

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

Produção de penicilina G acilase por Organismos Geneticamente Modificados

Ana María Vélez Escallón

São Carlos, SP
2013

ANA MARÍA VÉLEZ ESCALLÓN

Produção de penicilina G acilase por Organismos Geneticamente Modificados

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.

Orientadora: Prof. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano

Co-orientadora: Prof. Dra. Teresa Cristina Zangirolami

São Carlos, SP

2013

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

V436pp

Vélez Escallón, Ana María.

Produção de penicilina G acilase por organismos geneticamente modificados / Ana María Vélez Escallón. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

168 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Engenharia química. 2. Proteínas recombinantes. 3. Escherichia coli. 4. Bacillus megaterium. 5. Batelada alimentada. 6. Biorreator convencional. I. Título.

CDD: 660 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE ANA MARÍA VÉLEZ ESCALLÓN, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 17 DE SETEMBRO DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:



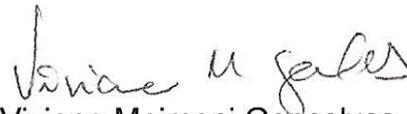
Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora / UFSCar



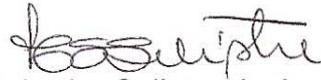
Teresa Cristina Zangirolami
Coorientadora / UFSCar



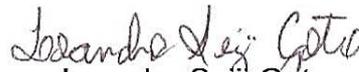
Edson Romano Nucci
UFSJ



Viviane Maimoni Gonçalves
Instituto Butantan



Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo
UFSCar



Leandro Seiji Goto
UFSCar



Adilson José da Silva
UFSCar

Dedico esta tese a minha mãe Nelly Amélia e ao meu irmão Andrés por sempre me apoiar em todas as etapas da minha vida e à “Universidad del Valle” na Colômbia pela excelência acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Ao final deste trabalho quero agradecer a todas as pessoas que foram essenciais na realização deste, em especial às minhas orientadoras Raquel de Lima Camargo Giordano e Teresa Cristina Zangirolami pela enorme ajuda científica, dedicação e orientação, muito obrigada.

Aos professores Adilson José da Silva, Rosineide Gomes da Silva Cruz por todos os ensinamentos na bancada e nos textos nestes anos no Departamento de Engenharia Química.

Aos Drs. Mônica Rosas da Costa Iemma, Elvis Cueva Mateo, Leandro Seiji Goto e Ana Isabel de Camargo pelo ensinamento no trabalho de laboratório numa área totalmente diferente à minha formação como engenheira.

Ao professor Ezequiel Franco-Lara por me abrir as portas na Universidade Tecnológica de Braunschweig, à Dra. Rebekka Biedendieck pela ajuda na área de clonagem e expressão de *Bacillus megaterium*, ao professor Dr. Florian David pela orientação de muitos experimentos, ao Dr. Andre Luis Rodrigues pela ajuda nas análises de HPLC na Alemanha, muito obrigada.

Aos meus colegas e amigos do grupo de pesquisa Cintia Sargo, Gilson Campani, Gabriel Gonçalves, Antônio Carlos Horta, Lucas Altarugio por todos os experimentos realizados nos últimos anos. Obrigada pelo suporte na pesquisa e na correção de algumas partes deste texto.

Aos meus amigos do grupo de bioquímica Inti Cavalcanti, Carlos Galeano, Claudia Ramos, Jessica dos Santos, Ursula Rodriguez, Cristine de Pretto, Felipe Furlan, Gabriel Fonseca, Agnes Mafra, Mayerlenis Jimenez, Liliane Oliveira, Gislene Mota, Guilherme Rodriguez, Karina Matugi, Patricia Aquino, Sandra Pereira, Lionete Lima, Maritza Bustamante, Carolina Belão, Cecilia, Carolina, Jorge, Mateus, muito obrigada.

À todos os alunos de iniciação científica que passaram pelo laboratório em especial Silvia Hirayama, Renata Porto, Emily Carvalho e Carla Martins.

Aos meus amigos: Carolina, Sandra Patricia, Sandra Fernanda, Jackson, Aymer, Bárbara, Ivana, Tatiana e Néstor que de uma ou outra forma me ajudaram, acompanharam, esperaram durante meus experimentos, muito obrigada.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro dado no processo 2009/00177-2.

RESUMO

Penicilina G Acilase (PGA) é enzima chave na produção industrial de antibióticos β -lactâmicos. Neste trabalho, foram estudadas as produções de PGA de *Escherichia coli* produzida por *E.coli* recombinante e de *Bacillus megaterium* produzida por *B. megaterium* recombinante. No primeiro, esta é acumulada no espaço periplasmático, o segundo secreta a enzima, o que pode reduzir grandemente custos de recuperação da enzima, pois não requer rompimento celular. Para *E.coli*, o estudo foi iniciado na etapa de expressão. Utilizando *E.coli* recombinante doada, foi realizado um estudo em frascos agitados da influência da temperatura (entre 18 e 28°C), durante a fase de indução, na expressão de PGA, que mostrou haver altos níveis de expressão de enzima a 20°C, com atividade volumétrica 4 vezes superior à obtida a 28°C. Foram realizados então cultivos a 20°C, em biorreator, em batelada alimentada, com glicerol como fonte de carbono, usando meio definido ou complexo, com IPTG ou lactose como indutores. Foram atingidas concentrações de biomassa finais de 100 gms/L e 120 gms/L, e atividades enzimáticas de 210000 e 80000 UI/L para meios complexo e definido, respectivamente. Para *B. megaterium*, o gene *pac*, que codifica PGA de *B. megaterium* ATCC14945 foi isolado e clonado no plasmídeo pLipAhp, juntamente com um gene promotor e outro codificando resistência a antibiótico (para seleção da linhagem clonada). Essa construção (*pga*-pLipAhp) foi usada para transformar três linhagens de protoplastos de *B. megaterium*, com o objetivo de determinar o melhor hospedeiro para a expressão de PGA recombinante. Foram testadas as linhagens: *B. megaterium* PV 361, QM B1551 e ATCC 14945, obtendo-se 95%, 95% e 10%, respectivamente, de estabilidade plasmidial, após 8 cultivos consecutivos. A melhor produção de PGA foi detectada em PV 361. Estudo de estabilidade térmica e de pH com a enzima purificada mostrou que PGA possui um tempo de meia vida de 5 min a 60°C, 20 min a 50°C, mantém 100% de atividade por 1 h, a pH 10 e por 8 horas, a pH 5. A temperatura e pH de atividade máxima é 37°C e 8,0, respectivamente, com $K_m=8.8 \mu\text{M}$, com manutenção de 100% de atividade, no mínimo por 5 horas, nessas condições. Um estudo sistemático foi desenvolvido para obter um alto rendimento na produção de PGA de *B. megaterium* por *B. megaterium* recombinante. Busca da melhor composição de meio para biomassa e produção de PGA foi feita usando o algoritmo genético. A busca foi desenvolvida em placas de 96 poços, iniciando com um meio mínimo, com 12 componentes definidos. Em 7 gerações, 240 tipos de meio foram testados para a produção e secreção, conseguindo-se um incremento de 10 vezes na produção de PGA e de 5 vezes na produção de biomassa, comparando-se com o meio mínimo controle. Escalonamento para frascos agitados permitiu aumento de 3 vezes na produção de PGA e de 1.8 vezes na produção de biomassa. Escolhendo-se glicerol como fonte de carbono, foram testadas diferentes fontes complexas de aminoácidos. O meio que conduziu ao melhor resultado foi usado em cultivos em biorreator em batelada, 5L, onde se obteve como máxima produção de PGA recombinante de *B. megaterium* 105600 UI/L, com 36 gms/L de massa celular.

ABSTRACT

Penicillin G acilase (PGA) is a key enzyme in the industrial production of β -lactamic antibiotics. In this work, it was studied the production of PGA from *Escherichia coli* by recombinant *E. coli* and from *Bacillus megaterium* by recombinant *B. megaterium*. In *E. coli*, the enzyme accumulates in the periplasmic cell space, *B. megaterium* secretes PGA, what may reduce downstream costs. With *E.coli*, the study has begun at the expression step. Using a donated recombinant microorganism, it was studied, in shake flasks cultures, the influence of temperature (ranging from 18 to 28°C) during induction phase in the PGA production. High level expression of PGA *E. coli* was detected at 20°C, which was 4-fold superior than the volumetric enzymatic activity reached at 28°C. Fed-batch cultures were conducted with glycerol as carbon source, using both defined and complex media as well as IPTG and lactose as inducers. Final biomass concentrations of 100 gDCW/L and 120 gDCW/L and enzymatic activity 210000 and 80000 IU/L were achieved, for complex and defined media, respectively. The study with *B. megaterium* was initiated isolating the *pac* gene, encoding for PGA from *B. megaterium* ATCC14945, which was after cloned into the pLipAhp expression plasmid, together with the promoter gene and a gene codifying antibiotic resistance. This construct (pga-pLipAhp) was used to transform three different *B. megaterium* strain protoplasts, aiming studies to determine the best expression host in terms of PGA production. The tested strains, *B. megaterium* PV361, QM B1551 and ATCC 14945, have respectively shown about 95%, 95% and 10% plasmidial stability, after eight consecutive growths. The best PGA production was detected in PV361. Study of thermal and pH stability with the purified enzyme showed that PGA has a half-life of 5 min at 60° C, 20 min at 50° C, keeping 100% of activity for 1h at pH 10.0 and up to 8 h at pH 5.0. The values of temperature and pH for maximum PGA activity are 37° C and 8.0, respectively. The enzyme was stable at least for 5 hours in these conditions, with Michaelis-Menten estimated as $K_m=8.8 \mu\text{M}$. A systematic study was developed to search the best condition to obtain the highest level of *B.megaterium* PGA production by recombinant *B.megaterium*. Media compositions for biomass and PGA production were evaluated using a genetic algorithm. The screening was carried out in 96 microtiter deep well plates, starting as a minimal medium and studying the concentration of 12 defined components. In 7 generations, 240 different kinds of media were tested for production and secretion and a 10-fold increase in PGA production and 5-fold increase in biomass compared to the previously used minimal medium could be achieved. It was scaled-up to shaker flasks obtaining 3-fold in PGA production and 1.8-fold in biomass. Later, it was scaled-up to bioreactors obtaining 3-fold in biomass and 8-fold in PGA production. Using glycerol as carbon source, it was tested different complex amino acids sources, using flask cultures. The best medium was scale-up in a 5 L bioreactor, in a batch culture with pulses. The highest production of PGA of recombinant *B. megaterium* achieved was 105600 IU/L and 36 gDCW/L.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 - Estrutura dimérica de PGA mostrando a sub-unidade β (violeta) e a sub-unidade α (azul claro). A região N-terminal da sub-unidade α e a C-terminal da região β são indicadas em verde. Em vermelho, no centro da molécula, encontra-se o resíduo serina catalítico.

Figura 3.2 - Conversão enzimática de penicilina G e cefalosporina G em ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) e ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), reações que têm como produto comum o ácido fenilacético.

Figura 3.3 - Esquema geral do escalonamento de bioprocessos em biorreator.

Figura 3.4 - Etapas para cultivos em batelada alimentada de *E. coli* recombinante.

Figura 3.5 - Esquema geral de síntese e processamento de PGA em *E. coli* recombinante. O gene *pac* codifica um precursor polipeptídico de 94 kDa (ppPGA) que consiste em um peptídeo sinal (S), uma subunidade (α), um peptídeo espaçador (L) e uma subunidade (β). O peptídeo sinal é removido de ppPGA durante a translocação do citoplasma ao espaço periplasmático. No espaço periplasmático ainda são desenvolvidas modificações pós-tradicionais até obter a PGA enovelada.

Figura 3.6. Vetores de expressão para a produção em *Bacillus megaterium* de proteínas recombinantes com cauda. (a) Estrutura do vetor de expressão de *B. megaterium* pMM1520 (MALTEN et al., 2005). P_{xylA} : Elemento para a expressão do gene recombinante induzido por xilose. *xylR*: Gene que codifica o repressor da xilose. *oriU*, *repU* e o gene de resistência para tetraciclina: Elementos para a replicação plasmidial em *Bacillus*. *colE1* e o gene da β -lactamase: Elementos para a replicação plasmidial em *E. coli*. (B) Esquema dos vetores de expressão para a produção de proteínas intracelulares (BIEDENDIECK et al., 2007). (C) Esquema dos vetores para a produção de proteínas extracelulares (BIEDENDIECK et al., 2007; MALTEN et al., 2006). P_{xylA} : Promotor do *xylA*. TEV: Sítio de clivagem da protease TEV (Tobacco Etch Virus). Xa: Sítio de clivagem da protease Factor Xa (VARY et al., 2007).

Figura 3.7 - Protoplastos. (A) Em solução diluída e (B) em solução isotônica.

Figura 3.8 - Esquema ilustrativo da transformação de uma célula bacteriana por eletroporação.

Figura 3.9 - Representação esquemática do processamento da biomassa obtida em cultivos de *E. coli* geneticamente modificada para recuperação da proteína heteróloga.

Figura 3.10. Esquema gráfico ilustrando a ruptura celular por meio de três diferentes métodos: (a) Adição de produtos químicos (b) Choque osmótico (Método não-mecânico) (c) Ruptura mecânica.

Figura 3.11 - Efeito do pH na atividade relativa de uma enzima.

Figura 3.12 - Efeito da temperatura na atividade enzimática. A temperatura de máxima atividade resulta da interação entre dois fatores com efeitos contrários, o aumento da velocidade de reação pela temperatura (A) e a inativação das moléculas de enzima (B).

Figura 3.13 - Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima.

Figura 4.1 - Effect of induction temperature upon specific activity (Eq. 5) and concentration (Eq. 6) of PGA produced by *rE. coli* grown in shake flasks containing LB medium after 24 h of induction. All experiments induced with IPTG 0.25 mM, $T_{\text{growth}}=37^{\circ}\text{C}$, $\text{DO}_{\text{induction}}=1.5$.

Figura 4.2 - SDS-PAGE of cell lysates for *rE. coli* grown in shake flasks containing LB medium after 24 hours of induction. Experiments induced with IPTG 0.25 mM. (1) Protein standards; (2) Insoluble proteins (28°C); (3) Soluble proteins (28°C) (4) Insoluble proteins (20°C); (5) Soluble proteins (20°C).

Figura 4.3 - Growth, carbon sources consumption and PGA production by recombinant *E. coli* in batch culture B1 with auto-induction medium. $T_{\text{growth}}=37^{\circ}\text{C}$ and $T_{\text{induction}}=20^{\circ}\text{C}$. Pulse of glycerol and lactose added after 15.5 h of culture.

Figura 4.4 - Growth, carbon sources consumption and PGA production by recombinant *E. coli* using fed-batch culture B2 with complex medium. $T_{\text{growth}}=37^{\circ}\text{C}$ and $T_{\text{induction}}=20^{\circ}\text{C}$. Lactose pulses added at 8, 12, 17 and 24 h. Feeding started at 7.3 h.

Figura 4.5 - Growth, glycerol consumption and PGA production by recombinant *E. coli* in fed-batch culture B3 with defined medium. $T_{\text{growth}}=37^{\circ}\text{C}$ and $T_{\text{induction}}=20^{\circ}\text{C}$. Induction by IPTG pulse at $t=13$ h. Feeding started at 10.1 h.

Figura 4.6 - SDS-PAGE of clarified fraction obtained after lysis of recombinant *E. coli* cells cultivated in different media after 24 h of induction. B1: auto-induction; B2: Fed-batch with complex medium and B3: Fed-batch with defined medium. All samples contained 1 mg/mL of protein.

Figura 4.7 - Induction phase time profiles for (a) enzyme concentration (IU/L) estimated from Eq. 5 and (b) PGA productivity (IU/Lh) estimated from Eq. 6.

Figura 5.1 - Electrophoresis analysis of ProPGA PCR amplification product. 10 μL of the PCR product were submitted to electrophoresis on 0.8% agarose TAE. 1- Molecular mass marker; 2 - ProPGA PCR product from *Bacillus megaterium* genomic DNA.

Figura 5.2 - Segregational stability of the recombinant plasmid pga-pLipAhp and production stability for PGA in successive cultures of different hosts. PGA production levels and loss of plasmid under non-selective medium were assayed in the three *B. megaterium* strains for comparisons. (a) *Bacillus megaterium* PV 361; (b) QM B1551; (c) ATCC14945. PGA production (■) was determined by specific enzymatic activity using NIPAB substrate. Negative control (▲) is the PGA enzymatic activity registered by each strain without expression plasmid. Percentage of plasmid stability (●) is based on the loss of antibiotics resistance along successive bacterial colony plating.

Figura 5.3 - Analysis of PGA purification by SDS–PAGE. Samples from the initial raw culture medium and the elution from ion exchange chromatography were submitted to SDS-PAGE 12% analysis. 1) Molecular size marker, sizes indicated; 2) Culture medium extract; 3) Purified PGA from ion exchange chromatography. 10 μ L samples at 1 μ g/ μ L protein concentration were loaded.

Figura 5.4 - Kinetics modeling on the *Bacillus megaterium* PGA. The PGA Michaelis-Menten model based on the initial velocities of NIPAB hydrolysis catalyzed by purified recombinant PGA from *B. megaterium* PV361 (pga-pLipAhp), determined in initial substrate concentrations ranging from 200-1000 μ M. Protein concentrations ranged from 200-1000 μ g/mL. All the measurements were done in 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, at 37° C. Product 6-nitro-3-aminobenzoic acid (NABA) formation was monitored at 405 nm in a Amersham Pharmacia Ultrospec 2100 pro UV/visible spectrophotometer using 2 mL cuvettes of 1 cm path length. Insert - Lineweaver-Burk plot data representation.

Figura 5.5 - *Bacillus megaterium* PGA activity study in different temperatures and pHs. Optimal enzyme reaction environment was assayed using the linear initial product formation velocities from different temperature and pH values. (a) Effect of temperature in PGA activity, insert shows data in Arrhenius plot representation; (b) Effect of pH in PGA activity. All the measurements were done in an Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec 2100 pro UV/visible spectrophotometer using 2 mL cuvette of 1 cm light path along 5 min. pH measurements were all done at 37° C.

Figura 5.6 - *Bacillus megaterium* PGA stability in different temperatures and pHs. PGA activity persistence was measured along incubation in different temperatures and pH buffer values. a) Relative PGA activity loss along different temperatures incubation; (b) PGA activity relative loss along different pH buffers incubation. Measurements were done using 2 mL cuvette of 1 cm light path along 5 min. pH incubations and measurements were done at 37° C.

Figura 6.1 - Metodologia experimental do processo de otimização e escalonamento para produção de Penicilina G Acilase em *Bacillus megaterium* recombinante.

Figura 6.2 - Sistemas de biorreatores Dasgip® de 1L.

Figura 6.3 - Biorreator de 5 L.

Figura 6.4 - Resultados obtidos após 12 h indução a partir das 7 gerações de experimentos produzidas a partir dos experimentos aleatórios criados com o algoritmo genético em placas de 96 poços incubadas a 37°C e 1000 rpm. (a) Glicose como fonte de carbono. (b) Glicerol como fonte de carbono.

Figura 6.5 - Cultivo em biorreator de 1 L com meio A, indução com 5 g/L de xilose na metade da fase exponencial e 12 horas de indução.

Figura 6.6 - Cultivo em biorreator de 1 L com meio B, indução com 5 g/L de xilose na metade da fase exponencial e 12 horas de indução.

Figura 6.7 - Comparação dos cultivos C1 (com glicose como fonte de carbono) e C4 (com glicerol como fonte de carbono). (a) Atividade volumétrica (b) Produtividade.

Figura 6.8 - Cultivo C7 com meio B, 20 g/L de glicerol e pulsos com glicerol e xilose, após batelada com 12 horas de indução.

Figura 6.9 - Cultivo C8 com triptona Oxoid como fonte de aminoácidos, 100 µg/L de biotina, 20 g/L glicerol e indução após batelada, por meio de pulsos.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Reações e aplicações implementadas usando Penicilina G Acilase.

Tabela 3.2 - Proteínas terapêuticas recombinantes expressadas por *E. coli*, recentemente aprovadas.

Tabela 3.3 - Alguns sistemas de expressão em *E. coli* que são usados para a produção de proteínas heterólogas e suas características.

Tabela 3.4 - Alguns sistemas de expressão em *E. coli* que são usados para a produção de proteínas heterólogas e suas características.

Tabela 3.5- Estratégias de cultivo para obtenção de altas quantidades de enzimas recombinantes em *E. coli*.

Tabela 3.6 - Linhagens de *E. coli* geneticamente modificadas para produção de PGA recombinante.

Tabela 3.7 - Resumo de organismos modificados pela tecnologia de DNA recombinante produtores de PGA como leveduras e bactérias gram positivas.

Tabela 3.8 - Proteínas recombinantes que foram clonadas com sucesso em *B. megaterium*.

Tabela 3.9 - Estudos em biorreator realizados para a produção de proteínas recombinantes em *B. megaterium*

Tabela 3.10 - Operações de purificação e separação das proteínas.

Tabela 3.11 - Propriedades cinéticas com Penicilina G como substrato, de PGAs produzidas por diferentes microrganismos.

Tabela 4.1 - Composition of media used in bioreactor cultivations. Auto-induction medium: Cultivation B1; complex medium: Cultivation B2; defined medium: Cultivation B3.

Tabela 4.2 - Parameter values used for setting up the feeding flow rate (Eq. 8) for fed-batch bioreactor cultures B2 (complex medium) and B3 (defined medium)

Tabela 4.3 - Results obtained in the batch adsorption-desorption process of PGA from recombinant *E. coli* in the resin Streamline SP XL at pH 4.8.

Tabela 4.4 - PGA production in various *E. coli* expression systems for bioreactor cultures carried out under different induction strategies

Tabela 5.1 - Bacterial strains used in the present work.

Tabela 5.2 - *Bacillus megaterium* PGA activity ($U_{NIPAB/L}$) from different transformed strains. The enzymatic activity of PGA on NIPAB substrate was recorded 5 after induction with 0.5% of xylose. One unit is defined as the amount of enzyme causing an absorbance change of 1.0 cm^{-1} at 405 nm. For total protease activity was used the azocasein-azodye method. All the cultures were done in LB medium added of 2.5 mM CaCl_2 (YANG et al., 2006) and 10 $\mu\text{g/mL}$ tetracycline at 37 ° C, 250 rpm.

Tabela 5.3 - Purification profiles along PGA processing. Activity measurements (NIPAB substrate) were done along each of the purification and concentration steps. One unit is the amount of enzyme causing an absorbance change of 1.0 cm^{-1} at 405 nm.

Tabela 5.4 - *Bacillus megaterium* PGA general activity comparison with other PGA sources. Maximum activity records are compared to *B. megaterium* PGA.

