 4.105. Efeito de diferentes condições de lavagem e eluição nos parâmetros de adsorção quantificados

Ensaio	q (UI/mL gel)	q (mg prot./mL gel)	R. E. (%)	R. A. (%)	R.O. (%)	F.P1	F.P2
(1)	4,1	0,9	1,4	73,6	1,0	0	0
(2)	4,4	1,5	7,8	70,2	5,5	5,8	0
(3)	4,4	2,0	27	76,2	20,6	6,5	-
(4)	3,6	1	3,2	64,7	2,1	0,9	-

R. E. = rendimento de eluição R. A. = rendimento de adsorção

R. O. = rendimento de operação

F.P1= fator de purificação 1 (relacionado ao eluído 1)

F.P2 = fator de purificação 2 (relacionado ao eluído 2)

O fato de ajustarmos o pH do caldo com AFA e realizar o processo nos modos padrões não resultou em melhoras na etapa de eluição (ensaio 1 – Tabela 4.105). No entanto, quando a etapa de lavagem foi eliminada e o eluente utilizado foi NaCl 2 M obtivemos os melhores resultados encontrados até o momento, para a PGA de *B. megaterium* (ensaio 3). A comparação dos ensaios 2 e 3 nos mostram que o pH do tampão de lavagem está ocasionando desnaturação da enzima. Além disso, o eluente com força iônica de 0,15M de NaCl não é suficiente para eluir a enzima (ensaio 4).

Com a obtenção desses resultados partiu-se para a realização da adsorção em leito expandido.

#### 4.7.5.2. Adsorção Contínua

A adsorção contínua para a PGA de *B. megaterium* foi realizada somente em coluna com leito expandido e para solução clarificada do caldo do cultivo. As condições utilizadas foram ajuste de pH do clarificado para 4,9 com ácido fenil acético, eliminação da etapa de lavagem e eluição com solução de NaCl 2M. Cabe observar que a etapa de lavagem é feita para eliminar proteínas que não estão adsorvidas o suficiente no gel, contudo, ao longo do trabalho não foi encontrado proteínas nesta fração, fato este que permite eliminar essa etapa. As condições operacionais foram:

Vazão na adsorção de 4 mL/min

Vazão na eluição de 2,0 mL/min

Altura inicial da coluna com o suporte = 7,0 cm

Altura final da coluna com o suporte expandido = 14 cm

Volume total de clarificado (extrato enzimático) = 90 mL

Volume morto 15mL

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4.106.

Tabela 4.106. Resultados obtidos na adsorção contínua em leito expandido de PGA de *B. megaterium* em solução clarificada.

Etapa	Amostras (min)	A.E (UI/L)	Proteínas (g/L)	A.Esp. (UI/g proteínas)	V (mL)	A/A0	P/P0	F.P
Adsorção	E(0)	596	2,8	212,9	90	1	1	1
	S(3)	0	0	0,0	12	0	0	0
	S(5)	62	0,4	155,0	20	0,1	0,1	0,7
	S(7)	190	1,8	105,6	28	0,3	0,6	0,5
	S(9)	235	2,5	94,0	36	0,4	0,9	0,4
	S(11)	292	2,6	112,3	44	0,5	0,9	0,5
	S(13)	376	2,7	139,3	52	0,6	1,0	0,7
	S(15)	354	2,6	136,2	60	0,6	0,9	0,6
	S(22)	369	2,6	141,9	88	0,6	0,9	0,7
Eluição	El(2)	0	0	0,0	92			0
	El(4)	2762	1,2	2301,7	96			10,8
	El(6)	761	0,3	2536,7	100			11,9
	El(10)	184	0	0,0	108			0
	El(12)	116	0	0,0	112			0
	El(15)	26	0	0,0	118			0
	El(25)	0	0	0,0	138			0

A capacidade de ligação dinâmica foi calculado a partir da fórmula 1 do item 4.6.2.1.4. e o valor obtido foi 4,7 UI/ mL gel. Esse valor obtido está de acordo com o obtido para os ensaios realizados de modo descontínuo (Tabela

4.105) e com os valores obtidos para a PGA de *E. coli* (item 4.6.2.1.4 ). Os fatores de purificação atingidos também são semelhantes com aqueles obtidos para a PGA de *E. coli*. No entanto, o rendimento de recuperação da enzima foi de 33%, valor este abaixo do obtido quando se aplicou esta técnica para a PGA de *E. coli* (90%).

## 5. Conclusões e Sugestões

### 5.1. Conclusões

Com base no trabalho realizado, conclui-se que:

- A forma e o tempo de armazenamento do microrganismo interferem em seu metabolismo e conseqüentemente na produção de PGA. O armazenamento em ultrafreezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  utilizando glicerol 20% (v/v) como crioprotetor se mostrou uma técnica eficiente de conservação.
- Com relação à influência dos nutrientes na produção de PGA chegou-se as seguintes constatações:
  1. A adição de sais no meio (composição baseada em Illanes et ali.,1994) é essencial para se obterem maiores níveis de atividade;
  2. Glicose e glicerol ocasionam repressão catabólica na síntese da enzima. Enquanto o microrganismo está consumido esses açúcares facilmente metabolizáveis não há produção da enzima ;
  3. Consumo de lactose não é significativo;
  4. A fonte de nitrogênio é uma variável de fundamental importância.
    - 4.1. Os resultados obtidos mostram que o microrganismo somente produz PGA quando está consumindo aminoácidos como fonte de carbono e nitrogênio.
    - 4.2. A síntese de enzima é fortemente regulada por nitrogênio. Altas concentrações de a.a. inibem a produção da enzima, podendo até mesmo não permitir a germinação dos esporos de *B. megaterium*. O uso de a.a. livres em concentrações em torno de 10 g/L conduziu aos melhores resultados de produção de PGA;

5. O ácido fenil acético comprovou ser o indutor da enzima. A sua concentração é uma variável muito importante, obtendo-se como melhores resultados os valores de 2,7 g/L. Estudos utilizando o dobro desse valor (5,4 g/L) mostram repressão na síntese da enzima. A omissão do AFA reduz praticamente à metade a produção de PGA. Com relação ao tempo de adição, verificamos que se adicionado até 8 horas após a inoculação do microrganismo não há interferência na produção de PGA. Dessa forma optamos pela adição no início do cultivo. O microrganismo consome rapidamente AFA como fonte de carbono.
  6. O soro de queijo possui fatores de crescimento ou então micronutrientes que são essenciais para o crescimento do microrganismo e conseqüentemente para a produção de PGA. Esses nutrientes foram mais relevantes quando se utilizou o meio com aminoácidos livres, uma vez que quando se utiliza meio com caseína hidrolisada o efeito da ausência do soro de queijo é menos drástico, indicando estarem esses fatores presentes no hidrolisado de caseína;
- As melhores condições operacionais encontradas no biorreator foram a ausência de controle de pH, adição de AFA no início do cultivo e controle de oxigênio dissolvido próximo de 20% da saturação. A alimentação de nutrientes, nas concentrações, velocidades e tempos de alimentação estudadas não resultaram em aumento da produção de PGA. Estudos realizados em biorreator mostram que a produção da enzima está associada ao crescimento do microrganismo. Este trabalho permitiu o aumento das atividades enzimáticas de 56 UI/L e 8,6 UI/g célula, obtidas no primeiro ensaio realizado com o inóculo padronizado, para 220 UI/L e 65 UI/g célula.
  - Condições utilizadas para máxima produção de PGA por *E. coli* quando aplicadas para *B. megaterium* não conduziu à produção de enzima.