Tabela 6.1 - Configuração do programa GALOP para a otimização da composição de um meio definido com o algoritmo genético.

Tabela 6.2 - Composição do meio MOPS pH 7.

Tabela 6.3 - Concentrações de sais utilizadas para a otimização do meio de cultivo.

Tabela 6.4 - Estudo da melhor fonte de carbono para a produção de PGA recombinante em *B. megaterium* PV 361.

Tabela 6.5 Composição dos melhores meios escolhidos para a produção de PGA recombinante em *B. megaterium* PV 361. Concentrações em g/L.

Tabela 6.6 - Composição dos meios utilizados para escalonamento da condição escolhida através do algoritmo genético.

Tabela 6.7 - Resultados cinéticos e produção de PGA recombinante obtidos com diferentes meios de cultivo com glicose como substrato após 12 horas de indução e com 5 g/L de xilose na metade da fase exponencial.

Tabela 6.8 - Resultados cinéticos e produção de PGA recombinante com meios de cultivo com glicerol como substrato após 12 horas de indução com 5 g/L de xilose na metade da fase exponencial.

Tabela 6.9 - Resumo dos resultados da comparação do meio B com e sem biotina para a produção de PGA recombinante em frascos agitados e biorreator de 5 L com glicerol como fonte de carbono, usando o meio B e 100 $\mu\text{g/L}$ de biotina. Cultivos induzidos na metade da fase exponencial com 5 g/L de xilose, com 12 horas de indução.

Tabela 6.10 - Composição do pulso de 150 mL para a realização dos cultivo em biorreator de 5 L com meio definido (C7) e meio complexo (C8).

Tabela 6.11 - Estudo da fonte de aminoácidos em frascos agitados usando o meio B com 5 g/L de glicerol e 5 g/L de NH_4Cl como padrão e C8.

Tabela 6.12 - Produção de PGA em *Bacillus* recombinantes e *Bacillus megaterium* selvagem em biorreator reportados na literatura.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

6-APA	6-aminopenicilânico
<i>B. megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
CM	Carboximetileno
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DEAE	Dietilaminoetil
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FDA	Food and Drug Administration
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
GdhA	Glicose Deshidrogenase
GFP	Green Fluorescence Protein
gDCW/L	Gramas de massa seca por litro
gms/L	Gramas de massa seca por litro
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo
LevB	Endolevanase
mAb	Anticorpos monoclonais
OGMs	Organismos Geneticamente Modificados
PDB	Protein Data Bank
PGA	Penicilina G Acilase
PIPE	Pesquisa Inovativa em Pequenas Empresas
PNPD	Programa de pós-graduação em pós-doutorado
PTS	Fosfotransferase do sistema de transporte de açúcar
Q	Aminoquaternário
QAE	Aminoetilquaternario
S	Metilsulfonato
SecA	Translocação da preproteína translocase
SP	Propilsulfonato
TEV	Tobacco Etch Virus
TreR	Repressor trehalose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Otimização da expressão de pga de <i>E. coli</i> por <i>E. coli</i> recombinante.....	22
2.2 Clonagem e expressão de pga de <i>B. megaterium</i> em <i>B. megaterium</i> recombinante.....	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	24
3.1 Penicilina G Acilase.....	24
3.2 Produção de proteínas a partir de Organismos Geneticamente Modificados.....	29
3.2.1 <i>E. coli</i> recombinante.....	31
3.2.1.1 Linhagens de <i>E. coli</i> usadas como hospedeiro.....	32
3.2.1.2 Vetores de expressão tipicamente usados para <i>E. coli</i>	33
3.2.1.3 Condições externas para expressão de proteínas heterólogas por <i>E. coli</i>	36
3.2.1.4 Cultivos de alta densidade celular para a produção de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	37
3.2.1.5 Produção de Penicilina G Acilase em <i>E. coli</i> recombinante.....	41
3.2.2 <i>Bacillus megaterium</i> recombinante.....	44
3.2.2.1 Produção de PGA recombinante em <i>B. megaterium</i>	45
3.2.2.2 Vetores de expressão desenhados para o <i>Bacillus megaterium</i> como hospedeiro e as proteínas recombinantes produzidas.....	47
3.2.2.3 Transformação de <i>Bacillus megaterium</i>	50
3.2.2.4 Linhagens de <i>B. megaterium</i> usadas na produção de proteínas recombinantes.....	54
3.2.2.5 Cultivos em biorreator para a produção de proteínas recombinantes em <i>B. megaterium</i>	56
3.2.2.6 Otimização dos meios de cultivo.....	59
3.3 Purificação de proteínas.....	61
3.3.1 Operações de ruptura para proteínas intracelulares.....	62
3.3.2 Adsorção.....	66
4. PRODUÇÃO DE PENICILINA G ACILASE EM <i>E. COLI</i> RECOMBINANTE.....	68
5. CLONAGEM DE PGA EM <i>BACILLUS MEGATERIUM</i>	94

6. SELEÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO E ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO DE PENICILINA G ACILASE POR <i>BACILLUS MEGATERIUM</i> RECOMBINANTE	112
6.1 Materiais e Métodos	113
6.1.1 Microrganismos	113
6.1.2 Métodos analíticos	113
6.1.2.1 Determinação da concentração celular	113
6.1.2.2 Medida da atividade enzimática de PGA de <i>B. megaterium</i> recombinante	114
6.1.2.4 Determinação da concentração de proteínas	115
6.1.3 Descrição da estratégia experimental	115
6.1.3.1 Seleção de meios de cultivo em placas de 96 poços	118
6.1.3.2. Experimentos em frascos agitados	121
6.1.3.3 Cultivos em biorreator	122
6.2 Resultados e Discussões	125
6.2.1 Seleção de meios de cultivo utilizando placas de 96 poços	125
6.2.1.1 Fonte de carbono	125
6.2.1.2 Estudo da otimização da composição de sais para as fontes de carbono selecionadas	127
6.2.2 Cultivos nos meios selecionados conduzidos em frascos agitados e biorreator de 1 L	131
6.2.3 Cultivos em biorreator de 5 L com meio B	140
6.3 Conclusões.....	148
7. CONCLUSÕES	149
8. RECOMENDAÇÕES.....	151
9. REFERENCIAS	151

1. INTRODUÇÃO

Enzimas são macromoléculas catalisadoras de reações químicas presentes em todos os seres vivos, dos quais podem ser extraídas e aplicadas, livres ou imobilizadas, em sistemas diferentes daqueles que as originaram (SAID; PIETRO, 2002).

As rotas catalisadas por enzimas são alternativas naturais quando se trata de reduzir efeitos deletérios ao meio ambiente. Alguns avanços importantes para viabilizá-las economicamente ocorreram a partir da consolidação e ampliação do acesso a técnicas de engenharia genética e metabólica e do estabelecimento de processos eficientes de imobilização de enzimas. Esse tema é de grande atualidade, sendo objeto de intensa pesquisa acadêmica e industrial (BRUGGINK et al., 1998).

Penicilina G acilase (PGA) é a enzima encarregada da desacilação de penicilina G e de cefalosporina C para a produção, respectivamente, dos ácidos 6-aminopenicilânico (6-APA) e 7-aminocefalosporânico (6-APA), produtos intermediários para produzir penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas, mediante uma acilação química com os cloretos correspondentes aos ácidos apropriados. Os produtos comerciais mais conhecidos são ampicilina, propicilina, amoxicilina, cabenicilina, oxacilina, cefalexina, cefadroxil, dentre outros (VANDAMME, 1984).

Os antibióticos β -lactâmicos, em particular as penicilinas e cefalosporinas, são os produtos mais importantes no mundo da biotecnologia. Com vendas anuais de aproximadamente 15 bilhões de dólares, representam cerca de 65% do mercado total de antibióticos (ELANDER, 2003). Estes produtos constituem a maior parte das vendas de antibióticos para a população mundial, correspondendo a 3×10^7 kg/ano dos 5×10^7 kg/ano de antibióticos produzidos no mundo (CHANDEL et al., 2008; SOUZA et al., 2005).

O consumo anual de PGA é estimado entre 10-30 milhões de toneladas (SOUZA et al., 2005). O aumento da demanda mundial por antibióticos β -lactâmicos exigiu um crescimento industrial significativo nas últimas duas décadas. As indústrias produtoras de antibióticos β -lactâmicos introduziram biocatalisadores de PGA para substituir etapas dos processos de conversão químicas em múltiplas etapas por rotas enzimáticas, de menor custo e impacto ambiental (ELANDER, 2003).

Além da hidrólise β -lactâmica, estudos recentes relatam outras múltiplas aplicações da PGA, tais como síntese de peptídeos, a resolução de misturas racêmicas a acilação enantioseletiva, a hidrólise quiral, etc. (PARMAR et al., 2000).

Penicilina G acilase pode ser produzida por diferentes microrganismos. PGAs produzidas por bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, permanecem acumuladas no espaço periplásmico e PGAs de bactérias Gram-positivas, como *B. megaterium*, são secretadas (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2004). PGA de *E. coli* 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 e de um espaçador com 26 e 54 resíduos de aminoácidos, respectivamente, resultando numa enzima madura, um heterodímero de cadeias α e β (209 e 557 resíduos de aminoácidos). Seu papel “in vivo”, embora ainda não esclarecido, deve estar relacionado com a assimilação de componentes aromáticos como fonte de carbono (CALLERI et al., 2004).

O aumento da demanda por PGA vem sendo atendido pela melhoria das condições de cultivo do microrganismo e pelo uso de microrganismos geneticamente modificados.

A produção de PGA por *B. megaterium* selvagem vem sendo estudada no DEQ/UFSCar há vários anos. Diversos aspectos da produção de PGA por *B. megaterium* foram estudados no grupo (NUCCI et al., 2007; PINOTTI et al., 2000, 2002, 2007, 2007, 2009; SILVA et al., 2006, 2008; SOUZA et al., 2005). Os resultados obtidos com o microrganismo selvagem permitiram atingir níveis de até 900 UI/L em frasco agitado e 600 UI/L em biorreator. Embora aumentos significativos na expressão da enzima tenham sido obtidos, esse estudo mostrou que, na produção de proteínas não constitutivas por microrganismos selvagens, é muito difícil encontrar uma condição operacional que conduza a alta concentração celular com altos níveis de expressão da enzima. No cultivo para obtenção natural da enzima, a produção desta está sujeita a mecanismos regulatórios de indução por ácido fenil acético e repressão por glicose e nitrogênio. Assim, uma condição necessária para crescimento pode estar inibindo a produção da enzima e se acredita, por isso, que se tenha chegado próximo da máxima produção possível da enzima, utilizando microrganismo selvagem.

Uma abordagem possível para superar essa limitação é o uso de clonagem. No cultivo de microrganismos recombinantes, a produção da enzima ficará agora sob controle do promotor inserido no plasmídeo de expressão. Indutores tipicamente usados na expressão de proteínas heterólogas são IPTG (operon lac) e xilose (operon XylA)..

O uso de microrganismos geneticamente modificados (OGMs) vem sendo explorado por diversos autores (LIN; KUO; CHOU, 2001; SOBOTKOVA; PLHSIEKOVI; KYSLIK, 1995; SOBOTKOVÁ et al., 1996; WEN et al., 2005) e as atividades enzimáticas alcançadas têm sido maiores em comparação com as obtidas nos microrganismos selvagens.

Pesquisa e desenvolvimento de processos de produção de PGA com OGMs vêm sendo realizados usando como hospedeiros *Escherichia coli* (CHENG et al., 2007; DE LEÓN-RODRÍGUEZ et al., 2006; SOBOTKOVÁ et al., 1996; WEN et al., 2005), *Pichia pastoris* (MARESOVÁ et al., 2010), *Bacillus subtilis* (ZHANG et al., 2006; ZHOU et al., 2003), *Bacillus megaterium* (YANG et al., 2006) e *Pseudomonas aeruginosa* (KRZESLAK et al., 2009).

Embora *Bacillus megaterium* esteja se destacando como um bom hospedeiro de produção para proteínas recombinantes (BUNK et al., 2009; KORNELI et al., 2013), em função de sua baixa produção de proteases, a secreção de proteínas recombinantes por essa bactéria ainda é um grande desafio (KORNELI et al., 2013). Observa-se que proteínas recombinantes intracelulares podem ser acumuladas por *Bacillus megaterium* em quantidades elevadas (STAMMEN et al., 2010), mas o nível de secreção normalmente é bastante baixo (BUNK et al., 2009; DAVID et al., 2011; MALTEN et al., 2005). Para a produção de proteínas heterólogas em *Bacillus megaterium*, a combinação do peptídeo sinal e a proteína recombinante tem uma influência específica em cada hospedeiro, sendo crucial no processo de secreção (DEGERING et al., 2010). Além disso, as fontes de carbono (KORNELI et al., 2013), a presença de sais para ajudar na secreção (DAVID et al., 2011; YANG et al., 2006) e as condições adequadas de cultivo (LÜDERS et al., 2011) devem ser criteriosamente ajustadas para se obter alta produção de proteínas recombinantes em *Bacillus megaterium*.

Iniciou-se, assim, no grupo, o estudo da intensificação da expressão de PGA de *B. megaterium*. Isso envolveu várias etapas, desde isolamento do gene de penicilina G acilase (*pac*) de *B. megaterium*, sua amplificação, clonagem num plasmídeo juntamente

com um gene promotor e inserção no próprio *B. megaterium*, que foi cultivado então para expressar a enzima, sob controle do promotor. Esse estudo, que se mostrou um grande desafio, será apresentado no capítulo 5 desta tese, correspondendo à clonagem, expressão, caracterização de PGA de *B. megaterium* em *Bacillus megaterium* recombinante, no capítulo 6 serão apresentados os cultivos deste clone, visando a alta produção da enzima recombinante.

No desenvolvimento desse trabalho, a etapa de clonagem e expressão do gene pac de *B. megaterium* se revelou trabalhosa e bem mais demorada do que o previsto inicialmente, o que estava ameaçando inviabilizar os estudos de expressão em biorreator, visando cultivo em alta densidade, um objetivo importante desta tese. Houve oportunidade, contudo, de acessarmos uma *E. coli* geneticamente modificada, expressando PGA, que nos foi doada pelo Prof. Jose M. Guisan, do ICP-Madri, com quem o grupo do DEQ-UFSCar sempre manteve estreita colaboração. Isso permitiu que, em paralelo aos estudos de clonagem de *B. megaterium*, fosse realizado um detalhado e bem sucedido estudo da expressão de PGA recombinante, usando esse microrganismo.

Diferentemente de *B. megaterium*, *E. coli* expressa a proteína intracelularmente, o que requer a busca simultânea de altos níveis de expressão genética e grande crescimento celular no biorreator (alta densidade), com expressão em alto nível da enzima solúvel, corretamente enovelada e com atividade enzimática (LIN; HSIAO; CHOU, 2002). A purificação da enzima intracelular requer ruptura das células o que, conseqüentemente, origina custos elevados para sua recuperação. Esta ruptura pode ser feita em escala laboratorial por sonda de ultrassom e, em larga escala, pela passagem das células em um homegeinizador industrial de alta pressão (PESSOA JR; KILIKIAN, 2005). O estudo da otimização da expressão de PGA de *E. coli* por *E. coli* recombinante será apresentado no quarto capítulo desta tese.

2. OBJETIVOS

2.1 Otimização da expressão de pga de *E. coli* por *E. coli* recombinante

O plasmídeo pT101/D-TOPO, contendo o gene *pac*, produtor de PGA (MONTES et al., 2007), foi doado pelo Prof. José M. Guisán, Laboratório de Biocatálisis do ICP-CSIC-Madri, Espanha, e transformado em *E. coli* BL21(DE3), tendo sido utilizado para os seguintes estudos:

- Influência da temperatura sobre o crescimento celular e a expressão de PGA em *E. coli* recombinante.
- Comparação da produção de PGA em *E. coli* recombinante em diferentes meios de cultivo, em frascos agitados: meio de autoindução (STUDIER, 2005), meio complexo (DA SILVA et al., 2013) e meio sintético (SARGO, 2011)
- Comparação da produção de PGA em *E. coli* recombinante, em biorreator, em batelada para o meio de auto-indução, e em batelada alimentada para os outros dois tipos de meio.

2.2 Clonagem e expressão de pga de *B. megaterium* em *B. megaterium* recombinante

A Clonagem do gene *pac* de *Bacillus megaterium* em *Bacillus megaterium* recombinante compreende várias etapas:

- Obtenção do DNA genômico de *B. megaterium*, e amplificação do gene de interesse (*pac*);
- Clonagem do gene amplificado no vetor de expressão, realizando testes de confirmação da clonagem, com propagação em *E. coli* DH5 α .;
- Confirmação da construção e transformação de *Bacillus megaterium*, ou seja, introdução do plasmídeo construído contendo o gene, o promotor e o gene de resistência ao antibiótico para controlar a expressão.

- Estudo da expressão do gene clonado, realizando-se ensaios de indução e expressão da proteína recombinante, através de cultivos em frascos agitados.
- Caracterização de Penicilina G Acilase: massa molecular, pH e temperatura de máxima atividade e estudos de estabilidade térmica e de pH em diferentes condições.
- Otimização do meio de cultivo, utilizando o método do algoritmo genético, tendo como variáveis de entrada nove componentes, necessários para a secreção da proteína recombinante em *B. megaterium*, visando obtenção de níveis mais altos de atividade enzimática e biomassa.
- Escalonamento do processo, desde as placas de 96 poços até o biorreator, processo em batelada, com meios definidos, usando glicose ou glicerol como fonte de carbono.
- Adição de diferentes fontes de nitrogênio de origem vegetal ou animal nas melhores condições de meios sintéticos, visando o aumento da concentração celular e atividade enzimática.
- Cultivos em batelada alimentada, visando conseguir alta densidade celular e altos níveis de expressão da enzima recombinante.

Levando-se em consideração os objetivos propostos, esta tese foi organizada em 8 capítulos. A introdução contextualizando o tema, os objetivos e a revisão bibliográfica são apresentados nos capítulos 1, 2 e 3, respectivamente. O capítulo 4 aborda os estudos realizados com *rE. coli* BL21 (DE3) transformada com o plasmídeo pT101/D-TOPO contendo o gene *pac*, produtor de PGA. Já o capítulo 5 aborda a clonagem, expressão e caracterização de *B. megaterium* em *B. megaterium*. No capítulo 6 são apresentados os resultados referentes ao processo de otimização e escalonamento do meio de cultivo sintético, indo das placas de 96 poços até o biorreator com meio sintético e é realizada uma otimização da fonte de nitrogênio por meio de meios complexos, visando a alta produção de penicilina G acilase recombinante. Finalmente no capítulo 7 são apresentadas as conclusões globais da tese e no capítulo 8 as recomendações para futuros trabalhos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

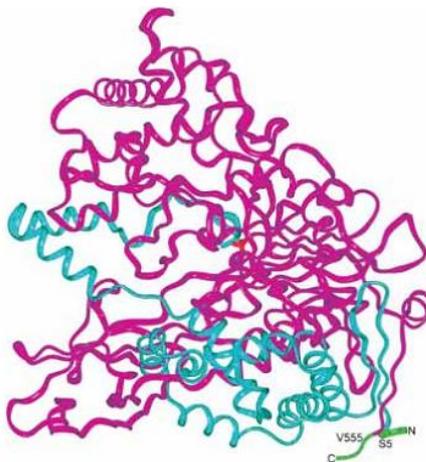
Este capítulo é composto por uma revisão da literatura sobre os principais aspectos relacionados à Penicilina G Acilase, produção de proteínas recombinantes em organismos geneticamente modificados, especificamente *Escherichia coli* e *Bacillus megaterium*. Pretende-se demonstrar diferentes tópicos para cada bactéria, evidenciando-se como os plasmídeos foram desenvolvidos, os hospedeiros, os promotores, tópicos de escalonamento, cultivos em biorreator, a produção de PGA em estas bactérias recombinantes, tópicos de purificação e também a caracterização de enzimas.

3.1 Penicilina G Acilase

As penicilinas G acilases (PGA; EC 3.5.1.11) podem ser obtidas por diferentes microrganismos: *Acromobacter spp*, *Actinoplanes spp*, *Bovista plúmbea*, *Fusarium spp*, *Kluyvera citrophila*, *Proteus rettigeri*, *Pseudomonas melanogenum*, *Streptomyces lavendulae*, *Escherichia coli* e *Bacillus megaterium* (SHEWALE; SIVARMAN, 1989).

PGA pertence à superfamília estrutural das hidrolases nucleófilo N-terminais que partilham uma dobra comum em torno do sítio ativo catalítico tendo uma serina, cisteína, ou a treonina na posição N-terminal (DUGGLEBY et al., 1995; FLORES; SOBERÓN; OSUNA, 2004) (Figura 3.1). Estudos com respeito à estrutura da PGA 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 seqüência de sinais e um espaçador com 26 e 54 resíduos de aminoácidos, respectivamente, resultando numa enzima madura, um heterodímero formado pelas sub-unidades α e β (209 e 557 resíduos de aminoácidos, respectivamente). Seu papel “in vivo” permanece não esclarecido, porém o fato da expressão ser regulada pelo ácido fenil acético faz com que haja especulações de que ela possa estar envolvida na assimilação de componentes aromáticos como fonte de carbono (CALLERI et al., 2004).

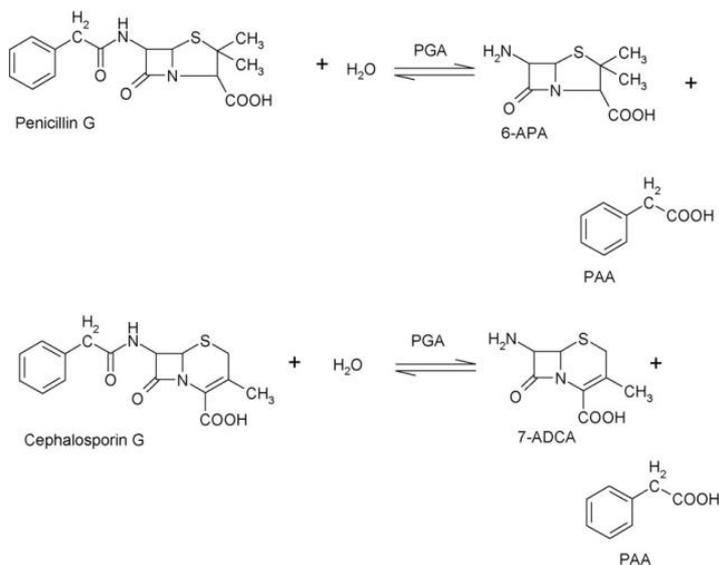
Figura 3.1 - Estrutura dimérica de PGA mostrando a sub-unidade β (violeta) e a sub-unidade α (azul claro). A região N-terminal da sub-unidade α e a C-terminal da região β são indicadas em verde. Em vermelho, no centro da molécula, encontra-se o resíduo serina catalítico.