- A precipitação por etanol só torna-se viável quando operada a pH 6, dentre os pH's estudados. Também não é interessante a realização de prévia diálise quando se aplica a precipitação com etanol. A porcentagem de enzima recuperada foi em torno de 30% e os fatores de purificação obtidos foram muito baixos. Apesar de todos os processos de purificação apresentarem bastante perdas durante os processos, esse valor está abaixo do esperado, uma vez que para se obter a enzima pura será necessário realizar outras etapas de purificação e, portanto, as perdas ainda serão maiores.
- Na adsorção em leito expandido para PGA de *B. megaterium* a atividade recuperada foi semelhante à encontrada na precipitação por etanol (em torno de 30%), no entanto, os fatores de purificação encontrados foram muitos maiores (aproximadamente 12). Esse fator torna a técnica de adsorção em leito expandido mais vantajosa em relação à precipitação com solventes. A capacidade de ligação dinâmica foi próxima de 5 UI/mL de gel para ambas as enzimas (proveniente de *B. megaterium* e *E. coli*).
- A técnica de microfiltração, utilizada para remoção da massa celular, não ocasionou perdas na atividade enzimática.
- A ultrafiltração, quando operada à frio (4°C), mostrou-se uma técnica muito eficiente, com grandes concentrações no volume do caldo, sem que ocorresse muita perda da enzima. Na aplicação desta técnica também houve uma parcial purificação, uma vez que os aminoácidos contidos no meio conseguem permear a membrana. Essa técnica mostrou-se a mais eficiente para recuperação/concentração de PGA, sendo ainda de fácil escalonamento. A ultrafiltração conseguiu concentrar a enzima até atividade final 1541UI/L (fator de concentração de 9 vezes em atividade).

## 5.2. Sugestões

Com base neste trabalho, são apresentadas as seguintes sugestões:

- Investigação do “pool” mínimo de aminoácidos necessários para a produção de PGA.
- Investigação de diferentes velocidades de adição de aminoácidos em batelada alimentada pois a produção da enzima parece ser fortemente influenciada pela concentração de nitrogênio no meio, bem como estratégias de alimentação dos outros nutrientes.
- Estudo mais aprofundado da influência da concentração de oxigênio dissolvido na produção de PGA em biorreator
- Estudo de diferentes pH's na precipitação por solventes, pois essa variável mostrou grande influência na atividade recuperada.
- Aplicação da adsorção em leito expandido utilizando-se caldo bruto de fermentação. Também seria interessante testar resinas aniônicas, pois o pH do caldo de cultivo do *B. megaterium* se encontra em aproximadamente 9, não sendo necessário, portanto, corrigir o pH.
- E por fim, estudos de clonagem do gene PGA e posterior expressão desses genes clonados.

## Referências Bibliográficas

- Acevedo, F.; Cooney, C.L. Penicillin Amidase Production by *Bacillus megaterium*, Biotechnology and Bioengineering, 15: 493-503, 1973.
- Alberts, B. Biologia molecular da célula, 3ª edição, Traduzido por A.B.Simonetti e colaboradores, Porto Alegre, Artmed, 1997.
- Alvaro, G.; Fernandez-Lafuente, R.; Blanco, R. M.; Guisàn, J.M. Immobilization - Stabilization of Penicillin G Acylase from *Escherichia coli*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 181-195, 1990.
- Bailey, J. E. ; Ollis, D. F. Biochemical engineering fundamentals, 2º edição, New York, Mc Graw Hill, 1986.
- Balasingham, K.; Warburton, D.; Dunnill, P.; Lilly, D. The Isolation and Kinetics of Penicillin Amidase from *Escherichia Coli*. Biochimica ET Biophysica Acta, 250-256, 1972.
- Berazaín, J.G.H.Q. Estudo sobre a Utilização de Soro de Queijo na Produção da Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterim* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 1997. 97p (Dissertação).
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8<sup>th</sup> edition, USA, 1974.
- Bierau, H.; Hinton, R. J.; Lyddiatt, A. Direct process integration of cell disruption and fluidised bed adsorption in the recovery of labile microbial enzymes. Bioseparation, 10, 73-85, 2001.
- Black, J. G. Microbiology: principles and applications, 3ª edição, New Jersey, Prentice-Hall, 1966.
- Bradford, M.M. A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry, 72, 248-254, 1976.
- Bruggink, A.; Roos, E.C.; Vroom, E. Penicillin Acylase in the Industrial Production of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. Organic Process Research & Development, 2(2), 128-133, 1998.