Fonte: FLORES; SOBERÓN; OSUNA, 2004.

Funcionalmente, PGA catalisa a quebra da ligação amida entre o grupo amino primário do núcleo β -lactâmico e o grupo carboxila da cadeia lateral de diferentes antibióticos. Atua, por exemplo, sobre as cadeias laterais de penicilina G e cefalosporina G, gerando os núcleos ácido 6-amino penicilânico (6-APA) e o ácido cefalosporânico des acetoxi-7-amino (7-ADCA), deixando para trás o ácido fenil acético (AFA) como um subproduto comum (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2004) (Figura 3.2). Esses núcleos são intermediários para obtenção de penicilinas e cefalosporinas semi-sintéticas, tais como ampicilina, amoxicilina, cefadroxil, cefalexina, etc) (GEDDES; KLUGMAN; ROLINSON, 2007).

Figura 3.2 - Conversão enzimática de penicilina G e cefalosporina G em ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) e ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA), reações que têm como produto comum o ácido fenilacético.



Fonte: (CHANDEL et al., 2008).

Além de hidrolisar antibióticos β-lactâmicos, as pesquisas mostram múltiplas aplicações de PGA, incluindo síntese de peptídeos, resolução de misturas racêmicas, acilação enantioselectiva, etc. (PARMAR et al., 2000). A Tabela 3.1 resume as aplicações específicas de PGA.

Tabela 3.1 - Reações e aplicações implementadas usando Penicilina G Acilase.

Mecanismo	Aplicações	Referências
Síntese peptídica (fortificação de grupos amino)	Produção de D-fenil dipeptídeos, esteres aplicados em aditivos para alimentos, inibidores de quitinase, produção de antifúngicos, antialérgicos e compostos antivirais.	(LANGEN et al., 2000)
Resolução de misturas racêmicas	Remoção de compostos quirais (amino ácidos)	(FADNAVIS et al., 1997) (CAINELLI et al.,

	Loracarbef, síntese de cefalosporinas	1997)
	Xemilofiban, síntese de agentes antiagregantes plaquetares.	(TOPGI et al., 1999)
	Síntese de β aminoácidos.	(ROCHE; PRASAD; REPIC, 1999)
Síntese de cefalotin	Produção de cefalotin a partir de 7-ADCA e derivados de amido de ácido 2-tienilacético usando PGA	(SHAW et al., 2000)
Enantioseletividade (modulação de enantioseletividade de PGA imobilizada)	Hidrolise de iso-propilamida de ácido mandélico. Os derivados foram usados para a produção de cefamandole e cefonicidas.	(ROCCHIETTI et al., 2002)
Acilação enantioseletiva (reconhecimento enantioseletivo)	Síntese de uma série de compostos do ácido arilacético junto com derivados tioisoesteres.	(MASSOLINI et al., 2006)
Hidrolise quiral (hidrolise de dietil e dimetil fenilmalonato)	Síntese de +(-) metil fenilmalonato	(CABRERA et al., 2007)

Fonte: (CHANDEL et al., 2008).

PGAs de *B. megaterium* e *E. coli* são inibidas competitivamente pelo ácido fenilacético e não competitivamente pelo 6-APA. Os valores de temperatura e pH ótimos de ação da enzima na catálise da hidrólise de penicilina G estão comumente na faixa de 35-37° e pH 7,8-8,0, respectivamente, dependendo da origem (SAVIDGE; COLE, 1975).

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 plasmídeo

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 comparação dos mapas de restrição dos clones mostrou que os genes oriundos das linhagens de *E. coli* não apresentaram diferenças detectáveis. No entanto, existem algumas diferenças entre as linhagens de *E. coli* e de *B. megaterium*. Os resultados indicaram 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 PGA de *B. megaterium* é produzida intracelularmente em *E. coli* recombinante, porém com uma menor produção quando comparada com os genes de *E. coli*. Outro aspecto digno de menção relaciona-se com a indução por AFA. 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.

Martín *et al.* (1995) sequenciaram gene pac proveniente de *B. megaterium* ATCC 14945 e o clonaram em *E. coli* HB101. A sequência apresentou 2406 nucleotídeos com um conteúdo C+G de 37%, codificando uma cadeia polipeptídica de 802 aminoácidos. 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 maquinária de secreção de *E. coli*.

A grande demanda de PGA pode ser suprida explorando-se métodos mais econômicos de cultivo. Antigamente PGA era fabricada principalmente por cultivo em batelada alimentada, seguido por lote e processos descontínuos intermitentes com *Escherichia coli* recombinante, *Bacillus megaterium* e *Arthrobacter viscosus*, utilizando sacarose e glucose como os substratos (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2004).

Esse processo é simples, mas pouco rentável pelos requerimentos específicos no sistema, além do alto custo das fontes de carbono na cultivo. Além disso, os custos de recuperação contribuem substancialmente para o alto custo de PGA. O uso de biologia molecular pode permitir aumento considerável na produtividade da enzima, com consequente redução no seu custo de produção. Diferentes hospedeiros vem sendo testados (LIN; HSIAO; CHOU, 2002; MARESOVÁ *et al.*, 2010; RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2004; VALEŠOVÁ *et al.*, 2004; WEN *et al.*, 2005). O desenvolvimento do processo também foi estudado alterando-se os parâmetros de cultivo relacionados (LIU, CHANG; LEE, 1999) e alterando-se o meio de produção

(DE LEÓN-RODRÍGUEZ et al., 2006; PINOTTI et al., 2000, 2002; ZHANG et al., 2006).

3.2 Produção de proteínas a partir de Organismos Geneticamente Modificados

A produção de proteínas recombinantes é um campo enorme e não há indícios de que a expansão deste campo irá acabar rapidamente. Nas últimas décadas, um impressionante progresso na tecnologia de proteínas recombinantes trouxe centenas de proteínas terapêuticas em aplicações clínicas. Há diversas proteínas terapêuticas em ensaios clínicos e pesquisas científicas com o intuito de melhorar esta tecnologia. A era da biologia de sistemas é uma força motriz importante que impulsiona este campo (CHEN, 2012).

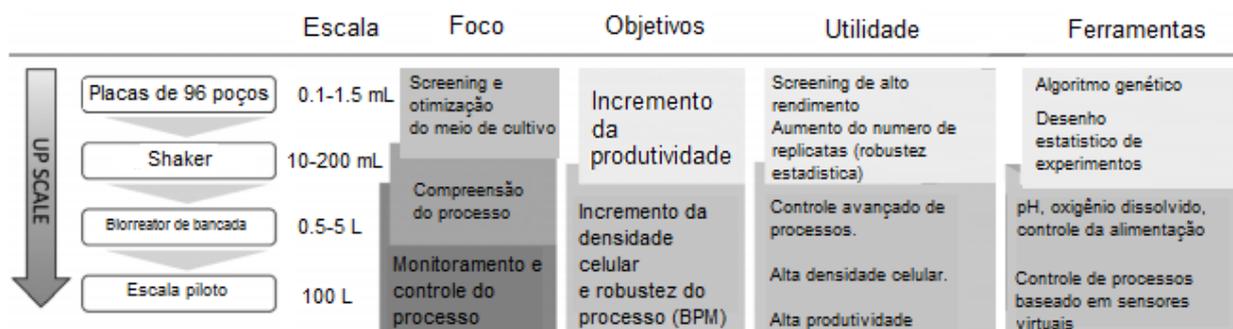
Diversas engenhosas estratégias foram desenvolvidas ao longo dos últimos anos para enfrentar esses desafios. Dentre elas, estendeu-se o volume de produção de proteínas recombinantes para centenas de metros cúbicos, já que a economia de grande escala é um critério chave para uma produção industrialmente atraente (MIERAU et al., 2005). A grande escala sempre está ligada com limitações na eficiência hidráulica e de mistura (BYLUND et al., 1998; ENFORS et al., 2001). Na Figura 3.3 é apresentado um esquema geral do escalonamento de bioprocessos em biorreator.

Consequência da dificuldade de reproduzir na grande escala as condições de mistura da pequena escala, muitas vezes as condições de grande escala apresentam um desempenho inferior, com o rendimento do produto reduzido (BYLUND et al., 1998), longo tempo de cultivo e/ou formação de produtos indesejáveis (ENFORS et al., 2001) quando os resultados são comparados com os obtidos em pequena escala.

Obviamente a produção de linhagens e condições de processo, principalmente desenvolvidas em escala de laboratório, não coincidem totalmente com o ambiente específico de um biorreator em grande escala. Isso pode ser superado, parcialmente, pelo método de tentativa e erro nas condições de processo ou estratégias de alimentação. Infelizmente, esse tipo de abordagem somente se aplica para o caso específico, e o elevado esforço empregado não proporciona uma base de conhecimento geral. Para superar tais limitações da grande escala de uma maneira mais racional, a capacidade metabólica do microrganismo parece ser um relevante ponto de partida (LEE et al.,

2011). No caso de proteínas recombinantes, se o metabolismo de um hospedeiro é bem conhecido, torna-se possível definir condições de cultivo aplicáveis para expressão de diferentes proteínas.

Figura 3.3 - Esquema geral do escalonamento de bioprocessos em biorreator.



Fonte: (DAVID et al., 2011b).

O desempenho sub-ótimo da produção em larga escala está relacionado às flutuações nos nutrientes das células produtoras, devido aos gradientes dos substratos ou do oxigênio dissolvido, que ocorre pelas limitações na mistura (CUTAYAR; POILLON, 1989).

Os mecanismos metabólicos subjacentes que causam o desempenho de produção limitada são pouco conhecidos. Isso ocorre principalmente pelo fato de que o pouco conhecimento disponível sobre as propriedades metabólicas é obtido em pequena escala, com ótimas condições de mistura, as quais não são reproduzidas no processo em grande escala.

Para investigar a influência de gradientes de oxigênio, substrato e pH sobre o desempenho do processo em escala de laboratório, já foram realizados diversos estudos de *scale-down* (BYLUND et al., 1998; KAR et al., 2008; KOHLSTEDT; BECKER; WITTMANN, 2010; SANDOVAL-BASURTO et al., 2005). Essa configuração experimental foi utilizada para simular a grande escala, e, conseqüentemente, obter condições para simular a influência de grandes gradientes de oxigênio dissolvido e concentração de substrato na produção das proteínas recombinantes.

3.2.1 *E. coli* recombinante

As proteínas são consideradas importantes desde o início do século XX, ainda quando as pesquisas científicas eram realizadas principalmente em plantas e animais. Com a chegada da tecnologia do DNA recombinante na década de 1970, descobriu-se que as proteínas terapêuticas recombinantes poderiam ser produzidas em *E. coli* de forma robusta e econômica. No começo dos anos 80, a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou a primeira insulina recombinante produzida por *E. coli*, para o tratamento da diabetes, abrindo as portas e criando um modelo para o desenvolvimento de outras proteínas terapêuticas recombinantes.

A partir dessa época, outros hospedeiros como leveduras, fungos filamentosos, células de inseto e células de mamíferos estão disponíveis para produzir outras proteínas recombinantes diferentes e mais complexas, como anticorpos monoclonais (mAb). Atualmente, mais de 151 proteínas recombinantes têm sido aprovadas pela FDA e/ou pela Agência Europeia de Medicina para diferentes indicações clínicas. Um terço das proteínas produzidas são expressadas por *E. coli*. Na Tabela 3.2 são apresentadas as mais recentemente aprovadas, indicando-se que este é o principal hospedeiro para a produção de proteínas recombinantes (HUANG; LIN; YANG, 2012).

Comparado com outros microrganismos recombinantes, *E. coli* é o mais atrativo por ser bem caracterizado geneticamente, por ser uma ferramenta de clonagem versátil e um bom sistema de expressão, além de ter sido usado com sucesso na expressão de diversas proteínas. Também é vantajoso utilizar *E. coli* para produção em escala industrial pelo seu rápido crescimento, baixo custo no meio de cultivo, fácil escalonamento e alta capacidade para produzir proteínas com alto rendimento e qualidade. Porém *E. coli* também tem várias limitações, como hospedeiro de expressão, tais como inabilidade de desenvolver algumas modificações pós-tradicionais (como glicosilação), insuficiências na maturação e também não formação de pontes dissulfeto (HUANG; LIN; YANG, 2012).

Tabela 3.2 - Proteínas terapêuticas recombinantes expressadas por *E. coli*, recentemente aprovadas.

Nome genérico (Nome da marca)	Indicação	Data de aprovação, lugar e empresa
Ranibizumab (Lucentis)	Degeneração macular relacionada à idade: Doença degenerativa que pode levar à cegueira.	2006 Estados Unidos, 2007 união europeia, Genentech.
Somatropina (Accretropin)	Deficiência no hormônio de crescimento; Síndrome de Turner: Perda parcial ou total do cromossomo X.	2008 Estados Unidos, Cangene.
Certolizumab pegol (Cimzia)	Doença de Crohn: Doença autoimune que afeta o sistema digestivo.	2008 Estados Unidos, 2009 União europeia, Union Chimique Belge.
PEG interferon alfa-2b (PegIntron)	Hepatite C crônica: doença infecciosa causada pelo vírus da hepatite C (VHC), que afecta sobretudo o fígado.	2008 Estados Unidos, Schering-Plough
Romiplostim (Nplate)	Púrpura trombocitopénica idiopática: Anticorpos do sistema imune atacam as plaquetas.	2008 Estados Unidos, Amgen.
Interferon beta 1b (Extavia)	Esclerose múltipla: Doença autoimune que afeta o cérebro e a medula espinhal.	2008 União Europeia, 2009 Estados Unidos, Novartis
Pegloticase (Krystexxa)	Gota crônica: Aumento excessivo do ácido úrico no sangue.	2010 Estados Unidos, Savient Pharms

Fonte: HUANG; LIN; YANG, 2012.

3.2.1.1 Linhagens de *E. coli* usadas como hospedeiro

Escherichia coli K12 e seus derivados são as principais linhagens utilizadas na produção de proteínas recombinantes na indústria biotecnológica. Derivados de K12 são comumente usados na indústria biotecnológica incluindo *E. coli* RV308 e W3110 (CHEN et al., 2004; FURMAN et al., 1987). Diversos estudos têm modificado

geneticamente a linhagem K12 com o intuito de melhorar a produção de proteínas recombinantes, reduzindo a acumulação de acetato durante o crescimento celular.

A linhagem *E. coli* B desenhada por Studier e Moffatt (1986) foi uma linhagem modelo utilizada para estudar sistemas de restrição-modificação, evolução bacteriana e expressão de proteínas recombinantes tanto em laboratórios quanto na indústria. Desde o modelo original essa linhagem B vem sendo modificada, criando-se linhagens adicionais como BL21, C41 e C43 que têm capacidades diferentes de expressão de diversos tipos de proteínas. A linhagem B e seus derivados tem muitas vantagens como, por exemplo, a baixa acumulação de acetato sob altas concentrações de glicose, a deficiência de proteases específicas e a alta permeabilidade na membrana exterior, sendo ótimo hospedeiro para proteínas (HUANG; LIN; YANG, 2012).

E. coli BL21 é uma cepa robusta capaz de multiplicar-se vigorosamente nos meios mínimos. Adicionalmente, é não patogênica e improvável de sobreviver em tecidos humanos e animais ou causar doenças ou intoxicações (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005a).

3.2.1.2 Vetores de expressão tipicamente usados para *E. coli*

A transcrição genética ótima normalmente é uma função da dosagem genética (plasmídeo) e de um promotor funcional. Na obtenção de proteínas recombinantes, a produtividade é afetada pelo número de cópias do plasmídeo e pela estabilidade estrutural e segregacional. A escolha do número de cópias plasmidiais ótima é crítico: um número muito baixo resultará em um baixo nível do RNA mensageiro, obtendo-se baixa produtividade de proteínas, enquanto que com um alto número de cópias, altas produtividades serão obtidas, porém, a tendência é impor um alto stress metabólico para a célula. O número de cópias do plasmídeo depende principalmente da origem de replicação, ditando um controle flexível ou rígido do plasmídeo. Sabe-se que plasmídeos de alto número de cópias (exemplo: pUC, 500-700 cópias) e plasmídeos com um número médio de cópias (exemplo: pBR322, 15-20 cópias) já foram utilizados para a produção em *E. coli* (JANA; DEB, 2005).

Um promotor gênico eficiente deve apresentar várias características desejáveis, entre elas ser forte, ter um baixo nível de expressão basal, ou seja, ser fortemente

regulado, ser facilmente transferível para outras cepas de *E. coli* para facilitar os ensaios de rendimento de proteína com um grande número de linhagens e sua indução deve ser realizada de forma simples e rentável (JANA; DEB, 2005). O promotor gênico T7, derivado de bacteriófagos lambda T7 e presente no sistema de expressão pET (comercializado pela Novagen) é, de longe, o mais utilizado na preparação de proteínas recombinantes. Em 2003, o sistema pET representou mais de 90% dos protocolos de preparação de proteínas cujas estruturas foram depositadas no PDB. Os sistemas que utilizam o promotor P_L/repressor cI como, por exemplo pLEX (Invitrogen), o promotor TRC como, por exemplo, pTrc (GE Healthcare), o promotor Tac como, por exemplo pGEX (GE Healthcare) e híbridos lac/T5 como por exemplo pQE (Qiagen), são também comumente utilizados em laboratórios de biologia molecular para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli* (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005b).

Os promotores comumente empregados para a expressão heteróloga de proteínas exigem a adição de uma molécula indutora, o esgotamento ou a adição de um nutriente ou ainda, a mudança de um fator físico ou físico-químico como o pH ou a temperatura. (JANA; DEB, 2005).

Os sistemas de termo regulação são particularmente adequados para a produção de proteínas em grande escala, pois são altamente produtivos, podem ser facilmente regulados, minimizam a manipulação das culturas e evitam o uso de produtos químicos indutores. Apesar dessas vantagens, tais sistemas ainda apresentam muitos problemas relacionados com as respostas fisiológicas durante a indução de proteínas recombinantes, o que causa um maior consumo de energia e carga metabólica, afetando a produtividade e a qualidade do produto final (VALDEZ-CRUZ et al., 2010). Na Tabela 3.4 são apresentados os sistemas de expressão mais importantes em *E. coli*.

A estabilidade do plasmídeo é influenciada por suas propriedades, incluindo tamanho e sequência de nucleotídeos, pela origem genética do hospedeiro, bem como pela temperatura da cultura, da taxa de multiplicação e das concentrações dos substratos. Uma estratégia para aumentar a estabilidade dos plasmídeos e tornar a expressão mais eficiente é o emprego de um plasmídeo “fora de controle” (*runaway*) no qual a replicação pode ser induzida de forma independente à multiplicação bacteriana e em fase específica do cultivo, permitindo mais de 1000 cópias do plasmídeo por célula hospedeira na fase de expressão (SCHMIDT, 2005).

Tabela 3.4 - Alguns sistemas de expressão em *E. coli* que são usados para a produção de proteínas heterólogas e suas características.

Sistemas de expressão baseados em	Indução (faixa de concentração)	Níveis de expressão	Características chave	Referências
Promotor lac	Adição de IPTG 0,2 mM (0,05-2 mM)	De baixo a medio	Baixo nível intracelular	(GRONENBORN, 1976)
Promotor trc e tac	Adição de IPTG 0,2 mM (0,05-2 mM)	Moderadamente alto	Alto nível, mas menor do que o sistema T7 Expressão regulada Indução com alto custo Alto nível basal	(BROSIUS; ERFLE; STORELLA, 1985)
T7 polimerase	Adição de IPTG 0,2 mM (0,05-2 mM)	Muito alta	Utiliza T7 RNA polimerase Alto nível de expressão induzível Indução com alto custo	(STUDIER; MOFFATT, 1986)
Promotor λP_L	Aumento da temperatura de 37 a 42° C (45° C)	Moderadamente alta	É requerido um hospedeiro sensível à temperatura Alto nível basal em temperaturas acima de 30° C Sem indutor	(ELVIN et al., 1990)
Promotor/operador tetA	Anidrotetraciclina 200 µg/mL	De meio a alto nível de expressão	Regulação rigorosa. Independente do estado metabólico. Independente da linhagem de <i>E. coli</i> Indutor	(SKERRA, 1994)

				relativamente econômico	
				Baixo nível de expressão basal	
Promotor araBAD (P _{BAD})	Adição de 1-arabinose (0.001-1%)	0.2%	Varia de baixo a alto nível	O nível de expressão é proporcional à dose do indutor. Regulação rigorosa. Baixo nível basal. Indutor econômico.	(GUZMAN et al., 1995)
Promotor rhaP _{BAD}	L-rhamnose	0.2%	Varia do baixo ao alto nível	Regulação rigorosa. Baixo nível basal. Indutor relativamente caro	(HALDIMANN; DANIELS; WANNER, 1998)

Fonte: TERPE, 2006.

3.2.1.3 Condições externas para expressão de proteínas heterólogas por *E. coli*

A composição do meio de cultivo deve ser cuidadosamente monitorada, pois pode ter importantes efeitos metabólicos sobre a produção de células e proteínas recombinantes. Em geral, a multiplicação de *E. coli* é inibida quando os seguintes nutrientes estão presentes acima de determinadas concentrações: Glicose (50 g/L), amônia (3 g/L), ferro (1,15 g/L), magnésio (8,7 g/L), fosforo (10 g/L) e zinco (0,038 g/L). Portanto, esses e outros componentes dos meios, sejam eles substratos ou produtos do metabolismo celular, devem ser controlados (LEE, 1996).

A temperatura também é uma variável importante que pode ser utilizada no controle do metabolismo celular. Ao se reduzir a temperatura do meio de cultivo de *E. coli* de 37° C para 26-30° C, uma redução na captação de nutrientes e na velocidade de

multiplicação pode ocorrer. Em contrapartida, a redução da temperatura de cultivo promove a redução da formação de subprodutos tóxicos, muitas vezes incrementando a quantidade e a qualidade da proteína recombinante produzida (LEE, 1996). Altas temperaturas favorecem um rápido crescimento celular, mas não a produção da proteína alvo, uma vez que o aumento da temperatura afeta a estabilidade do plasmídeo e conseqüentemente a produção da proteína (ZHANG, TAIMING; LIU, 2003). Portanto, a diminuição da temperatura durante a fase de indução constitui um método simples e eficaz para aumentar a produção de proteína (SHOJAOSADATI et al., 2008).