- Calado, C. R. C.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. J. P. Expanded Bed Adsorption: an Excellent Unit Operation for in situ Recovery/Purification of Bioproducts from Complex Reaccional Media. In: Proceedings 8<sup>th</sup> Internacional Chemical Engineering Conference, vol 2, 1113-1120, Portugal, 2001.
- Calado, C. R. C.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. J. P. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation conditions on expanded bed adsorption of heterologous cutinase. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 77,1231-1237, 2002
- Cardias, H.T.C.; Giordano, R.L.C. ; Fernandez-Lafuente,R. ; Guisán, J.M. Produção de derivados de penicilina G acilase com diferentes propriedades como catalisadores de síntese de antibióticos. In: ACTAS do 16<sup>o</sup> Simpósio Iberoamericano de Catálisis, vol 2, 1069-1074, Colômbia – 23 a 28 de agosto de 1998.
- Castillo, I.D.S. Cultivo de Escherichia coli Recombinante: Desenvolvimento de Estratégia para o Crescimento e Indução à Síntese de Troponina C. São Paulo, EPUSP,1997. 181p (dissertação).
- Chaloupka, J. ; Krecková, P. Regulação of the Formation of Protease in *B. megaterium* I. The influence of Amino Acids on the Enzyme Formation. Folia Microbiologica, 11(2), 82-88, 1966.
- Chase, H. A.; Draeger, N.M. Affinity purification of proteins using expanded beds. Journal Chromatography, 597, 129-145, 1992.
- Chiang, C.; Bennett, R.E. Purification and Properties of Penicillin Amidase from *Bacillus megaterium*. Journal of Bacteriology, 93(1), 302-308, 1967.
- Chou, C.P.; Lin, W.; Kuo, B.; Yu,C. Genetic strategies to enhance penicillin acylase production in *Escherichia coli*. Enzyme and Microbial Tecnology, 27, 766-773, 2000.
- Cocaign-Bousquet, M. ; Garrigues, C. ; Novak, L. ; Lindley, N. D. ; Loubiere, P. Rational development of a simple synthetic medium for the sustained growth of *Lactococcus lactis*. Journal of Applied Bacteriology, 79, 108-116, 1995.

- Done, S.H.; Brannigan, J.A.; Moody, P.C.E.; Hubbard, R.E. Ligant-induced Conformational Change in Penicillin Acylase. J. Mol. Biol., 284, 463-475, 1998.
- Duggleby, H.J.; Tolley, S.P.; Hill, C.P; Dodson, E.J.; Dodson, G.; Moody, P.C.E. Penicillin Acylase has a Single-amino-acid Catalytic Centre. Nature, 373, 264-268, 1995.
- Ferreira, A.L.O.; Gonçalves, L.R.B.; Giordano, R.C.; Giordano R.L.C; A simplified kinetic model for the side reactions occurring during the enzymatic synthesis of ampicillin. Brazilian Journal of Chemical Engineering, 17 (4-7), 835-839, 2000.
- Fisher, S. H. Regulation of Nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! Molecular Microbiology, 32, 223-232, 1999.
- Fonseca, L. J. P. Produção e Purificação da Penicilina Acilase de *Escherichia coli*. Lisboa, Universidade Técnica de Lisboa, IST, 1995. 300p (Tese)
- Garcia, J.L. ; Buesa, J.M. An improved method to clone penicillin acylase genes: Cloning and expression in *Escherichia coli* of penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila*. Journal of Biotechnology, 3, 187-195, 1986.
- Gentina, J.C.; Acevedo, F.; Villagra, M.P. Short Communication: Effect of Complex Nitrogen Sources on the Production of Penicillin Acylase by *Bacillus megaterium*. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 13, 127-128, 1997
- Gonçalves, L.R.B.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisán, J.M.; Giordano, R.L.C. Influência do pH e da temperatura na síntese de amoxicilina catalisada por penicilina G acilase imobilizada em gel de agarose. Ciência & Engenharia, ano 7 (2), 45-48, Julho-Dezembro 1998.
- Gonçalves, L.R.B.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisán, J.M.; Giordano, R.L.C. A Kinetic study of synthesis of amoxicillin using penicillin G acylase immobilized on agarose. Applied Biochemistry and Biotechnology, 84-6, 931-945, 2000.