A estratégia de indução também foi identificada como um parâmetro crucial na produção de proteínas recombinantes. A concentração do indutor é um parâmetro que afeta o transporte do indutor, que por sua vez, afeta a taxa de produção específica. Essa variável é diretamente relacionada com a carga metabólica e, desta forma, a extensão da fase de indução depende dela (PINSACH; DE MAS; LÓPEZ-SANTÍN, 2008). Lactose e IPTG são amplamente utilizados para a expressão do gene de interesse no sistema de expressão lac/T7 de *E. coli*. IPTG é um análogo estrutural da lactose, que não é consumido durante o processo e independe de transportador para entrar na célula. Porém, por ser extremamente caro e tóxico, restringe sua aplicação como indutor em processos industriais. Já a lactose é um indutor menos caro e natural que, no entanto, apresenta baixa solubilidade em água e é consumido como fonte de carbono durante a fase de indução, fazendo com que a escolha da estratégia de indução seja uma tarefa difícil (YAN; MAO; LUO, 2004).

3.2.1.4 Cultivos de alta densidade celular para a produção de proteínas recombinantes em *E. coli*

A maneira mais simples para a produção de uma proteína recombinante é por batelada. Aqui, todos os nutrientes necessários para o crescimento são fornecidos desde o começo e existe um controle limitado do crescimento durante o processo. Este limite leva, muitas vezes, a alterações no meio de crescimento, tais como alterações no pH e na concentração de oxigênio dissolvido, bem como à depleção de substrato. Além disso, produtos inibitórios de várias vias metabólicas podem se acumular. As densidades celulares e os níveis de produção são moderados nos cultivos em batelada (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005b).

Segundo Yim *et al.* (2001) a batelada-alimentada é o modo de operação mais utilizado para atingir altas concentrações celulares. Quando aplicado para a produção de proteínas heterólogas, o cultivo é geralmente realizado em três etapas: batelada, batelada alimentada e fase de indução. Condições de cultivo como fonte de carbono, temperatura e vazão da alimentação influenciam o desempenho dos cultivos em termos de biomassa e produção da proteína recombinante (BABAEIPOUR *et al.*, 2007; PASSARINHA; BONIFACIO; QUEIROZ, 2009; RODRÍGUEZ-CARMONA *et al.*, 2012).

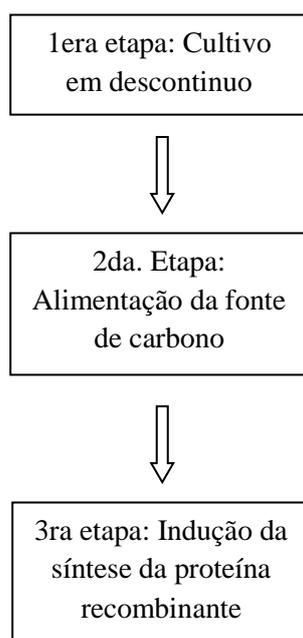
Inúmeros estudos buscam otimizar a produção da proteína-alvo através da manipulação da composição do meio de cultivo, tempo de indução, concentração do indutor e temperatura, juntamente com o controle da velocidade específica de crescimento antes e depois da indução (KILIKIAN *et al.*, 2000). Para se obter uma elevada produção da proteína recombinante é necessário, primeiramente, atingir elevadas concentrações celulares.

Além da fonte de carbono (glicose ou glicerol) e do indutor (IPTG ou lactose), o meio de cultivo utilizado pode ter grande influência, tanto na formação de biomassa como na produção da proteína recombinante. Na literatura estão disponíveis várias formulações para o meio definido, desenvolvidas especificamente para cultivos de alta densidade em batelada alimentada (KORZ *et al.*, 1995; SEEGER *et al.*, 1995). Já para o meio complexo, as formulações disponíveis são voltadas principalmente para os cultivos em shaker (STUDIER, 2005).

Em cultivos de batelada alimentada, a(s) concentração(s) do(s) substrato(s) podem ser ajustadas de acordo com a taxa de consumo e também podem ser regulados vários outros fatores com o intuito de obter o nível de produção máxima, em termos de proteína alvo por biomassa (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005b).

No caso da produção de proteínas heterólogas por *E. coli* recombinante, os cultivos em batelada alimentada podem ser divididos basicamente em três fases, conforme é apresentado na Figura 3.4.

Figura 3.4 - Etapas para cultivos em batelada alimentada de *E. coli* recombinante.



Fonte: SARGO, 2011.

A etapa 1 deste processo ocorre até que a fonte de carbono, inicialmente adicionada ao meio, seja consumida, com $\mu = \mu_{\max}$. Na etapa 2 inicia-se a fase de alimentação. Se a fonte de carbono escolhida for a glicose, essa alimentação deve ser de maneira a não permitir o seu acúmulo, evitando que ocorra a formação de subprodutos inibidores. Por tanto μ deve ser mantido abaixo do μ_{\max} . E por fim, na etapa 3 há a indução da síntese da proteína, com $\mu \ll \mu_{\max}$ devido ao alto estresse metabólico (SARGO, 2011).

A glicose é uma fonte de carbono facilmente assimilada pela *E. coli*, oferecendo elevada taxa específica máxima de crescimento. No entanto, a célula pode direcionar seu metabolismo para a formação de metabólitos indesejados, que podem causar a inibição do crescimento e produção de proteína. O acetato, conhecido por ser o principal inibidor do crescimento e síntese proteica (KLEMAN; STROHL, 1994; LEE, 1996; LULI; STROHL, 1990) é formado quando o fluxo de carbono na via metabólica central supera a demanda da biossíntese e a capacidade de geração de energia dentro da célula (LEE, 1996). Por esta razão, em cultivos em batelada-alimentada com glicose como fonte de carbono, a taxa de crescimento deve ser mantida próxima à taxa de crescimento crítica específica ($0,1 - 0,3 \text{ h}^{-1}$) durante as fases de batelada e batelada-alimentada, o que

pode ser feito promovendo o crescimento das células a uma temperatura abaixo da ideal e/ou manipulando a vazão de alimentação (KORZ et al., 1995; MENZELLA; CECCARELLI; GRAMAJO, 2003).

O glicerol é uma fonte de carbono promissora para cultivos de alta densidade celular de *E. coli*, já que ao contrário da glicose, não possui um sistema de transporte ativo para sua entrada na célula (NELSON, LEHNINGER; COX, 2008). Maiores taxas de crescimento podem ser empregadas durante a fase de alimentação sem que haja formação de acetato (SARGO, 2011).

Também já foram encontrados autores que buscam a produção de proteínas recombinantes usando resíduos agrícolas, visando diminuir o custo do processo. Já foram testados melaço de cana como indutor (ANGARDI; CALIK, 2013; CALIK; LEVENT, 2009; YE et al., 2010), soro de queijo como substrato e indutor (DE LEÓN-RODRÍGUEZ et al., 2006; VIITANEN et al., 2003), farelo de arroz como substrato (LEE et al., 2013) entre outras. Na Tabela 3.5 são mostradas as estratégias de cultivo reportadas nos últimos anos para produção de proteínas recombinantes em cultivos de *E. coli* em biorreator.

Tabela 3.5- Estratégias de cultivo para obtenção de altas quantidades de enzimas recombinantes em *E. coli*.

Construção	Enzima	Meio de cultivo	Estratégia de cultivo	Produto	Cx (gDC W/L)	Produtividade	Referência
pMalc 2x/Roseta-gami B (DE3)	Heparina	Semi-definido	Biorreator de 15 L. Batelada alimentada Mistura de IPTG e Gal como indutor	482 mg/L	32.7	10.5 mg/L*h	(RESTAINO et al., 2013)
pMFvpt/JM109	Tirosinas e	Semi-definido	Biorreator de 1.4 L. Batelada alimentada (Taxa de alimentação constante)	3000 mg/L	37	103 mg/L*h	(REN et al., 2013)

pNLE/JM109	Nitrilase	Complexo	Biorreator de 5L. Batelada alimentada (Taxa de alimentação constante)	19300 Uácido mandélico/L	10.7	4825 Uácido mandélico/L*h	(LIU et al., 2011)
pQE α β rham/M15 Δ glyA	Rhamnulose 1-fosfato aldolase (RhuA)	Complexo	Biorreator de 20 L. Alimentação linear contínua de IPTG de 0.3 μ mol a 0.6 μ mol/gDCW. Tindução=37° C	38700 mg/L	150	1759 mg/L*h	(PINSACH et al., 2008)
			Biorreator de 20 L. Alimentação linear contínua de IPTG de 0.3 μ mol a 0.6 μ mol/gDCW. Tindução=28° C	66990 mg/L	330	2392.5 mg/L*h	
pQE α β rham/M15 Δ glyA	Rhamnulose 1-fosfato aldolase (RhuA)	Complexo	Biorreator de 1 L. Batelada com redução da temperatura de indução para 28° C	5670 mg/L	27	210 mg/L*h	(RUIZ et al., 2009)
			Biorreator de 1 L. Batelada alimentada com glicose como substrato.	6690 mg/L	40	334 mg/L*h	

Fonte: elaboração própria.

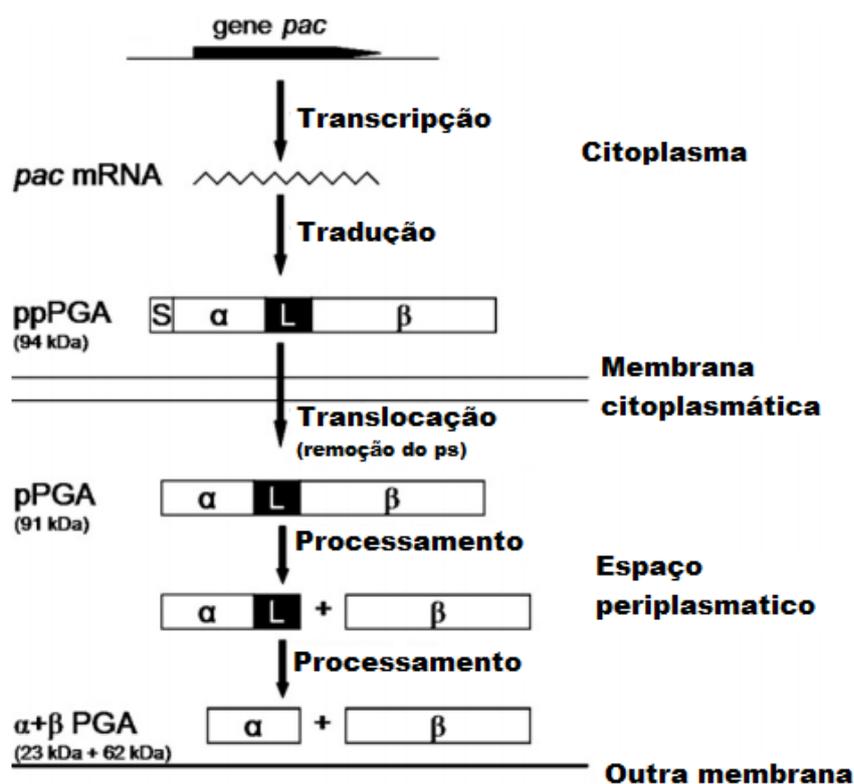
3.2.1.5 Produção de Penicilina G Acilase em *E. coli* recombinante

O processamento proteolítico de proteínas funcionais a partir de precursores polipeptídicos foi encontrado em eucariotos e vírus animais, mas poucos casos foram encontrados em bactérias (MAYER; DOHERTY, 1992). O gene *pac* é sintetizado como um precursor único no citoplasma e a sua maturação é desenvolvida através de vários passos: a remoção do peptídeo sinal na translocação da membrana citoplasmática, o processamento do peptídeo espaçador no espaço periplasmático, seguido da formação

da enzima quimicamente ativa composta pelas subunidades α e β . O processamento proteolítico pode ser observado na Figura 3.5 (KRZESLAK et al., 2009).

O processamento pós-traducional de ppPGA é acompanhado por autocatálise e vários tipos de genes *pac* (a partir de *Escherichia coli*, *Kluyvera citrophila*, *Arthrobacter viscosus*) maturam eficientemente só com temperaturas de crescimento sub-ótimas (KEILMANN; WANNER; BÖCK, 1993).

Figura 3.5 - Esquema geral de síntese e processamento de PGA em *E. coli* recombinante. O gene *pac* codifica um precursor polipeptídico de 94 kDa (ppPGA) que consiste em um peptídeo sinal (S), uma subunidade (α), um peptídeo espaçador (L) e uma subunidade (β). O peptídeo sinal é removido de ppPGA durante a translocação ao espaço periplasmático. No espaço periplasmático ainda são desenvolvidas modificações pós-tradicionais até obter a PGA envelada.



Fonte: (KRZESLAK et al., 2009).

Devido à grande demanda mundial de PGA, a tecnologia de DNA recombinante para a obtenção desta enzima em *E. coli*, vem sendo bastante utilizada. A Tabela 3.6 apresenta vários exemplos, com diferentes origens do gene *pac* e diferentes estratégias de clonagem. Os melhores resultados de aumento da atividade enzimática com a estratégia de clonagem foram apresentados por Wang *et al.* (2006). Esse grupo

conseguiu melhorar a expressão de PGA a partir de duas construções no mesmo hospedeiro, uma com o gene *pac* de *Alcaligenes faecalis* e outra com o gene *pcm*, produzindo uma proteína auxiliar. Com essa estratégia de clonagem foi possível obter 31200 U/L, valores 10 vezes maiores do que os publicados por outros grupos de pesquisa.

Tabela 3.6 - Linhagens de *E. coli* geneticamente modificadas para produção de PGA recombinante.

Origem do gene de <i>pac</i>	Hospedeiro	Características	Atividade (U/L) (Intracelular)	Referência
<i>Bacillus badius</i>	<i>Escherichia coli</i>	Vetor: pET30b sob controle do promotor T7.	1820	(RAJENDHRAN& GUNASEKARAN, 2007b)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Escherichia coli</i>	Co-expressão com o gene PCM. O gene PCM produz a proteína PIMT que evita a formação de corpos de inclusão. Vetor do gene PGA: pET43.1a Vetor do PCM: pET28a.	31200	(WANG et al., 2006)
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	<i>Escherichia coli</i>	Vetor pET28b sob controle do promotor T7	4000	(CAI et al., 2004)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Vetor pT101/D-TOPO sob controle do promotor T7	200	(MONTES et al., 2007)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Vetor pYA292 sob controle do promotor ptrc. Não precisa de indutor.	1190	(VOHRA et al., 2001)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> RE3	Vetor pKA18 induzido pelo ácido fenilacético.	4500	(SOBOTKOVÁ; GRAFKOVÁ; KYSL, 2002)
<i>Alcaligenes faecalis</i>			270	
<i>Escherichia coli</i>			280	
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	<i>Escherichia coli</i>	Vetor pET24A(+) sob controle do promotor T7	600	(CHENG et al., 2006)
<i>Providencia rettgeri</i>			320	

Fonte: elaboração própria.

A literatura reporta também protocolos bem estabelecidos para cultivos de alta densidade celular de *rE. coli* utilizando meios de cultivos baratos e biorreatores comerciais (HANNIG; MAKRIDES, 1998). No caso específico dos cultivos em biorreator para a produção de PGA por *E. coli* sob o controle do *operon lac*, na grande maioria dos estudos relatados na literatura, os cultivos foram conduzidos em batelada, com meio definido e as concentrações celulares obtidas não excederam 12 gDCW/L (IGNATOVA et al., 2003; SOBOTKOVÁ et al., 1996; WEN et al., 2005). Ainda com o meio definido, o cultivo de *rE. coli* expressando PGA foi estudado em batelada alimentada (LIN; HSIAO; CHOU, 2002; LIU; CHANG; LEE, 1999) com concentrações celulares de 34 a ~ 100 gDCW/L. Verifica-se, portanto, que apesar do grande investimento na obtenção de linhagens recombinantes *E. coli* expressando PGA, ainda há muitas possibilidades inexploradas para estudos envolvendo esses OGMs em biorreator.

3.2.2 *Bacillus megaterium* recombinante

B. megaterium tem capacidade de esporulação e destaca-se dentro do gênero *Bacillus* pelo grande tamanho de suas células vegetativas (1,0-1,3 por 2,5–6,0 µm) e esporos (0,8-1,2 por 1,5-2,0µm), origem de seu nome. Suas células vegetativas mostram-se como cilindros com extremidades arredondadas; os esporos mostram-se elipsoidais ou centrais; seu crescimento em *slant* é abundante, liso, com aparência gordurosa, translúcido para opaco, branco leitoso, sem escurecimento com o tempo; crescimento em placas mostra formação de colônias circulares, superfície rugosa, margens levemente onduladas, aspecto macio, não espalhadas, branco leitoso para amarelado e levemente aderentes. É aeróbio, não apresentando crescimento anaeróbio em glicose, com crescimento ótimo nas faixas de temperatura e pH entre 28-35° C e 7,0-8,5, respectivamente.

3.2.2.1 Produção de PGA recombinante em *B. megaterium*

Embora *E. coli* seja, de uma maneira geral, o organismo mais utilizado para a produção de proteínas recombinantes, outros hospedeiros vem sendo estudados, como a levedura *Pichia pastoris* (MARESOVÁ et al., 2010; SENEROVIC et al., 2006), *Pseudomonas aeruginosa* (KRZESLAK et al., 2009) e a bactéria *Bacillus megaterium*. Esses microrganismos apresentam várias vantagens em relação a *E. coli*, as quais estão relacionadas a diversos fatores, incluindo-se baixa produção de proteases alcalinas, sistema de secreção conhecido (YANG et al., 2006b), estabilidade plasmidial e presença de vários replicons compatíveis para a realização de novos vetores e estratégias de clonagem (ROSSO; VARY, 2005). Na Tabela 3.7 são relacionados alguns exemplos de construções com o gene de PGA clonado em vários tipos de hospedeiros.

Tabela 3.7 - Resumo de organismos modificados pela tecnologia de DNA recombinante produtores de PGA como leveduras e bactérias gram positivas.

Origem do gene de PGA	Hospedeiro	Características	Atividade (U/L) (Extracelular)	Referência
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Vetor pPICZ-A sob controle do promotor AOX1. Indução por metanol. Gene de PGA sem peptídeo sinal (produção intracelular).	25900 U/L	(MARESOVÁ et al., 2010)
<i>Providencia rettgeri</i>	<i>Pichia pastoris</i>	Vetor pPICZ sob controle do promotor AOX1. Indução por metanol	27000 U/L	(SENEROVIC et al., 2006)
<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vetor pMMB e peptídeo sinal lasB encarregado da secreção da proteína heteróloga.	118000 U/L (produção intracelular)	(KRZESLAK et al., 2009)
<i>Alcaligenis faecalis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Vetor pMA5 sob controle do promotor HpaII, com expressão constitutiva.	1960 U/L	(ZHANG et al., 2006)
<i>Bacillus megaterium</i> sem peptídeo sinal	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC14945	Vetor pMM1525, usando o peptídeo sinal Lip A próprio do vetor, sob controle do promotor	1500 U/L	(YANG et al., 2006b)

		xylA, induzindo a expressão com xilose.		
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Vetor pBA402 sob controle do promotor P43 induzindo a expressão a partir do ácido fenilacético com modificações na fonte de carbono, otimizando a produção da enzima recombinante.	40000 U/L	(YANG et al., 2001)
<i>Bacillus megaterium</i> (gene com mutações)	<i>Bacillus megaterium</i>		20400 U/L	
<i>Bacillus megaterium</i> (gene com mutações)	<i>Bacillus subtilis</i> MI113	Vetor pBA402 induzindo a expressão a partir do ácido fenilacético.	5800 U/L	(LIU et al., 2011)
<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Bacillus megaterium</i>		9000 U/L	

Fonte: elaboração própria.

Yang *et al.* (2001) subclonaram o gene *pac* do *B. megaterium* AC8904 em *Bacillus subtilis* WB600 utilizando um vetor de expressão sob controle do promotor P43. A enzima recombinante produzida em *B. subtilis* foi secretada e atingiu um nível de expressão de 40000 U/L sob condições otimizadas. A PGA purificada apresentou uma atividade específica de 45 U/mg de proteína.

Yang *et al.* (2006b) substituíram o peptídeo sinal natural do gene *pac* de PGA de *B. megaterium* e utilizaram o peptídeo sinal LipA do vetor pMM1525 para a expressão extracelular da PGA recombinante, além de otimizar o meio de cultivo adicionando aminoácidos e íons de cálcio, obtendo uma atividade enzimática extracelular de 1500 U/L o que equivale a 7 vezes a produção de PGA do *B. megaterium* selvagem, segundo os autores.

Em termos gerais, as clonagens bem sucedidas em leveduras apresentam atividades enzimáticas volumétricas 10 vezes maiores do que as conseguidas em *E. coli*, porém, as clonagens realizadas em *B. megaterium* ainda não superam as atividades enzimáticas atingidas com *E. coli*. Uma vantagem observada de *B. megaterium* com

respeito a *E. coli* é que a enzima recombinante produzida por esse microrganismo é extracelular, o que facilita a purificação da mesma. Assim, um processo bem sucedido onde se consiga alto crescimento celular, acompanhado de alta expressão da enzima, com um meio de composição controlada, levaria à obtenção de enzima já em alta concentração e facilmente recuperável. Não são reportados na literatura estudos de cultivo de alta densidade de *B. megaterium*.

Para *B. megaterium* recombinante ainda são poucas as publicações referentes a cultivos em biorreator. Suarez *et al.* (2012) realizaram cultivos em biorreator de 2 L com *B. megaterium* PV361 e QMB1551 com o objetivo de otimizar a concentração celular destas linhagens sem ter sido transformadas, atingindo concentrações celulares de 4 g/L de massa seca com meio B (Glicose, NaCl e extrato de levedura), μ_{\max} de 0.42 h⁻¹ e $Y_{x/s}$ de 0.5 g/g.

3.2.2.2 Vetores de expressão desenhados para o *Bacillus megaterium* como hospedeiro e as proteínas recombinantes produzidas

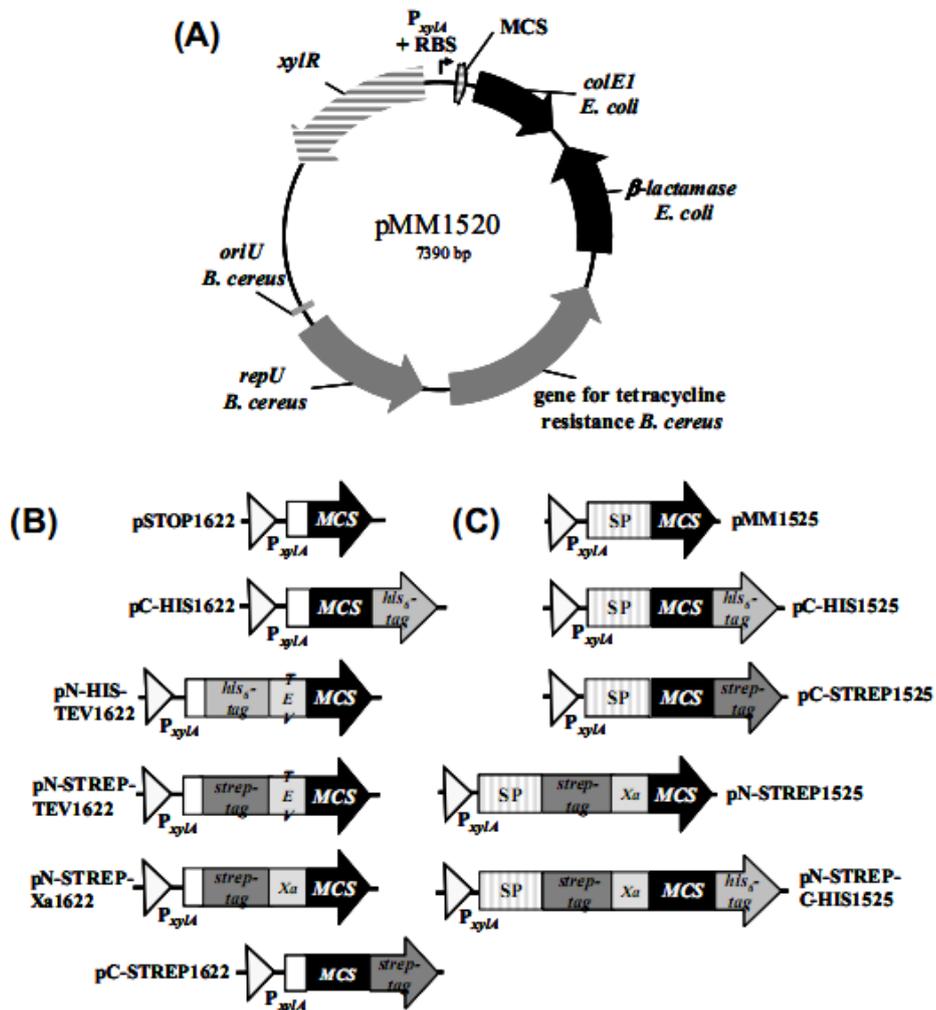
Rygu e Hillen (1991) isolaram o promotor induzível por xilose (PxylA) com o gene para a regulação da proteína repressora XylR do genoma de *Bacillus megaterium*. Na ausência de xilose, XylR se liga a uma sequência operadora localizada em PxylA impedindo a transcrição do operon xyl (GARTNER; GEISSENDORFER; HILLEN, 1988). Na presença de xilose na célula, o açúcar media uma mudança conformacional na proteína repressora, o que leva à liberação de XylR do promotor. Dessa maneira, a RNA polimerase reconhece eficientemente o promotor e a expressão do gene é induzida até 350 vezes.

Baseado neste promotor, Rygu e Hillen (1991) desenvolveram vetores de expressão comercializados pela empresa Mobitec, conhecidos como pWH1520. Muitas proteínas heterólogas já foram produzidas com grande eficiência em *Bacillus megaterium* utilizando esse vetor, tais como β -galactosidase (LacZ) (RYGUS; HILLEN, 1991), proteínas de controle catabólico (CcpA) (HUECK *et al.*, 1995; SEIDEL *et al.*, 2005), toxina A de *Clostridium difficile* (BURGER *et al.*, 2003), cobaltoquelatase (CbiX) (LEECH *et al.*, 2003), dextransucrase (WANG *et al.*, 2005), endolevanase (LevB). (DAGUER *et al.*, 2004), glicose desidrogenase (GdhA) (RYGUS; HILLEN, 1991), proteínas de choque térmico (HPr) do PTS (Fosfotransferase do sistema de

transporte de açúcar) (KRAUS et al., 1998), urokinase humana de fita simples como ativador plasminogênico (RYGUS; HILLEN, 1991), levansacarose (MALTEN et al., 2006), mutarotase (Mro) (RYGUS; HILLEN, 1991), neopululanase (KAMASAKA et al., 2002) e ATPase de translocação da preproteína translocase (SecA) (LELOUP et al., 1999).

Em outros estudos, a região do promotor do pWH1520 foi modificada e otimizada para a expressão de proteínas recombinantes (MALTEN et al., 2005, 2006). O resultado foi o vetor pMM1520, que permite a clonagem dos genes alvo usando 15 enzimas de restrição diferentes localizadas em um novo sítio de múltipla clonagem. A partir deste novo vetor, foram desenvolvidos outros vetores para a produção intracelular de proteínas recombinantes (BIEDENDIECK *et al.*, 2007). As proteínas recombinantes produzidas por esses vetores possuem cauda de histidina para fácil detecção e purificação e, durante os cultivos, não apresentam instabilidades proteolíticas em até 5 horas depois da indução, se *Bacillus megaterium* recombinante e não *B. subtilis* é o hospedeiro (MOBITEC GMBH GERMANY, 2008). Na Figura 3.6 apresenta-se o vetor pMM1520 e suas diversas modificações (VARY et al., 2007).

Figura 3.6. Vetores de expressão para a produção em *Bacillus megaterium* de proteínas recombinantes com cauda. (a) Estrutura do vetor de expressão de *B. megaterium* pMM1520 (MALTEN et al., 2005). P_{xylA}: Elemento para a expressão do gene recombinante induzido por xilose. xylR: Gene que codifica o repressor da xilose. oriU, repU e o gene de resistência para tetraciclina: Elementos para a replicação plasmidial em *Bacillus*. colE1 e o gene da β-lactamase: Elementos para a replicação plasmidial em *E. coli*. (B) Esquema dos vetores de expressão para a produção de proteínas intracelulares (BIEDENDIECK et al., 2007). (C) Esquema dos vetores para a produção de proteínas extracelulares (BIEDENDIECK et al., 2007; MALTEN et al., 2006). P_{xylA}: Promotor do xylA. TEV: Sitio de clivagem da protease TEV (Tobacco Etch Virus). Xa: Sitio de clivagem da protease Factor Xa (VARY et al., 2007).



Fonte: (VARY et al., 2007)

3.2.2.3 Transformação de *Bacillus megaterium*

Para microrganismos que apresentam espessa parede celular, como o *Bacillus megaterium*, a formação dos protoplastos parece ser uma etapa essencial para uma transformação bacteriana bem sucedida. Tal transformação consiste em inserir um vetor ou plasmídeo (DNA exógeno) numa bactéria conferindo a esta novas características, como por exemplo, resistência a determinado antibiótico (MADIGAN, 2010; SAMBROOK; RUSSELL, 2001). Quando plaqueadas em meio sólido na presença do antibiótico, as bactérias que não possuem o plasmídeo ou o vetor de clonagem molecular não formarão colônias na placa, indicando que o DNA não foi incorporado à célula. Já as bactérias que adquiriram a molécula de DNA são chamadas de transformantes ou células transformadas.

Uma vez que o plasmídeo tenha sido introduzido em uma bactéria, ambos podem replicar. Durante o processo de transformação, algumas bactérias podem não captar o plasmídeo ou podem ser transformadas com um vetor que não carrega o DNA exógeno. Na preparação, alguns plasmídeos podem reanelar sem a inclusão deste DNA. Quando a bactéria transformada se multiplica, todas as células filhas carregarão cópias do mesmo plasmídeo recombinante (DEVLIN, 2007).

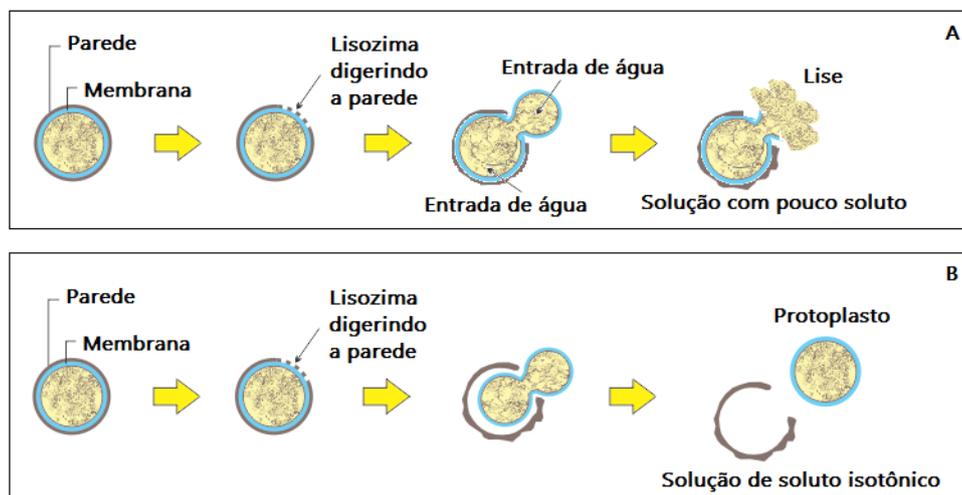
Após a transformação, as bactérias são incubadas em condições adequadas e posteriormente plaqueadas em meio sólido para o crescimento das colônias. A identificação das colônias recombinantes é feita utilizando as características conferidas pelos plasmídeos.

A preparação de protoplastos utilizando enzimas degradadoras da parede celular é um método bastante usado na preparação de células para a transformação, pois aumenta a permeabilidade de moléculas para o interior da célula. Protoplastos são células desprovidas de parede celular, o que as torna receptoras e permeáveis à entrada do DNA exógeno. Para microrganismos que apresentam espessa parede celular, como o *Bacillus megaterium*, a formação dos protoplastos parece ser uma etapa essencial para uma transformação bem sucedida.

A transformação por protoplastos pode ser didaticamente dividida em duas partes: a parte da formação dos protoplastos e a parte da transformação propriamente

dita. A Figura 3.7 apresenta o mecanismo de formação dos protoplastos quando em solução diluída e quando em solução isotônica.

Figura 3.7 - Protoplastos. (A) Em solução diluída e (B) em solução isotônica.



Fonte: Adaptado de MADIGAN, 2010.

Protoplastos são células, bacterianas ou não, que não possuem parede celular. São células com crescimento rápido e muito úteis em vários campos de pesquisa, especialmente na biologia celular. Protoplastos são esféricos e osmoticamente frágeis, pois a única barreira entre o citoplasma dessas células e o meio externo é a membrana plasmática. (DAVEY et al., 2005).

De acordo com Madigan (2010), em solução diluída, a ruptura da parede celular libera um protoplasto, que imediatamente sofre lise devido a fragilidade da sua membrana citoplasmática (Figura 3.7(A)). Já em solução isotônica, a água não penetra e o protoplasto permanece estável (Figura 3.7(B)). Isto ocorre pois se um soluto incapaz de penetrar na célula, como a sacarose, for adicionado ao meio em concentrações adequadas, haverá o estabelecimento de um equilíbrio entre as concentrações externa e interna. Se tais protoplastos estabilizados pela sacarose forem colocados em água, imediatamente sofrerão lise.

Devido à ausência da parede celular, os protoplastos são muito mais sensíveis a variações no meio de cultura e a manipulação realizada em laboratório. Porém, ao

passarem pelo processo de transformação acabam internalizando a molécula de DNA de interesse com mais facilidade. O polietilenoglicol (PEG 6000) é um agente químico que permite a passagem passiva do DNA para dentro da célula. A transformação dos protoplastos mediada por PEG tem sido utilizada para transformação de muitas bactérias.

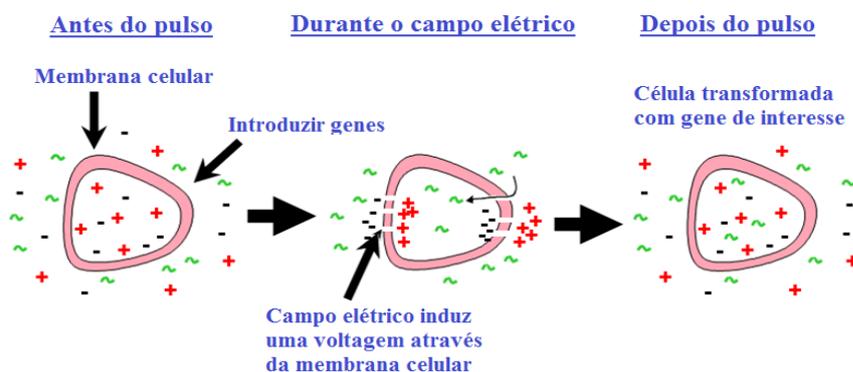
Brown e Carlton (1980) desenvolveram um sistema de transformação de plasmídeos de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* introduzidos e expressos em *B. megaterium*. Os protoplastos foram transformados pelo tratamento das células com lisozima. Segundo os autores o pré-tratamento das células com lisozima e polietilenoglicol (PEG) parece ser essencial para que a transformação ocorra.

Transformação de células de diferentes linhagens de *B. thuringiensis* por protoplastos foram realizados por (MARTIN; LOHR; DEAN, 1981). Plasmídeo pC194 de *Staphylococcus aureus* foi usado na transformação. A etapa crítica na transformação de *B. thuringiensis* foi conseguir uma alta produção de protoplastos. De acordo com os autores, a eficiência na formação de protoplastos foi afetada pela linhagem, pelo meio e pela densidade celular.

Um dos métodos mais comumente utilizados para introdução do DNA de interesse nas células é a eletroporação. A eletroporação é um método extremamente promissor devido a sua rapidez, facilidade e eficiência. Ainda não existe na literatura um protocolo reproduzível desse método descrito para a transformação do *B. megaterium* embora outras linhagens do gênero *Bacillus* tenham sido efetivamente eletroporadas, tais como: *B. subtilis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. sphaericus*, *B. licheniformis*, *B. anthracis* e muitos outros que não foram citados (BRIGIDI et al., 1990).

Na eletroporação, pulsos curtos de alta voltagem permitem uma desestabilização da membrana celular formando poros, pelos quais podem passar moléculas variadas (Figura 3.8).

Figura 3.8 - Esquema ilustrativo da transformação de uma célula bacteriana por eletroporação.



Fonte: adaptado de BTX Instrument Division/Harvard Apparatus, Inc.

A desestabilização é transitória e reversível possibilitando a entrada de moléculas sem que a célula seja destruída. Assim, a eletroporação permite a entrada de íons, fármacos, marcadores, corantes, anticorpos, e oligonucleotídeos (RNA e DNA) para dentro da célula. Esse trabalho está focado em apenas uma das possibilidades da técnica que é a inserção de um DNA contendo um gene de interesse.

Esse tipo de transformação requer a utilização de um eletroporador, que pode ser utilizado para transformação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (AUSUBEL, 1998). Entre os parâmetros que podem ser ajustados para uma condição ótima de eletroporação estão: concentração de DNA ou de células, o campo eletromagnético e comprimento de pulso elétrico.

Alguns trabalhos de transformação consultados na literatura citam que as condições de eletroporação precisam ser otimizadas para cada plasmídeo, assim como para cada vetor plasmidial com insertos de comprimentos variáveis (RHEE et al., 2007). Segundo Gehl *et al.* (2003) existem, pelo menos, três maneiras de eletroporar as células para a transferência de DNA: pulsos curtos de alta voltagem pulsos longos de baixa amplitude e pulsos curtos de alta amplitude seguidos por pulsos longos de baixa amplitude. O autor também destaca que os últimos avanços tecnológicos refinaram o equipamento de eletroporação, mudando de um pulso exponencial para um pulso de onda quadrada, no qual a amplitude e o comprimento do pulso podem ser controlados independentemente.

A técnica de transformação por eletroporação é pouco relatada na literatura para transformação de *B. megaterium*. Moro *et al.* (1995) introduziram DNA plasmidial em células vegetativas de *B. megaterium* por eletroporação. A eficiência da eletroporação aumentou gradualmente com o aumento da voltagem aplicada, porém a porcentagem de sobrevivência diminuiu. Em estudos anteriores a esta iniciação, o protocolo foi testado para eletroporação do *Bacillus megaterium*, porém, em todas as condições utilizadas não obteve-se colônias transformadas.

3.2.2.4 Linhagens de *B. megaterium* usadas na produção de proteínas recombinantes

Como pode ser observado na Tabela 3.8, as linhagens produtoras de proteínas recombinantes mais comuns para clonagem e expressão de proteínas recombinantes em *B. megaterium* são *B. megaterium* MS941 e YYBm1, devido à baixa produção de proteases. Na linhagem MS941, foi deletado o gene para a expressão de NprM, a principal protease extracelular (MALTEN *et al.*, 2005). A linhagem YYBm1 é conhecida por incrementar a quantidade de proteínas secretadas comparando com o tipo selvagem (WITTCHEN; MEINHARDT, 1995).

Com respeito às proteínas recombinantes que já foram produzidas, levansacarose já foi clonada com e sem cauda de purificação (MALTEN *et al.*, 2006) obtendo-se melhores níveis de expressão com a clonagem no Plasmídeo pMM1525 sem cauda. Com o gene da Proteína Verde Fluorescente (GFP), foram realizadas clonagens com diferentes plasmídeos e meios de cultivo (GAMER *et al.*, 2009; STAMMEN *et al.*, 2010), atingindo a melhor expressão com o vetor pSSBm85 transformado em *B. megaterium* MS941. Com esta linhagem aumenta-se 2 vezes a concentração do produto específico e quase 100 vezes a concentração final de GFP com respeito à linhagem *B. megaterium* YYBm1.

Tabela 3.8 - Proteínas recombinantes que foram clonadas com sucesso em *B. megaterium*.

Proteína	Linhagem produtora	Plasmídeo de expressão	Meio de cultivo	Produto específico	[produto] (mg/L)	Referência
Levansacarose <i>L. reuteri</i>	MS941	pMM1525	LB ^E	NR	4	(MALTEN et al., 2006)
		pRBBm15			2.1	
Levansacarose <i>L. reuteri</i> + cauda para purificação	MS941	pRBBm13	LB	NR	2.7	(MALTEN et al., 2006)
		pRBBm7			1.6	
		pRBBm16			0.8	
GFP	MS941	pRNAP-T7 pT _{T7} -GFP	LB	NR	50	(GAMER et al., 2009)
GFP	MS941	pSSBm85	MM+ Fructose	82 mg/gms	124	(STAMMEN et al., 2010)
ABF (D1.3scFV)	YYBm1	pEJBmD1.3 scFV	MM+ fructose	0.04 - 2.7 mg/gms	0.7-11.9	(DAVID et al., 2010, 2011b)

^AMedio LB

^BMedio Mínimo

Fonte: adaptado de KORNELI *et al.*, 2013a.

No trabalho de Fürch *et al.* (2007) foi realizado um estudo comparativo entre a glicose e o piruvato como fonte de carbono para a produção de uma hidrólise de *Thermobifida fusca* em *B. megaterium* recombinante. Por meio de uma análise do fluxo metabólico, notou-se incremento do fluxo para o ciclo de Krebs no momento da indução do gene recombinante. Por meio do estudo das duas fontes de carbono, obteve-se um aumento na atividade enzimática 17 vezes maior com piruvato como fonte de carbono, com respeito à glicose. O piruvato é uma fonte de carbono que ativa o ciclo de Krebs no momento da indução, fornecendo ao metabolismo celular precursores necessários, tais como os aminoácidos, diferentemente da glicose, que ativa a via das pentoses-fosfato,

co-produzindo e co-secretando proteínas indesejáveis como metaloproteases e proteases neutrais.

Yang *et al.* (2006a) testaram a adição de diferentes concentrações de CaCl_2 no meio de cultura, aumentando 2.6 vezes a produção de PGA recombinante com 2.5 mM de CaCl_2 e demonstrando a forte dependência dos íons cálcio para o correto enovelamento da enzima no meio extracelular. Se a concentração de CaCl_2 é muito maior do que 5 mM, o crescimento do microrganismo se vê afetado, inibindo o crescimento celular.

3.2.2.5 Cultivos em biorreator para a produção de proteínas recombinantes em *B. megaterium*

Conforme já comentado anteriormente, o grande desafio no uso de *B. megaterium* como hospedeiro é que, apesar de secretar as proteínas recombinantes, a concentração final de proteínas é baixa (KORNELI *et al.*, 2013a). Na Tabela 3.9, são reportados diferentes trabalhos em biorreator, mostrando que as melhores concentrações de produto obtidas ainda são baixas, comparadas aos valores reportados para *E. coli* recombinante (Tabela 3.4).

No trabalho de Wang *et al.* (2006) observou-se baixos níveis de secreção da enzima. Realizando-se a ruptura das células e análise das proteínas intracelulares, obteve-se alta concentração da enzima na fração não solúvel, o que evidencia que a etapa da secreção pode ser limitante no processo. As linhagens MS941 e WH320 derivam da mesma linhagem selvagem DSM319, demonstrando um crescimento celular similar, mas obtendo uma produção de dextransucrase recombinante muito diferente sob as mesmas condições de cultivo (WANG; HOLLMANN; DECKWER, 2006). As condições de cultivo também são importantes, portanto.

Tabela 3.9 - Estudos em biorreator realizados para a produção de proteínas recombinantes em *B. megaterium*

Proteína	Linhagem produtora	Plasmídeo de expressão	Meio de cultivo	Estratégia de cultivo	Produto específico	[Produto]	Referência
Penicilina G Acilase (ATCC 14945)	YYBm1	pRBBm49	LB	Batelada	390 U/gms	40 mg/L	(YANG et al., 2006)
Dextranucrase	WH320	pYYBm49	LB glucose	Batelada alimentada	1340 U/gms	415 U/L ^C 71700 U/L ^D	(WANG; HOLLMAN N; DECKWER, 2006)
Hidrolase de <i>T. fusca</i>	WH323	pYYBm9	LB glucose	Batelada alimentada	2156 U/gms	7593 U/L	(YANG et al., 2007)
GFP	YYBm1	pSSBm85	LB MM+ Fructose	Batelada alimentada	36.8 mg/gms	1250 mg/L	(STAMMEN et al., 2010)
Levansacarose	YYBm1	pRBBm112	MM	Batelada alimentada	0.67 g/g Proteína	520 mg/L	(KORNELI et al., 2013b)

^CFração solúvel

^DFração não-solúvel

Fonte: adaptado de KORNELI *et al.*, 2013a.

Lüders *et al.* (2011) realizaram um estudo da influência do stress hidromecânico e da temperatura em biorreatores de 2 L, no intuito de melhorar o crescimento e a produção de anticorpos em *B. megaterium* recombinante. Por meio de um planejamento de experimentos, concluiu que os melhores resultados para esse processo são obtidos com agitação mais baixa (mudando de 500 min⁻¹ para 250 min⁻¹) e temperaturas mais altas (de 37° C para 41° C) na fase de produção aumentando a concentração dos anticorpos recombinantes de 0.04 mg/L para 0.92 mg/L, obtendo-se concentrações 23 vezes maiores da proteína alvo nestes experimentos, além de μ máximo de 0.8 h⁻¹. Na verdade, a alteração das duas variáveis provocam aumento nos efeitos difusivos no sistema, alterando, conseqüentemente, concentrações de nutrientes chaves do metabolismo no sentido favorável à produção da enzima.