- Gonçalves, L.R.B.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisán, J.M.; Giordano, R.L.C. The role of 6-aminopenicillanic acid on the kinetics of amoxicillin enzymatic synthesis catalyzed by penicillin G acylase immobilized onto glyoxil-agarose. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(4), 464-471, 2002.
- Gonçalves, L.R.B.; Souza R.; Fernandez-Lafuente, R.; Guisán, J.M.; Giordano, R.L.C.; Giordano R. C. Enzymatic synthesis of amoxicillin – Avoiding limitations of the mechanistic approach for reaction kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 80 (6), 622-631, 2002.
- Guan, Y.; Wu, X. Y.; Treffry, T. E.; Lilley, T. H. Studies on the Isolation of Penicillin Acylase from *Escherichia coli* by Aqueous Two-Phase Partitioning. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 517-524, 1992.
- Hartree, E.F. Determination of Protein: A Modification of the Lowry That Gives a Linear Photometric Response. *Analytical biochemistry*, vol 48, 422-427, 1972.
- Heckly, R. J. Preservation of Microorganisms. *Advances in Applied Microbiology*, 24, 1-53, 1978.
- Hojo, O. Estudo sobre a Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 1997. 123p (Tese).
- Illanes, A.; Acevedo, F.; Gentina, J.C.; Reyes, I.; Torres, R.; Cartagena, O.; Ruiz & M, A. Production of Penicillin Acylase from *Bacillus megaterium* in Complex and Defined Media. *Process Biochemistry*, 29, 263-270, 1994.
- Inocêncio, G. E.M ; Estudo sobre efeito da presença de fatores de crescimento e da concentração de nutrientes-chave na produção de PGA por *B. megaterium*. São Carlos, UFSCar, 2002. (Iniciação Científica).
- Kang, J.H.; Hwang, Y.; Yoo, O. J. Expression of Penicillin G Acylase gene from *Bacillus megaterium* ATCC 14945 in *Escherichia coli* and *Bacillus Subtilis*. *Journal of Biotechnology*, 17, 99-108, 1991.
- Konstantinovic, M.; Marjanovic, N.; Ljubijankic, G.; Glisin, V. The Penicillin amidase of *Arthrobacter viscosus* (ATCC 15294). *Gene*, 143, 79-83, 1994.