No trabalho de David *et al.* (2011b) foi realizado o processo de escalonamento na produção de anticorpos recombinantes, desde as placas de 96 poços até o biorreator

de 100 L, otimizando o meio de cultivo, as concentrações dos íons metálicos, dos sais, do indutor e a estratégia de alimentação, o que levou a aumento de aproximadamente 3000 vezes na produção do anticorpo recombinante.

Korneli *et al.* (2011) realizaram o método de *scale-down* para a produção de *Green Fluorescent Protein* (GFP) recombinante em *B. megaterium* com o objetivo de investigar o papel do substrato e dos gradientes de oxigênio dissolvido sobre a produção da proteína recombinante. Por meio da realização de múltiplos experimentos em biorreator de bancada, foram simuladas condições de grande escala, concluindo-se que as concentrações de biomassa e GFP, juntamente com baixa formação de subprodutos, podem ser alcançados mantendo-se gradientes de oxigênio dissolvido com baixa amplitude e alta frequência. A magnitude dos gradientes tem maior influência para a expressão da proteína do que o tipo de oscilação, uma vez que a taxa da diminuição da produção de GFP foi maior para altos gradientes constantes do que para altos gradientes oscilantes. Concluiu-se que para processos industriais destinados a atingir altas densidades celulares e uma produção ótima da proteína recombinante, pode ser vantajoso alimentar a fonte de carbono em diferentes pontos do biorreator, com baixas taxas de fluxo para obter uma boa mistura, com o intuito de evitar gradientes elevados, atingindo baixas frequências de flutuação nas concentrações de oxigênio dissolvido.

Korneli *et al.* (2012) investigaram a produção da proteína recombinante GFP em *B. megaterium* enfocando o estudo no perfil de alimentação em dois ambientes de processo: um primeiro, imitando as limitações de mistura da grande escala, e um segundo, no processo de mistura bem feito da pequena escala. Com as condições de processo de grande escala, foram obtidos rendimentos 40% menores da proteína alvo com respeito à pequena escala. Fez-se uma análise completa do metabolismo subjacente, identificando as limitações potenciais introduzidas pelo ambiente flutuante do reator. Foram encontradas grandes diferenças de aminoácidos livres entre os dois ambientes e realizou-se um estudo da suplementação dos aminoácidos mais limitantes na grande escala como histidina, triptofano, glutamato, asparagina e lisina no meio de alimentação durante a batelada alimentada, incrementando a produção da proteína recombinante em 100%.

3.2.2.6 Otimização dos meios de cultivo

Na otimização de processos biotecnológicos, o projeto de experimentos sistemático utilizando métodos estatísticos é bastante conhecido. Em princípio, o método mais popular para otimização de processos é desenvolvido alterando-se uma variável em cada experimento, o que é chamado de método de otimização *one at time*. Esse método além de tedioso, consome muito tempo e não é eficiente em todos os casos. Além disso, assume-se que não ocorrem interações entre os componentes do meio de cultivo. Em muitas otimizações do meio, tal condição não pode ser assumida, já que os resultados são composições de meio sub-ótimas (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

Atualmente, são reportados muitos casos de aplicações bem sucedidas de métodos estatísticos em processos de otimização de meios de cultivo. Existem diversas publicações científicas relacionadas com os meios de cultivo e para este fim, geralmente cada laboratório usa sua própria estratégia (AYADI et al., 2011; BEIGI; KARBALAEI-HEIDARI; KHARRATI-KOPAEI, 2012; CUI, 2010; MINJIE; ZHONG-PING, 2013; MONTEAGUDO et al., 1993; SHAN et al., 2011).

Para a aplicação da metodologia da superfície de resposta, deve ser assumido um modelo para a determinação da influência relativa de vários componentes no meio. Esse modelo é usado para calcular as concentrações ótimas da função objetivo. Muitos projetos estatísticos fatoriais variando de 2 fatorial até projetos multifatoriais já foram realizados para a otimização de condições do processo fermentativo (LEE et al., 2006; LEE; KIM; KIM, 2012; RINCON et al., 1993; SARRA et al., 1993).

Devido ao grande número de nutrientes a serem analisados e otimizados, o uso de experimentos multifatoriais é bastante complexo. A otimização de meios de cultivo é realizada em duas etapas. De acordo com a lei de Paratoc, um *screening* inicial dos ingredientes é feito para compreender a importância do seu efeito sobre a formação do produto e, em seguida, os melhores componentes são selecionados para otimizações adicionais (GANAPATHY; NARAYANA; SUBRAMANYAN, 1998).

O método estatístico Plackett-Burman oferece um projeto em que n variáveis são estudadas em $n+1$ ensaios experimentais. Esses experimentos estão disponíveis em múltiplos de quatro corridas e, portanto, é um bom método, com um número de experimentos não muito grande, levando-se a economia de tempo, produtos químicos,

vidraria e mão de obra (LIANG et al., 2011; NAVEENA et al., 2003; RASHID; SAMAT; YUSOFF, 2012).

O método do algoritmo genético já foi aplicado na otimização de meios de cultivo (BASKAR; RENGANATHAN, 2012; HUTWIMMER et al., 2008; JIANFEI et al., 2012). Esse método foi desenvolvido por Holland (1975) e tenta imitar os processos observados na evolução natural. Uma quantidade de experimentos é manipulada com operadores genéticos de seleção, cruzamento e mutação para atingir um experimento ótimo. O algoritmo genético oferece algumas vantagens com respeito a outros métodos: os experimentos são realizados a partir de um grupo de experimentos e não a partir de um único experimento, trabalha-se com parâmetros contínuos e discretos e explora-se o espaço de parâmetros. A maior desvantagem deste método é o custo computacional do grande número de corridas necessárias para avaliar o conjunto de experimentos para cada geração.

No caso da otimização de meios; as condições para cada cultivo - o que significa diferentes composições de meio - são codificadas em um cromossomo em que cada constituinte do meio na concentração definida representa um gene. Depois de completar a primeira geração de experimentos, os cromossomos com a maior produtividade são selecionados e replicados proporcionalmente à sua produtividade. Depois dessa replicação, desenvolve-se o cruzamento de cromossomos e mutação de alguns genes escolhidos randomicamente. Desta forma uma nova geração de experimentos é obtida.

Esse método já foi utilizado por Weusterbotz *et al.* (1994) no processo contínuo de produção da enzima formato desidrogenase (FDH) pela levedura *Candida boidinii*. Utilizando o algoritmo genético, as concentrações de 14 componentes do meio de cultivo (elementos traço e vitaminas) foram otimizadas com 125 experimentos, levando-se à atividade enzimática máxima, em frascos agitados, com o uso mínimo de sais nutrientes. Depois dos experimentos em pequena escala, foi empregado o meio otimizado em escala piloto, aumentando-se em 50% a produção de FDH com respeito ao meio controle, utilizando-se as mesmas condições de cultivo.

Zuzek *et al.* (1996) otimizaram a biossíntese de mevinolina produzida por *Aspergillus terreus* ATCC 20542, selecionando-se dez componentes diferentes para a otimização do meio de cultivo. Para a obtenção de uma maior eficiência, o método foi suportado por um modelo construído com o método de aprendizagem do sistema para

predizer a produtividade. Depois de quatro gerações de experimentos de cultivo, a produtividade foi incrementada em torno de três vezes.

David *et al.* (2010) realizaram uma otimização do meio definido para a produção de fragmentos de anticorpos em *B. megaterium* YYBm1 recombinante. Os íons metálicos podem aumentar ou diminuir a função de enzimas; para fins de otimização alterar somente um componente não é aplicável, dado que deve ser considerada a interação entre diferentes concentrações de íons metal.

Usando uma abordagem de algoritmo genético, um espaço grande de parâmetros pode ser abrangido, investigando-se a possibilidade de encontrar apenas um máximo local para o objetivo do experimento. Encontra-se, dessa maneira, o meio que oferece as melhores condições de crescimento, sendo que este é diferente ao meio ótimo para a produção da proteína recombinante alvo. A produção da proteína recombinante foi incrementada 117%, demonstrando-se a grande importância dos íons metal na produção desta proteína recombinante e oferecendo-se os parâmetros adequados para o cultivo em grande escala.

3.3 Purificação de proteínas

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, geralmente é possível escolher uma sequência de etapas de separação para qualquer proteína, que irá resultar em um grau elevado de purificação e alto rendimento. O objetivo é aumentar a pureza ou a afinidade biológica da proteína desejada por unidade de peso, pela eliminação das proteínas inativas ou indesejáveis, ao mesmo tempo em que se eleva a rendimento 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 cultivo e trabalha-se com a parte líquida; porém quando a proteína é produzida intracelularmente, faz-se necessário realizar o rompimento das células antes de dar início as etapas de purificação propriamente ditas.

As propriedades das proteínas em solução são levadas em consideração para separar misturas de proteínas e o conhecimento de algumas propriedades da enzima em estudo facilita a escolha de determinados métodos. A Tabela 3.10 apresenta as operações de purificação baseadas nas propriedades das proteínas.

Tabela 3.10 - Operações de purificação e separação das proteínas.

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 de 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

Fonte: PINOTTI, 2003.

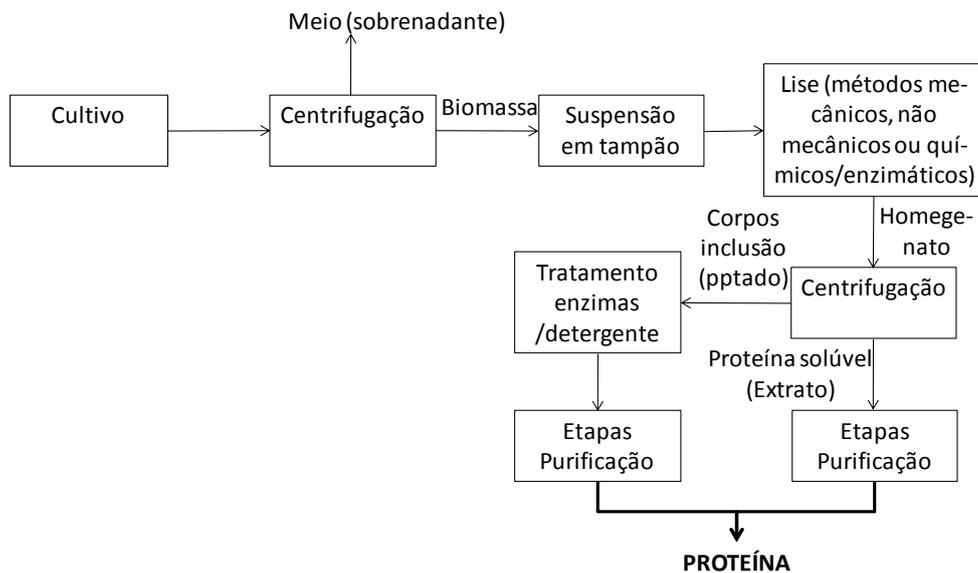
3.3.1 Operações de ruptura para proteínas intracelulares

As proteínas produzidas por *E. coli* são tipicamente intracelulares e encontradas no citoplasma ou na região periplasmática, tanto na forma solúvel como na forma de agregados insolúveis, denominados corpos de inclusão (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005a).

Devido à ocorrência intracelular, são empregados métodos de lise mecânicos e não-mecânicos para romper as células e extrair as proteínas recombinantes. Quando a proteína de interesse está presente na fração solúvel, ela pode ser recuperada pelos procedimentos de purificação convencionais a partir do extrato bruto, o qual é separado dos debris celulares por centrifugação. Quando a proteína de interesse está presente na fração insolúvel, além das etapas de ruptura e centrifugação, são necessárias etapas

adicionais de lavagem e tratamento com enzimas ou detergentes para a solubilização do agregado e ainda de renaturação das proteínas solubilizadas, a fim de se obter um produto funcionalmente ativo (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005a). Essa sequência de etapas requeridas para a obtenção do bioproduto de interesse armazenado nas células de *rE. coli* está representada esquematicamente na Figura 3.9.

Figura 3.9 - Representação esquemática do processamento da biomassa obtida em cultivos de *E. coli* geneticamente modificada para recuperação da proteína heteróloga.



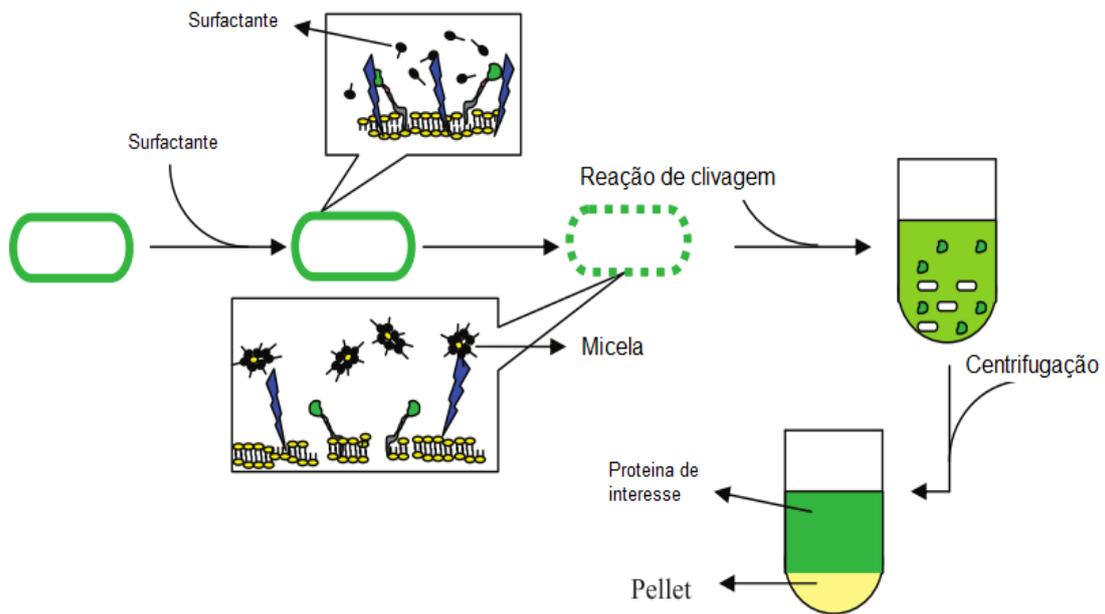
Embora a principal contribuição para o elevado custo do processo de produção de uma proteína recombinante seja a sequência final de etapas de purificação, a operação de ruptura das células tem uma importância fundamental, já que a quantidade de proteína disponível para purificação depende essencialmente da eficiência dessa operação.

Os principais métodos de rompimento celular são divididos em químicos, não-mecânicos, mecânicos e enzimáticos (RAMANAN et al., 2010). Os métodos químicos são baseados na adição de álcalis, solventes, detergentes, surfactantes e ácidos para promover o ataque às estruturas celulares, este método é ilustrado na Figura 3.10a. Os métodos não-mecânicos mais comuns são o choque osmótico, congelamento ou descongelamento (*freeze-thaw*), aquecimento e secagem (Figura 3.10b). Nos métodos mecânicos são empregados equipamentos como o homogeneizador de alta pressão, o moinho de bolas, a prensa francesa e a sonicação (Figura 3.10c). Finalmente, os

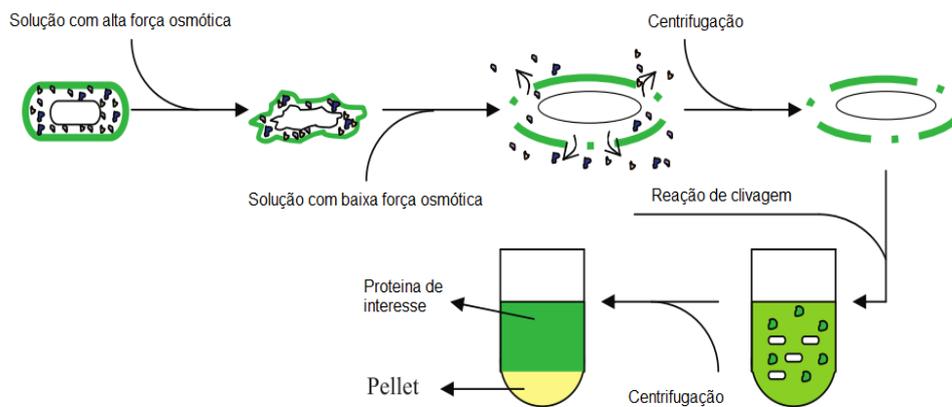
métodos enzimáticos são baseados na incubação da suspensão celular com lisozimas que degradam a parede celular (SANTOS et al., 1996).

Figura 3.10. Esquema gráfico ilustrando a ruptura celular por meio de três diferentes métodos: (a) Adição de produtos químicos (b) Choque osmótico (Método não-mecânico) (c) Ruptura mecânica.

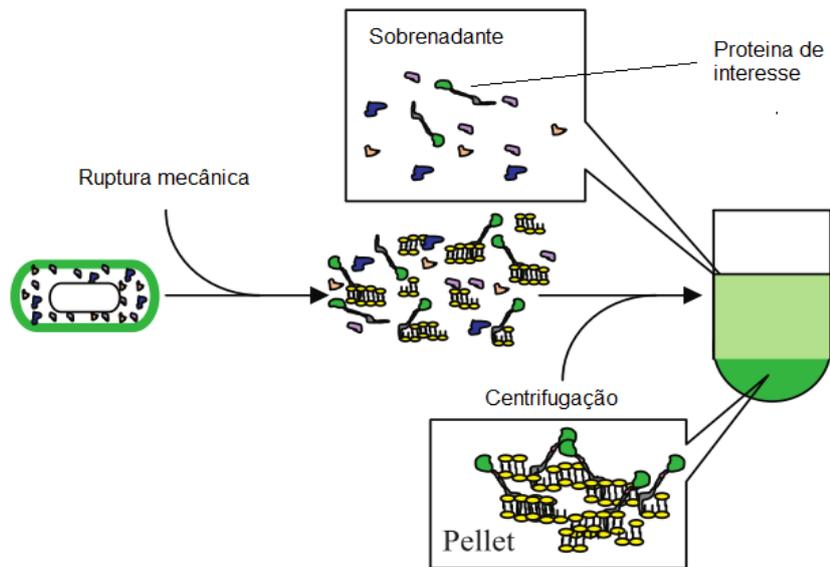
(a)



(b)



(c)



Fonte: WU *et al.*, 2012.

A ruptura por meio de produtos químicos é dividida em álcalis, surfactantes e solventes. Os álcalis mais utilizados são amônia e hidróxido de sódio, pois causam inativação de patógenos ou microrganismos geneticamente modificados durante o rompimento. A geração de poluentes é a principal desvantagem no uso de álcalis em rompimento celular. Os surfactantes têm a propriedade de dissociar proteínas e lipoproteínas das paredes celulares, provocando formação de poros e liberando a molécula-alvo. A eficiência do rompimento depende do pH e da temperatura e pode ser aumentado por um pré-tratamento à base de solventes orgânicos que iniciam e estimulam a autólise. Os solventes podem ser utilizados em desidratantes químicos das células. Esse procedimento é indicado somente para biomoléculas que não sejam desnaturadas na presença do solvente empregado (NAGLAK, T. J., HETTWER, D. J. E WANG, 1990).

O método proposto por choque osmótico (NEU; HEPPEL, 1965) foi utilizado para a clivagem da membrana exterior da célula e eliminação da maior parte das impurezas nas células. Por suspensão das células numa solução concentrada de sacarose e, em seguida, mudando-se para um meio de baixa força osmótica, a superfície exterior da membrana da célula pode ser quebrada e dissociada. Além disso, no processo de choque osmótico, espera-se que as impurezas no espaço periplasmático sejam

dissolvidas na solução de baixa força osmótica. Depois, o sedimento é recolhido imerso no tampão de clivagem para obter-se a proteína de interesse no tampão (WU et al., 2012).

Na sonicação o rompimento é causado por vibrações sonoras na suspensão de células; esse procedimento é adequado para processar pequenos volumes de suspensões celulares. Para promover a ruptura de grandes quantidades de biomassa em suspensões concentradas, utiliza-se a *french press* ou o homogeneizador. O princípio de operação da *french press* é baseado no rompimento por pressão, enquanto o homogeneizador utiliza a pressão exercida sobre a suspensão quando forçada, através de um orifício, realizando rompimento por cisalhamento da célula (PESSOA JR; KILIKIAN, 2005).

Embora o uso da sonicação esteja relatado na literatura com mais frequência, esse método mecânico de rompimento de células só é adequado para processamento de suspensões celulares em escala de laboratório. Para operação em escala industrial, o equipamento mais recomendado é o homogeneizador de alta pressão (HAP) para rompimento de células de *E. coli* (LI et al., 2012). As variáveis mais importantes que devem ser estabelecidas na operação do HAP são a pressão, a vazão de recirculação e o número de ciclos. A concentração da suspensão, assim como as características da proteína a ser recuperada (localização na célula e fragilidade da estrutura), precisam ser levadas em consideração na escolha das condições de operação (RAMANAN et al., 2009).

3.3.2 Adsorção

O processo de adsorção é uma técnica bastante utilizada na purificação e contração de proteínas, sendo que a adsorção por troca iônica baseia-se na distribuição de cargas das proteínas. 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) e aminoetilquaternário (QAE). Nos segundos, os ligantes estão carregados negativamente e entre eles, há os

carboximetileno (CM), metilsulfonato (S) e propilsulfonato (SP). As proteínas, como regra geral, ficam carregadas positivamente com valores de pH baixos, pois os resíduos dos aminoácidos estão protonados e pelo contrário e valores de pH elevado apresentam, geralmente, 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 difusão dificultada das proteínas nos poros de pequeno diâmetro. A típica capacidade de adsorção de proteínas para esses adsorventes é de aproximadamente 100 mg proteínas/mL de gel, sendo também afetada por fatores externos, como por exemplo, o valor do pH e a concentração de sal no tampão.

A adsorção em Leito Expandido (ALE) é uma tecnologia que apresenta diversas vantagens, dentre 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 (SHEPARD; BOYD; SCHRIMSHER, 2001).

PGA de *B. megaterium* selvagem é secretada no meio de cultura e um baixo número de contaminantes e subprodutos são secretados junto com a enzima, comparando com a produção intracelular de *E. coli*. Pinotti *et al.* (2009) realizaram um estudo comparativo entre a adsorção de PGA de *Bacillus megaterium* selvagem (processo extracelular) com PGA de *E. coli* (processo intracelular). O cultivo de *B. megaterium* foi realizado com soro de queijo e aminoácidos para aumentar a expressão da enzima (PINOTTI *et al.*, 2000, 2007). Foram encontradas dificuldades no processo de adsorção de PGA de *Bacillus megaterium* devido aos contaminantes de baixo peso molecular presentes neste tipo de cultivo e o rendimento da eluição foi de 100% para *E. coli* e de 51.8% para *B. megaterium*.

4. PRODUÇÃO DE PENICILINA G ACILASE EM *E. COLI* RECOMBINANTE

Artigo submetido à revista BMC Biotechnology.

High-throughput strategies for penicillin G acylase production in *rE. coli* batch and fed-batch cultivations

Ana Maria Vélez¹, Adilson José da Silva¹, Antonio Carlos Luperni Horta², Cintia Regina Sargo¹, Gilson Campani¹, Gabriel Gonçalves Silva¹, Raquel de Lima Camargo Giordano¹, Teresa Cristina Zangirolami^{1*}

¹Chemical Engineering Department, Federal University of São Carlos (UFSCar),

Rodovia Washington Luís, km 235, C.P. 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

²Institute of Chemistry, Federal University of Goiás, Campus Samambaia, C.P. 131, CEP 74001-970, Goiânia, GO, Brazil

*Corresponding author:

E-mail: teresacz@ufscar.br

Phone: +55 16 3351 8710

Fax: +55 16 3351 8266

Abstract

Penicillin G acylase (PGA) is used industrially to catalyze the hydrolysis of penicillin to obtain 6-aminopenicillanic acid. In *Escherichia coli*, the most-studied microorganism for PGA production, this enzyme accumulates in the periplasmic cell space, and temperature plays an important role in the correct synthesis of its subunits. This work investigates the influence of medium composition, cultivation strategy, and temperature on PGA production by recombinant *E. coli* cells. Shake flask cultures carried out using

induction temperatures ranging from 18 to 28 ° C revealed that the specific enzyme activity achieved at 20° C (3000 IU/gDCW) was 6-fold higher than the value obtained at 28° C. Batch auto-induction cultures and high cell density fed-batch bioreactor cultures were performed using the selected induction temperature, with both defined and complex media, and IPTG and lactose as inducers. Final biomass concentrations of 100 and 120 gDCW/L, and maximum enzyme productivities of 7800 and 5556 IU/L.h, were achieved for fed-batch cultures using complex and defined media, respectively. To the best of our knowledge, the volumetric activity and productivity values achieved using the complex medium are the highest ever reported for PGA production. The defined medium was found to be unsuitable for induction performed at low temperature (20 °C), because the precipitation of salts restricted growth and enzyme synthesis. Overall PGA recovery yields of 64 and 72% after purification were obtained for crude extracts obtained from cells cultivated in defined and complex media, respectively. The complex medium was most suitable for PGA production, and could be used in both fed-batch and straightforward auto-induction protocols.

Keywords: Penicillin G acylase, recombinant *E. coli*, auto-induction medium, fed-batch culture.

4.1 Introduction

Penicillin G acylase (PGA) is used industrially to catalyze the hydrolysis of penicillin to obtain 6-aminopenicillanic acid (6-APA). β -Lactam antibiotics account for the largest fraction of global sales of antibiotics, and comprised 60% of the 5×10^7 kg/year produced worldwide in 2003 (ELANDER, 2003). The production of semi-synthetic β -lactam antibiotics requires ever-increasing quantities of PGA, and the annual consumption of this enzyme is estimated to be in the range of 10–30 million tons (SOUZA *et al.*, 2005). The unsatisfied demand for PGA at an acceptable cost could be met by improving the processes used for its production.

PGA can be produced by a variety of microorganisms, including bacteria, fungi, and yeasts. The microorganism that has been most widely studied for this purpose is *Escherichia coli*, which accumulates the enzyme in the periplasmic cell space. The enzyme precursor is synthesized as an inactive 96 kDa pre-pro-PA, which contains a

signal peptide at its N terminus (IGNATOVA et al., 2003) that mediates the translocation of pro-PA into the periplasm. This intermediate is further processed into α (23 kDa) and β (63 kDa) PGA chains during autoproteolytic reactions (HEWITT et al., 2000).

In the past, PGA has mainly been manufactured by fed-batch fermentation, as well as by batch and intermittent batch processes, using recombinant *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, or *Arthrobacter viscosus*, and sucrose or glucose as carbohydrate substrates (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2004).

Optimization of the performance of cultures for recombinant enzyme production has two main objectives: high-level gene expression, and intense formation of biomass containing a high activity level of soluble, correctly-folded intracellular enzyme (LIN et al., 2002).

Strategies for high-level gene expression involve increasing the efficiency of one or more gene expression steps (IGNATOVA et al., 2003). In the case of the *pac* gene, many different procedures have been employed to this end. The efficiency of transcription and/or translation of the *pac* gene can be genetically modulated by mutation or removal of the regulatory region, mutations in the translation initiation region, or by replacement of the *pac* promoter (AKKAYA et al., 2012; CHOU et al., 1999b). The post-translational processes, which are crucial for obtaining soluble active PGA, have been investigated to identify optimum host/vector combinations that can efficiently produce the mature protein (IGNATOVA et al., 2003; LIN et al., 2002), with co-expression of helper proteins that assist the formation of correctly-folded active PGA (LIN et al., 2002; WANG et al., 2006). In addition, cloning the *pac* gene from different microorganisms in *E. coli* is another strategy that has been used to improve enzyme production (CAI et al., 2004; MARTÍN et al., 1995).

Temperature plays a very important role in modulating the expression of key genes involved in PGA production (RODRÍGUEZ-CARMONA et al., 2012; WENG et al., 2006). *Escherichia coli* only synthesizes PGA below 30° C (KEILMANN et al., 1993), because the rate of protein synthesis is reduced at low temperatures, which increases the formation of correctly-folded biomolecules. Selection of a suitable temperature is also crucial to ensure that a balanced flux is maintained throughout the stages of protein synthesis (transcription and translation) and maturation (translocation and periplasmic

processing), in order to avoid accumulation of immature PAC precursors and optimize expression of the *pac* gene (CHOU et al., 1999). Otherwise, the formation of insoluble protein aggregates (inclusion bodies) can occur (SØRENSEN; MORTENSEN, 2005). Keilmann *et al.* (1993) also reported that the initiation step of translation of the *pac* mRNA is blocked at high temperatures.

The production of PGA in bioreactor cultivations has been widely studied using both batch (CHENG et al., 2007; KARTHIKEYAN et al., 2011; WEN et al., 2005) and high cell density fed-batch cultures (DE LEÓN-RODRÍGUEZ et al., 2006; LIN; HSIAO; CHOU, 2002; LIU; CHANG; LEE, 1999). Fed-batch cultivation is considered to be the most efficient process for the production of inducible heterologous proteins, including PGA, because the nutrient supply can be modulated to firstly achieve high biomass formation and then proceed with the induction (CHANDEL et al., 2008). However, performing a high cell density culture (HCDC) is a challenge, mainly because control of both the dissolved oxygen concentration and the flow rate of the feed medium is problematic at high biomass concentrations (HORTA et al., 2012; LIU; CHANG; LEE, 1999).

The auto-induction approach (LEE; KEASLING, 2008; STUDIER, 2005) offers an alternative to fed-batch cultures. Biomass concentrations of up to 80 gDCW/L (DA SILVA et al., 2013; JIA et al., 2011) can be obtained directly from batch experiments employing a mixture of glucose, glycerol, and lactose, with minimal requirements for handling of the expression culture (TYLER et al., 2005). However, this strategy has not yet been reported for PGA production in shake flask or bioreactor cultures of recombinant *E. coli*.

The composition of the culture medium is another important consideration in design of a suitable cultivation strategy, because it not only affects cell growth, but also influences gene expression and, consequently, the pool of proteins accumulated in the cells. Both defined and complex media have been employed for PGA production, but no reported studies have addressed the influence of medium composition on the performance of processes used for PGA recovery from cell lysates. In addition, the composition of the medium, as well as the induction strategy (especially the inducer selected), play important roles in the post-induction cell response. So far, the majority of published works have focused on the use of isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) as the inducer (CHENG et al., 2007; LIN; HSIAO; CHOU, 2002; LIU;

CHANG; LEE, 1999; WEN et al., 2005). Nonetheless, the fact that IPTG is an expensive and potentially toxic chemical restricts its application as an inducer in the industrial production of recombinant proteins. Lactose, on the other hand, is an inexpensive, natural, environmentally friendly inducer that can be used in expression systems based on the *lac* promoter. Despite these advantages, only one study has so far considered PGA production induced by lactose (DE LEÓN-RODRÍGUEZ et al., 2006).

With the goal of developing an optimized protocol for PGA production, the main objectives of the present study were therefore to: i) assess the influence of induction phase temperature on PGA production; ii) compare auto-induction batch and fed-batch cultivation strategies for PGA production in a bioreactor; and iii) analyze the influence of the culture medium composition and inducers on protein synthesis and purification.

4.2 Materials and Methods

4.2.1 Microorganism

Escherichia coli BL21 (DE3) was donated by the Laboratory of Biochemistry, Department of Physiological Sciences, UFSCar, São Carlos, Brazil. The pT101/D-TOPO plasmid with the *pac* gene responsible for PGA production (ABIAN et al., 2004; MONTES et al., 2007) was kindly provided by the Laboratory of Biocatalysis, ICP-CSIC, Madrid, Spain. The transformation of *Escherichia coli* was performed by heat shock in the presence of CaCl₂.

4.2.2 Culture media

Shake flask cultivations were carried out using LB medium containing tryptone (10 g/L), yeast extract (5 g/L), sodium chloride (10 g/L), and ampicillin (100 µg/mL), at pH 7. For bioreactor cultures, batch B1 was performed using auto-induction medium (adapted from (DA SILVA et al., 2013; STUDIER, 2005)) with pulse supplementation. Fed-batch cultures B2 and B3 were carried out using complex medium (DA SILVA et al., 2013) and defined medium (HORTA et al., 2012), respectively. The compositions of all the media used are provided in Table 4.1. Ampicillin (150 µg/mL), 30% propylene

glycol antifoaming agent (1 mL/L), and a metal solution (DA SILVA et al., 2013) were added to the media used for the bioreactor cultivations.

Table 4.1 - Composition of media used in bioreactor cultivations. Auto-induction medium: Cultivation B1; complex medium: Cultivation B2; defined medium: Cultivation B3.

Nutrient (g/L)	Auto-Induction		Complex Media		Defined Media	
	Batch	Pulse	Batch	Fed-batch	Batch	Fed-batch
Glucose	10.0	---	10.0	---	---	---
Glycerol	60.0	258.3	40.0	800	40.0	800.0
Lactose	20	130.0	---	---	---	---
Tryptone	10.0	10.0	10.0	10.0	---	---
Yeast extract	5.0	5.0	5.0	5.0	---	---
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5	0.5	0.5	40.0	1.6	20.0
KH ₂ PO ₄	3.4	3.4	3.4	3.4	17.7	21.28
(NH ₄) ₂ HPO ₄	---	---	---	---	5.3	6.4
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	9.0	9.0	9.0	9.0	---	---
Citric acid	---	---	---	---	2.27	2.27
NH ₄ Cl	2.7	2.7	2.7	2.7	---	---
Na ₂ SO ₄	0.7	0.7	0.7	0.7	---	---
Thiamine	---	---	---	---	45.0	45.0

4.2.3 Analytical methods

4.2.3.1 Cell concentration

During the bioreactor cultivations, the cell concentration was monitored using measurements of the optical density (OD) of the culture broth ($\lambda = 600$ nm), dry cell weight (gDCW/L) determinations, and viable cell counts (c.f.u./mL), as well as by on-line recording of broth permittivity (pF/cm) using a biomass sensor (HORTA et al.,

2012). In the shake flask experiments, the cell concentration (C_X) was related to the optical density using the expression:

$$C_X \text{ (gDCW/L)} = (0.49 \pm 0.01) * (\text{OD}_{600 \text{ nm}}). \quad (1)$$

4.2.3.2 Plasmid stability and cell viability

Diluted samples of culture broth were spread aseptically onto plates of LB agar, in some cases supplemented with ampicillin, and incubated for 16 h at 37 ° C. Cell viability and plasmid stability were evaluated by counting the final number of colonies formed (JIA et al., 2011).

4.2.3.3 Enzymatic activity and related variables

Samples were centrifuged at 10,000 x g for 5 min at 4 ° C, re-suspended in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5), and disrupted by sonication using 6 pulses of 30 s (8-10 watts) at 20 MHz, with intervals of 20 s. After further centrifugation at 14,000 x g for 20 min at 4° C, the supernatant was collected and used for analyses of enzymatic activity and total soluble protein concentration (BRADFORD, 1976). In addition, SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970) was employed to identify the presence of inactive pre-pro-PA and the α and β PGA subunits in the supernatant and pellet derived from the cell lyses.

NIPAB hydrolysis catalyzed by PGA was followed continuously during 4 min, every 30 seconds by monitoring the absorbance at 405 nm. One unit of enzyme activity was defined as the amount of enzyme that hydrolyzes 1 μ mol of substrate per min under the assay conditions Kutzbach and Rauenbus (1974). The values of PGA activity was estimated from Eq. 2

$$EA \text{ (} U_{NIPAB} / \text{mL)} = \frac{\Delta A \times V_R}{\alpha \times d \times t \times V_S} \quad (2)$$

Where: ΔA : Change of absorption, α : Differential molar absorption (9.09 mL/ μ mol*cm), d: Gap width of cuvette, t: Reaction time, V_R : Reaction volume, V_S : Sample volume.

A calibration curve (Equation (3)) was prepared to further convert PGA activity (in U_{NIPAB}/mL) to the equivalent penicillin G activity (in IU/mL). The enzymatic reaction product (6-APA) was quantified using the colorimetric method described by Balasingham *et al.* (1972).

$$EA_{penG} \text{ (IU/mL)} = (2.2 \pm 0.1) * EA_{NIPAB} \quad (3)$$

The specific enzyme activities were expressed in terms of the total soluble protein content (EA_{sp_Prot}) and the cell mass (EA_{sp_Biom}) using Equations (4) and (5), respectively. The corresponding enzyme concentrations (C_{enz}) and productivities (Pr_{enz}) per volume of cultivation medium were calculated using Equations (6) and (7), respectively. In these expressions, EA (IU/mL) is the enzyme activity obtained from Equation (3), C_{X_sonic} (gDCW/L) is the biomass concentration in the disrupted cell suspension, C_X (gDCW/L) is the biomass concentration in the cultivation broth, and Δt is the elapsed cultivation time.

$$EA_{sp_Prot} \text{ (IU / mg prot)} = \frac{EA}{C_{sol_prot}} \quad (4) \quad C_{enz} \text{ (IU / L)} = EA_{sp_Biom} \cdot C_X \quad (6)$$

$$EA_{sp_Biom} \text{ (IU / gDCW)} = \frac{EA \cdot 1000}{C_{X_sonic}} \quad (5) \quad Pr_{enz} \text{ (IU / L.h)} = \frac{C_{enz}}{\Delta t} \quad (7)$$

4.2.3.4 Concentration of organic acids

The concentrations of organic acids were determined by HPLC, with UV detection at 210 nm. The stationary phase was an Aminex HPX-87H column (maintained at 50 °C) and the mobile phase was 5 mM sulfuric acid, at a flow rate of 0.6 mL/min.

4.2.3.5 Partial purification of recombinant PGA

The protocol developed by Pinotti *et al.* (2009) was followed. The biomass harvested at the end of cultivation in defined or complex media was disrupted in citrate buffer, 20mM, pH 4.8 (adsorption buffer). The desorption process was conducted in a 50 mL Falcon tube containing 20mL enzyme extract and 1mg gel (Streamline SP) balanced with the adsorption buffer. This mixture was left in a rotating chamber at 25° C, at 100 rpm for 150 minutes. After the adsorption was concluded, washing with adsorption buffer was carried out and finally, the respective enzyme elution (desorption) with adsorption buffer containing 150 mM of NaCl (6 mL) was performed. Purification parameters such as η_{act}^{ads} (yield of adsorbed activity), η_{act}^{el} (yield of eluted activity), $\eta^{process}$ (yield of global process) and PF (purification factor) were estimated by Eqs. (8) to (10).

$$\eta_{act}^{ads} = \frac{(Act_{clarif} \times V_{clarif}) - (Act_{ext} \times V_{ext}) - (Act_{washed} \times V_{washed})}{Act_{clarif} \times V_{clarif}} \quad (8)$$

Where Act_{clarif} : Activity of enzymatic solution at zero time (IU/mL), V_{clarif} : Volume of the solution (mL), Act_{ext} : Activity after adsorption (IU/mL), V_{ext} : Volume after adsorption, Act_{washed} : Activity washed buffer (IU/mL).

$$\eta_{act}^{eluted} = \frac{(Act_{eluted} \times V_{eluted})}{(Act_{clarif} \times V_{clarif}) - (Act_{ext} \times V_{ext}) - (Act_{washed} \times V_{washed})} \quad (9)$$

Where Act_{eluted} : Activity of the buffer after elution (IU/mL), V_{eluted} : Volume of the elution buffer (mL)

$$PF = \frac{(Act_{eluted} \times V_{eluted})}{(Act_{clarif} \times V_{clarif})} \quad (10)$$

4.2.4 Experimental procedure

Preliminary shake flask cultures were conducted to assess the influence of induction phase temperature on enzyme production. Five conditions were investigated (in triplicate), with temperatures ranging from 18 to 28° C. Batch (B1) and fed-batch (B2 and B3) bioreactor cultures were carried out using the selected induction temperature and different induction strategies.

4.2.4.1 Shake flask cultures

The shake flask cultivations were carried out for ~30 h using 1 L flasks containing 100 mL of LB medium, incubated at 37° C with agitation at 250 rpm during the initial growth phase. Once the OD₆₀₀ of the culture reached 1.5, the flasks were transferred to another incubator kept at the desired temperature (18, 20, 22, 24 or 28° C), and induction was performed by adding a pulse of 0.25 mM IPTG.

4.2.4.2 Bioreactor cultures

A 300 mL aliquot of exponentially-growing cell suspension (OD₆₀₀ ~2.0) was transferred to a 5 L laboratory bioreactor containing 3.5 L of the complex or defined auto-induction media described in Table 4.1. All cultivations were monitored using SuperSys_HCDC^R (HORTA et al., 2012). The temperature was maintained at 37 ° C during the growth phase, and reduced to 20 °C prior to induction. The pH was maintained at 6.9 by addition of NH₄OH. The dissolved oxygen concentration was controlled at 30% of saturation by automatically adjusting both the agitation speed (in the range 200-600 rpm) and the composition of the gas stream supplied to the bioreactor (by mixing pure oxygen with air). The total inlet gas flow rate was maintained at 5 L/min using two mass flow controllers. The broth permittivity was monitored using a biomass sensor (Fogale Nanotech), as described by Horta *et al.* (2012).

For the fed-batch cultures (B2 and B3), the exponential feed flow was initiated once the carbon sources in the batch medium had been exhausted. The feed flow rates of the complex (culture B2) or defined (culture B3) media were calculated using Equation (12), which assumes that the growth rate is only dependent on the limiting substrate (NIELSEN et al., 2003), and were automatically controlled by the supervisory system (HORTA et al., 2012).

$$F = \left(\frac{\mu}{Y_{X/S}} + m \right) \cdot \frac{C_{x0} - V_o}{C_{SF} - C_{SR}} \cdot e^{\left(\mu_{set} - t \right)} \quad (12)$$

In Equation (7), F (L/h) is the feed flow rate, μ (h^{-1}) is the actual specific growth rate, μ_{SET} (h^{-1}) is the desired specific growth rate, $Y_{X/S}$ ($\text{gDCW/g}_{\text{substrate}}$) is the biomass yield coefficient, m (h^{-1}) is the maintenance coefficient, C_{X0} (gDCW/L) and V_0 (L) correspond to the cell concentration and volume, respectively, at the beginning of the fed-batch phase, C_{SF} ($\text{g}_{\text{substrate/L}}$) is the glycerol concentration in the supplementary medium (Table 4.3), C_{SR} ($\text{g}_{\text{substrate/L}}$) is the expected residual concentration of glycerol in the reactor, and t (h) is the elapsed feeding time. The parameters $Y_{X/S}$ and m were estimated from the previous batch data, and are included in Table 4.2. Analogously, C_{SR} was set to 5 g/L, based on information obtained in earlier experiments (Da Silva et al., 2013).

The exponential feeding profile was regulated using SuperSys_HCDC^R, which automatically re-tuned the parameter μ_{set} every 10 min, using the values of μ inferred from on-line permittivity measurements provided by the capacitance biomass sensor (HORTA et al., 2012).

In batch culture B1, additional glycerol and lactose were supplied as a pulse (Table 4.1) when the OD_{600} value reached ~ 70 , in order to provide enough inducer and carbon source for the prolonged induction phase, which lasted 24 h. In fed-batch cultivations B2 and B3, the induction phase was started when the OD_{600} reached ~ 100 , and also lasted 24 h. For experiment B3 (defined medium), the induction was performed by adding an IPTG pulse (1 mM final concentration). For experiment B2 (complex medium), induction was carried out by adding multiple pulses of 400 mL of lactose solution (200 g/L). In all bioreactor cultures, ampicillin pulses were applied every 6 h after induction to maintain selective pressure on the cells.

Table 4.2 - Parameter values used for setting up the feeding flow rate (Eq. 8) for fed-batch bioreactor cultures B2 (complex medium) and B3 (defined medium)

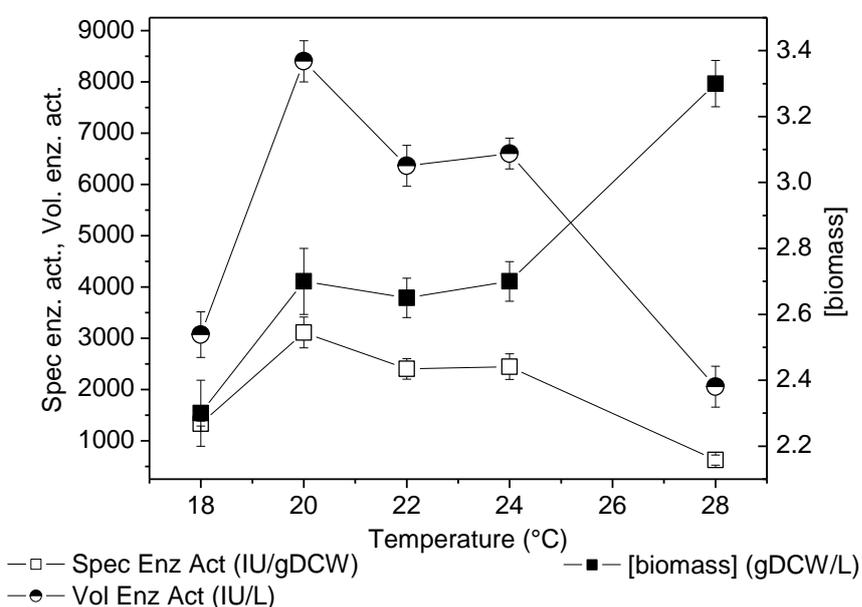
Parameter	B2	B3
m (h^{-1})	0.001	0.05
$Y_{X/S}$ ($\text{gDCW/g}_{\text{substrate}}$)	0.717	0.485

4.3 Results

4.3.1 Influence of temperature on PGA production

As already stated above, temperature plays an important role in PGA synthesis by *E. coli* cells, and values of between 22 and 37 °C have been reported for the induction phase (Dai et al., 2001). Here, induction temperatures ranging from 18 to 28 °C were tested in the shake flask cultures. Figure 4.1 shows the specific enzyme activities and PGA concentrations after 24 h of induction at different temperatures. The specific enzyme activity was ~3000 IU/gDCW at 20 °C, ~2500 IU/gDCW at 22 and 24 °C, and decreased to less than 1000 IU/gDCW at 28 °C. As expected, the final biomass concentration increased at higher temperatures, ranging from 2.3 (at 18 °C) to 3.3 gDCW/L (at 28 °C).