- Lagone, M.A.P. ; Coelho, M.A.Z. ; Medronho, R.A. ; Leite, S.G.F.; Couri, S. Characterization and partial purification of a polygalacturonase through dialysis process. Brazilian Journal of Chemical Engineering, vol. 13 (1), 1-7, 1996.
- Lehninger, A. L. Princípios de Bioquímica, 2ª edição, Traduzido por A. A. Simões, W. R. N. Lodi, São Paulo, Sarvier, 2000.
- Leser, E.W. ; Asenjo, J.A. Rational design of purification processes for recombinant proteins. Journal of Chromatography, vol. 584, 43-57, 1992.
- Lin, Y.; Fang, W.; Lin, W.; Huang, S.; Chou, C.P. Improving production of penicillin acylase in *Escherichia coli* via efficient DegP-mediated processing of precursors in periplasm. Process Biochemistry, 37, 23-30, 2001.
- Lin, Dong-Qiang; Fernández-Lahore, H. M.; Kula, Maria-Regina; Thömmes J. Minimising biomass/adsorbent interactions in expanded bed adsorption processes: a methodological design approach. Bioseparation, 10, 7-19, 2001.
- Lucarini, A.C. ; Kilikian, B.V. ; Takeda, M.E. Definição das principais variáveis na precipitação de amiloglicosidase por etanol. In: Anais do 11º Simpósio Nacional de fermentações, vol. 2, 804 – 809, São Carlos – 31 de julho a 2 de agosto de 1996.
- Martín, L.; Prieto, M.A.; Cortés, E.; García, J.L. Cloning and Sequencing of the *pac* Gene Encoding the Penicillin G Acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. FEMS Microbiology Letters, 125, 287-292, 1995.
- McCullough, J.E. Gene Cloning in Bacilli Related to Enhanced Penicillin acylase production. Bio/Technology, 879-882, 1983.
- Meevootisom, V.; Saunders, J.R. Cloning and Expression of Penicillin Acylase Genes from Overproducing Strains of *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium*. Appl. Microbiol Biotechnol., 25, 372-378, 1987.
- Morr, C.V. ; Ha, Y.W. Whey Protein Concentrates and Isolates: Processing and Functional Properties. Critical reviews in Food Science and Nutrition, 33(6), 341-476, 1993.
- Murao, S. ; Sakaguchi, K. ; Kono, K. Process for Preparing 6-Aminopenicilanic Acid by *Bacillus megaterium*, U.S. Patent 3,144,395 (1964).

- Neidhardt, F. C. ; Bloch, P. L. ; Smith D. F. Culture Medium for Enterobacteria. Journal of Bacteriology, 119 (3), 736-747, 1974.
- Neviani, E. ; Giraffa, G. ; Brizzi, A. ; Carminati, D. Amino acid requirements and peptidase activities of *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. Journal of Applied Bacteriology, 79, 302-307, 1995.
- Nucci, E. R. Aplicação da Lógica Fuzzy na Produção de Penicilina G Acilase por *B. megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 2003. (Dissertação).
- Ohashi, H. ; Katsuta, Y. ; Nagashima, M. ; Kamei, T. ; Yano, M. Expression of the *Arthrobacter viscosus* Penicillin G Acylase Gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. Applied and Environmental Microbiology, 1351-1356, 1989.
- Ospina, S. S. Characterization and Use of a Penicillin Acylase Biocatalyst. J. Chem. Tech. Biotechnol., 205-214, 1992.
- Panbangred, W.; Weeradachapon, K.; Udomvaraphant, S.; Fujiyama, K.; Meevootisom, V. High expression of the penicillin G acylase gene(pac) from *Bacillus megaterium* UN1 in its own pac minus mutant. Journal of Applied Microbiology, 89(1), 152-157, 2000.
- Phan-Thanh, L. ; Gormon T. A chemically defined minimal medium for the optimal culture of Listeria. International Journal of Food Microbiology, 35, 91-95, 1996.
- Phillips, L. L. ; Caldwell, M. L. A Study of the Purification and Properties of a Glucose-forming Amylase from *Rhizopus delemar*, Gluc Amylase. J. Am. Chem. Soc., vol 73, 3559-63, 1951.
- Pinotti, L.M. Estudo da Produção, Purificação e Imobilização de Penicilina G Acilase de *Bacillus megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 1999. 103p (Dissertação).
- Potter, C. A. ; Baumberg, S. End-product control of enzymes of branched-chain amino acid biosynthesis in *Streptomyces coelicolor*. Microbiology, 142, 1945-1952, 1996.
- Robas, N.; Zouheiry, H.; Bralant, G.; Bralant, C. Improved Penicillin Amidase Production Using a Genetically Engineered Mutant of *Escherichia coli* ATCC 11105. Biotechnology and Bioengineering, 41, 14-24, 1993.

- Santos, E. S.; Guiraldello, R.; Franco, T.T. Preparative chromatography of xylanase using expanded bed adsorption. Journal of Chromatography A, 944 (1-2), 217-224, 2002.
- Savidge, T. A.; Cole, M. Penicillin Acylase (bacterial). Methods in Enzymology, 43, 705-721, 1975.
- Savidge, T.A. Enzymatic Conversions used in the Production of Penicillins and Cephalosporins. In: Biotechnology of Industrial Antibiotics, edited by Vandame, E. J., Ed. Marcel Dekker, 1984.
- Scopes, R.K. Protein Purification, 2<sup>o</sup> edição, New York, Springer-Verlag, 1988.
- Senthilvel, S.G.; Pai, J.S. Purification of Penicillin Acylase of *Bacillus megaterium*. Biotechnology Techniques, 10(8), 611-614, 1996.
- Shepard, S. R.; Boyd, G. A.; Schrimsher, J. L. Routine manufacture of recombinant proteins using expanded bed adsorption chromatography. Bioseparation, 10, 51-56, 2001.
- Shewale J.W.; Sivaraman, H. Penicillin Acylase: Enzyme Production and its Application in the Manufacture of 6-APA. Process Biochemistry, 146-154, 1989.
- Silva, R. G. Técnicas de Inferência de Estado Aplicadas ao Processo de Produção de Penicilina G Acilase por *B. megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 2003. (Tese).
- Sobotková, L. ; Stepánck, V. ; Plhácková, K. ; Kyslík, P. Development of a high-expression system for penicillin G acylase based on the recombinant *Escherichia coli* strain RE3(pKA18). Enzyme and Microbial Technology, 19, 389-397, 1996.
- Somogyi, M. Notes on Sugar Determination J. Biol. Chem. 195(1), 19-23, 1952.
- Son, H.; Mheen, T.; Seong, B.; Han, M.H. Studies on microbial Penicillin Amidase (IV) the Production of Penicillin Amidase from a Partially Constitutive Mutant of *Bacillus megaterium*. J. Gen. Appl. Microbiol., 28, 281-291, 1982.

- Stuart, M. R. ; Chou, L. S. ; Weimer, B. C. Influence of Carbohydrate Starvation and Arginine on Culturability and Amino Acid Utilization of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Applied and Environmental Microbiology, 65(2), 665-673, 1999.
- Suga, K.; Shiba, Y.; Sorai T.; Shioya, S.; Ishimura, F. Reaction Kinetics and Mechanism of Immobilized Penicillin Acylase from *Bacillus megaterium*. Ann. NY Acad. Sci., 613, 808-815, 1990.
- Vary, P.S. Prime Time for *Bacillus megaterium*. Microbiology, 140, 1001-1013, 1994
- Vieira, M. F. Aplicação de um processo de complexação/ultrafiltração para remoção de poluente do branqueamento TCF (Totally Chlorine Free). Maringá, UEM, 1999. Dissertação
- Visnardi, C. Estudo de Alguns Aspectos do Processo de Produção da Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. São Carlos, UFSCar, 1997. (Dissertação).
- Vuyst, L. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 in a synthetic medium. Journal of Applied Bacteriology, 78, 28-33, 1995.
- Yang, S.; Huang, Y.H.; Huang, X.D.; Li, S.Y.; Yuan Z.Y. High expression of penicillin g acylase gene from *Bacillus megaterium* in *Bacillus subtilis*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 31(5), 601-603, 1999.
- Yang, S.; Huang, H.; Zhang, R.A., Huang, X.D.; Li, S.Y.; Yuan Z.Y. Expression and purification of extracellular penicillin G acylase in *Bacillus subtilis*. Protein Expression and Purification, 21(1), 60-64, 2001.