Fig. 4.1 - Effect of induction temperature upon specific activity (Eq. 5) and concentration (Eq. 6) of PGA produced by *rE. coli* grown in shake flasks containing LB medium after 24 h of induction. All experiments induced with IPTG 0.25 mM, $T_{\text{growth}}=37^{\circ}\text{C}$, $\text{DO}_{\text{induction}}=1.5$.



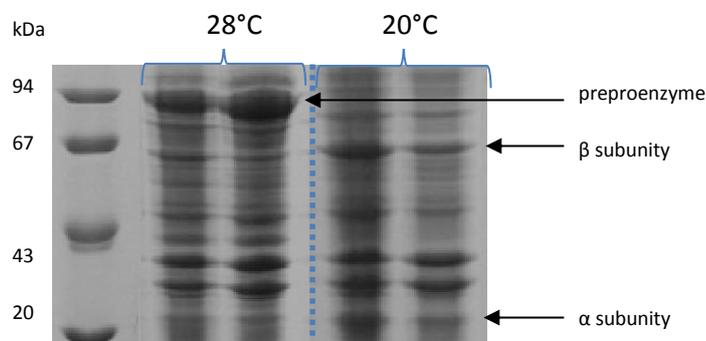
Despite the reduced biomass formation observed at lower temperatures, the enzyme concentration per volume of culture medium was significantly improved at 20° C. The enzyme production achieved at this temperature was 2 to 3-fold superior to values reported in the literature (DE LEÓN-RODRÍGUEZ et al., 2006; LIN et al., 2002;

SOBOTKOVÁ et al., 1996), probably due to the temperature employed during the induction phase in the earlier studies, which ranged from 28 to 30 °C. Plasmid stability was also favored at 20° C, with values of 70-80% obtained after 24 h of induction. When a temperature of 24° C was used, plasmid retention decreased to 53% at the end of the induction period.

These results identified 20° C as the best temperature for PGA production by *rE. coli*. This value is lower than the optimum temperature (22° C) identified by Dai *et al.* (2001) for PGA production with IPTG as inducer, probably because 22° C was the lowest temperature tested.

Further evidence of the strong influence of temperature on PGA synthesis was obtained from the SDS-PAGE analyses of disrupted cells after 12 h of induction at 28 and 20 ° C (Figure 4.2). An intense band corresponding to pre-pro-enzyme (~90 kDa) was found for the cells induced at 28° C, for both soluble and insoluble fractions (lanes 2 and 3). The formation of large amounts of pre-secretory product could be due to overloading of the transportation machinery of the cell. As a result, untranslocated pre-pro-enzyme may have accumulated and formed aggregates of an inactive form of the enzyme (WEN et al., 2005). On the other hand, when the induction took place at 20° C, subunits α and β were observed (lanes 4 and 5), but the pre-pro-enzyme was not present.

Fig. 4.2 SDS-PAGE of cell lysates for *rE. coli* grown in shake flasks containing LB medium after 24 hours of induction. Experiments induced with IPTG 0.25 mM. (1) Protein standards; (2) Insoluble proteins (28° C); (3) Soluble proteins (28° C) (4) Insoluble proteins (20° C); (5) Soluble proteins (20° C).



4.3.2 Growth and protein production in batch culture using the auto-induction strategy

Before instigating an induction strategy for high cell density cultures (HCDC) based on a low induction temperature, a batch experiment was carried out to validate the shake flask results. In the present study, the alternative auto-induction protocol was used to perform bioreactor batch experiment B1. Despite being frequently used for protein production using T7-based *E. coli* expression systems in shake flask cultures (DA SILVA et al., 2012; STUDIER, 2005), only a few investigations have considered bioreactor cultures based on auto-induction complex medium formulations (JIA et al., 2011; DA SILVA et al., 2013).

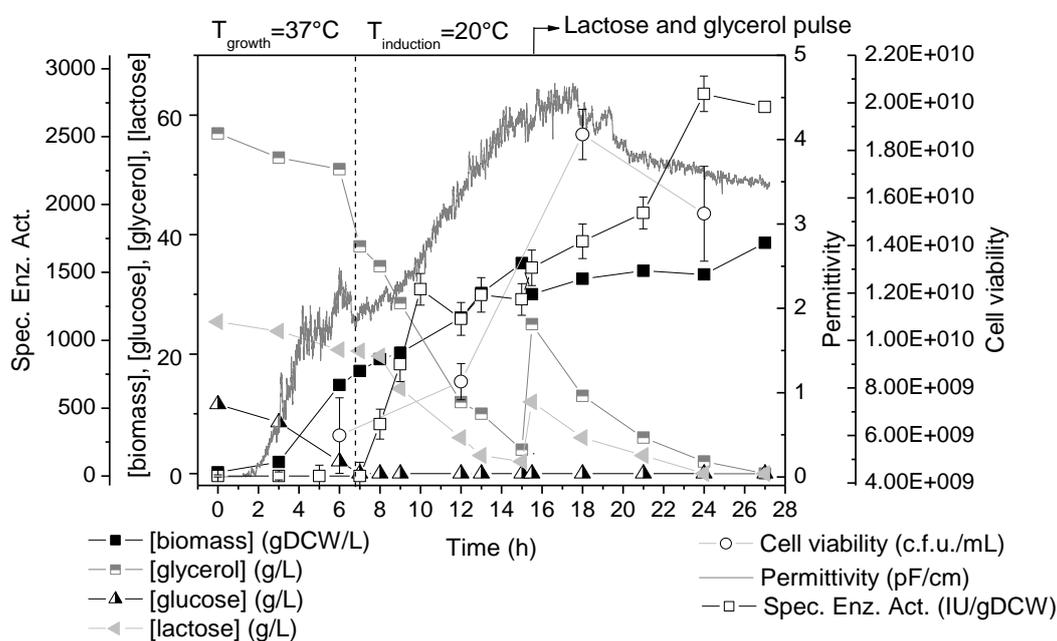
Figure 4.3 shows the main results obtained for the auto-induction batch culture. Intense biomass formation was observed in the first 6 h of culture ($\mu_{\max} = 0.73 \text{ h}^{-1}$), assisted by the high growth temperature (37° C) and fueled by the consumption of glucose and proteins/amino acids from the yeast extract and tryptone (components of the complex medium). Glucose is a strong repressor of the *lac* operon (STUDIER, 2005), and its exhaustion (at ~6.5 h) signaled the beginning ($t_{\text{induction}} = 0 \text{ h}$) of heterologous protein synthesis induced by the lactose present in the medium. Shortly after glucose depletion, the temperature was reduced to 20° C to reproduce the induction strategy selected from the shake flask results. The PGA specific activity data (Figure 4.3) were indicative of fast enzyme accumulation in the cells, reaching 2800 IU/gDCW after 17.5 h of induction. This value was similar to the maximum specific activity

observed in the flask experiments (Figure 4.1) carried out at the same temperature (20° C).

The biomass concentration increased continuously up to 36 gDCW/L, with a moderate growth rate ($\mu = 0.09 \text{ h}^{-1}$) after the temperature decrease (between 7 and 15 h), and a slow growth rate ($\mu = 0.02 \text{ h}^{-1}$) during the last 12 h of induction due to intensification of the metabolic burden related to protein expression. The permittivity signal (Figure 4.3) closely followed the biomass formation profile up to ~16 h of culture. The capacitance sensor measures the dielectric permittivity produced by a polarized cell membrane when it is subjected to low radio frequencies. Since this only occurs for viable cells (MATANGUIHAN et al., 1994), the shift in the permittivity curve reflected a decrease in the viable cell concentration due to the stress associated with protein production, as also shown by the c.f.u. counts. The measured loss of viability was also influenced by the decrease in the proportion of cells retaining the plasmid, which changed from 90% (at 5.5-11.5 h of induction) to 85% (at 17.5 h of induction).

The scale-up auto-induction medium composition proved to be effective. The high initial glucose concentration prevented early protein expression, but did not cause formation of high levels of inhibitory metabolites: the concentrations of acetic, formic, and lactic acids remained below 2 g/L throughout the cultivation. The low formation of organic acids was assisted by the choice of glycerol as the main carbon source. Together with lactose, glycerol was steadily consumed after glucose depletion, and was used by the cells to support growth and protein production during the entire induction phase. At 15.5 h of cultivation, an additional pulse of a solution containing lactose and glycerol was added in order to avoid limitation of protein synthesis due to a lack of either carbon source or inducer. Use of this simple cultivation strategy yielded a bulk PGA concentration exceeding 93775 IU/L within 17.5 h of induction, corresponding to a productivity of 3907 IU/L.h (or 5358 IU/L.h, considering the elapsed induction period).

Fig. 4.3 - Growth, carbon sources consumption and PGA production by recombinant *E. coli* in batch culture B1 with auto-induction medium. $T_{\text{growth}}=37^{\circ}\text{C}$ and $T_{\text{induction}}=20^{\circ}\text{C}$. Pulse of glycerol and lactose added after 15.5 h of culture.



4.3.3 Growth and protein production for scaled-up high cell density cultures

The lactose-based induction strategy was further scaled up as a high cell density culture (HCDC) using complex medium (culture B2). For comparison, a HCDC using defined medium and IPTG as inducer (culture B3) was also carried out. The feeding media for both fed-batch cultures contained exclusively glycerol as carbon source (Table 4.1), and were supplied following an exponential profile (Equation 12) based on the actual growth rates, as described previously (section 4.3.2). Induction was triggered by pulses of lactose (B2) or IPTG (B3), shortly after the temperature had been reduced to 20°C.

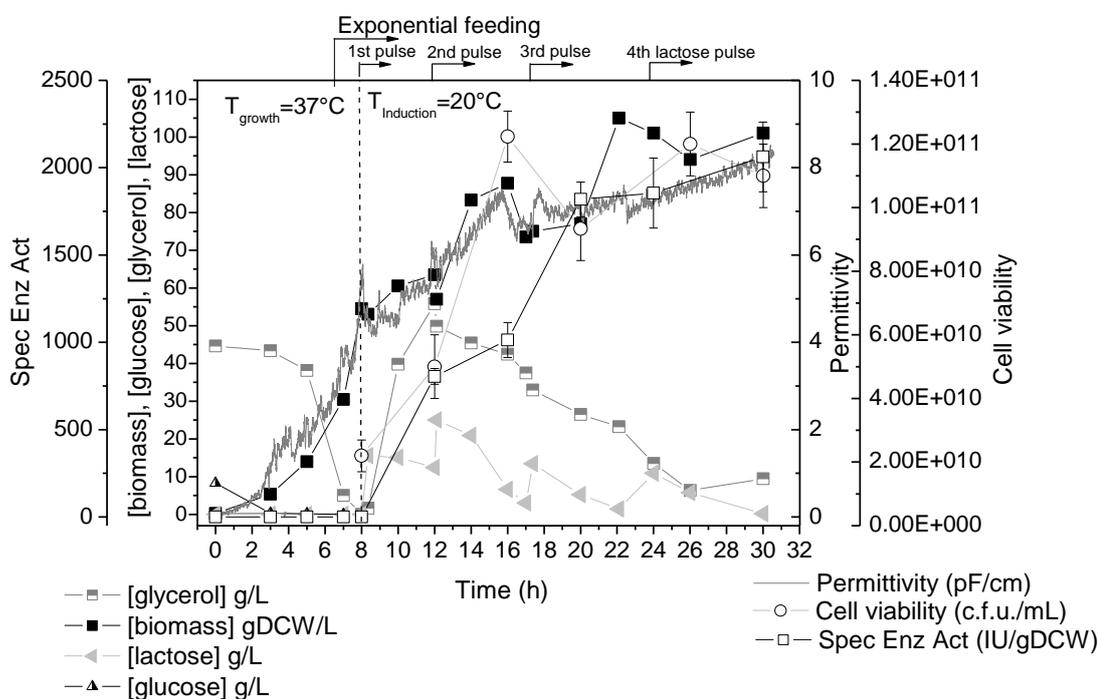
The results obtained for the complex medium fed-batch culture (B2) are shown in Figure 4.4. Due to the low solubility of lactose and the increasing biomass concentration, the inducer was supplied in the form of multiple 400 mL pulses of solutions containing 200 g/L lactose, which were added after every 20 gDCW/L (~40 OD_{600nm} units) increase in the cell concentration. This strategy was based on the results obtained in the previous auto-induction culture (B1), relating biomass formation to lactose uptake (Figure 4.3). The optical density data acquired during cultivation B2

showed that, despite continuous consumption of lactose, it was possible to maintain a residual inducer concentration capable of promoting *pac* gene expression throughout the induction phase.

The cultivation strategy adopted was effective for both biomass formation and enzyme production. The initial growth phase was carried out at 37° C, lasted 7.3 h, and led to a biomass formation of 33 gDCW/L ($\mu_{\max} = 0.68 \text{ h}^{-1}$). The fed-batch phase was then started, and supported continuous cell accumulation up to 105 gDCW/L during the next 14.8 h ($\mu = 0.07 \text{ h}^{-1}$), with high viability, as confirmed by the permittivity data and the c.f.u counts. Enzyme production started after the first pulse addition (at 8 h of culture), at a biomass concentration of 54 gDCW/L, and the specific enzyme activity rapidly increased to 1800 IU/gDCW within the first 12 h of induction, with complete consumption of the lactose supplied. During the last 10 h of induction, the enzyme synthesis rate slowed, and the specific enzyme activity reached a final value of 2061 IU/gDCW. This shift in the enzyme production profile was mainly due to intensified stress associated with protein synthesis, which caused a reduction in plasmid retention from 97% (at 4-8 h of induction) to 89% (at 12 h of induction). Once again, the formation of inhibitory metabolites was negligible (2.1 g/L acetate), despite glycerol accumulation during the first 4 h of feeding. It is also important to clarify that the fluctuations in cell concentration and viability were caused by the withdrawal of large volumes of culture medium (~400 mL) prior to the addition of the lactose pulses, in order to ensure that the reactor volume remained within the operational range.

In summary, the lactose-based complex medium fed-batch strategy yielded a PGA concentration equivalent to 208222 IU/L within 24 h of induction, which corresponded to a productivity of 6941 IU/L.h (or 9465 IU/L.h, considering the elapsed induction period). These values are about twice those observed for the B1 auto-induction culture, because the biomass formation phase was extended in the fed-batch operation mode and occurred simultaneously with intense protein production during the first 15 h of induction, due to the low induction temperature employed.

Fig. 4.4 - Growth, carbon sources consumption and PGA production by recombinant *E. coli* using fed-batch culture B2 with complex medium. $T_{\text{growth}}=37^{\circ}\text{C}$ and $T_{\text{induction}}=20^{\circ}\text{C}$. Lactose pulses added at 8, 12, 17 and 24 h. Feeding started at 7.3 h.



The influence of inducer and medium composition on PGA production and purification was assessed using fed-batch cultivation B3 with defined medium and IPTG as inducer. The main results are presented in Figure 4.5. Glycerol was the only carbon source during the initial batch and fed-batch phases. The feed supply was initiated 10.1 h after the beginning of the culture, as soon as the glycerol from the batch culture was exhausted, yielding a biomass concentration of 18 gDCW/L and a maximum specific growth rate of 0.45 h^{-1} . The temperature was then reduced from 37 to 20°C , and a pulse of IPTG was applied at 13 h (at a biomass concentration of 54 gDCW/L) to initiate the induction phase. Despite the temperature reduction, the cells continued to grow at a moderate rate (0.1 h^{-1}), reaching 82 gDCW/L within 4 h of induction.

The B2 and B3 fed-batch cultures followed very similar strategies and showed equivalent performance up to the moment of induction. Obviously, due to the inherently lower biomass yield coefficient for the defined medium ($Y_{X/S}$ values of 0.44 and 0.55 g/g were obtained for the defined and complex media, respectively), in the case of

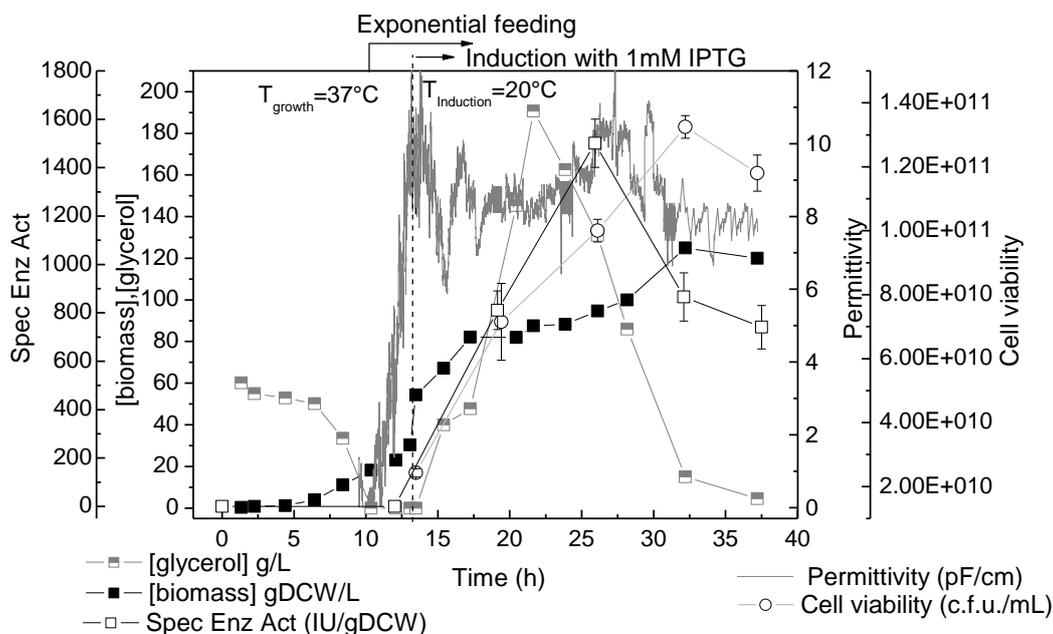
culture B3 a longer growth phase (13 h) was required before the desired biomass concentration was attained (~54 g/L) and the induction phase could be initiated. However, throughout the induction phase, the B3 culture showed performance that was inferior in several respects. Approximately 1 h after the temperature had reached 20° C and the IPTG pulse had been added, the permittivity signal shifted to a decreasing profile, indicating a loss of cell viability, which was later confirmed by the profile of the c.f.u./mL curve. This early decline in viability was probably caused by the salt precipitation observed after reducing the temperature to 20° C, due to the low aqueous solubility of several of the defined medium components, especially KH_2PO_4 (Table 4.1).

Subsequently, glycerol started to accumulate in the broth, suggesting that growth was limited by a nutrient other than the carbon source. The accumulation of glycerol at concentrations of up to approximately 70 g/L was tolerated by the cells, but inhibition occurred when this value was exceeded, causing stagnation of growth at between 16 and 25 h of cultivation. After feeding was interrupted, the cells started to consume the excess glycerol (and salts) accumulated in the medium, and cell growth was restored at the end of induction phase, leading to a final biomass concentration of 120 gDCW/L. It is also noteworthy that, once again, despite the high concentration of glycerol accumulated in the medium, the concentration of the organic acids that are commonly present did not exceed 2.5 g/L. This is the main advantage of using glycerol as carbon source for HCDC. In contrast to glucose, its uptake by the cells does not trigger overflow metabolism and, as long as adequate aeration conditions are provided, there is no risk of inhibition of growth or protein synthesis due to metabolite formation (KORZ et al., 1995).

The factors described above also affected protein production. The specific enzyme activity increased to a maximum of 1500 IU/gDCW after 12 h of induction, and subsequently decreased continuously. This activity level was significantly lower than the maximum values observed for experiments B1 and B2 (Figures 4.3 and 4.4), as well as for the shake flask cultures performed using the same induction temperature (Figure 4.1). The gradual decline in the enzyme yield also showed a relationship with plasmid stability, which diminished from 87% (after 5 h of induction) to 75% (after 13 h of induction) and 65% (after 19 h of induction, at the end of the cultivation). Plasmid retention during this experiment was inferior compared to the B1 and B2 cultures

carried out with complex medium, which showed retentions of >80% after 18 h of induction. It is known that plasmid stability is generally favored in amino acid-enriched media (RAMIREZ; BENTLEY, 1993). Nevertheless, mainly due to the high final biomass concentration achieved, fed-batch cultivation B3 yielded a PGA concentration equivalent to 89000 IU/L within 24 h of induction, corresponding to a productivity of 2393 IU/L.h (or 3680 IU/L.h, considering the elapsed induction period). On the other hand, care must be taken before choosing the conventional HDF medium (KORZ et al., 1995) for heterologous protein production when the synthesis is favored by low temperature.

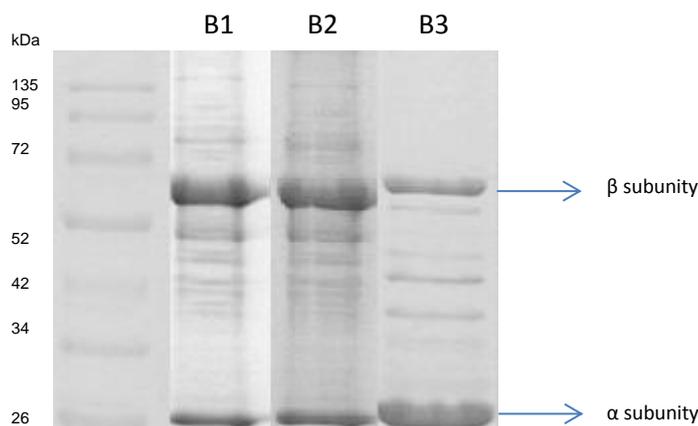
Fig. 4.5 - Growth, glycerol consumption and PGA production by recombinant *E. coli* in fed-batch culture B3 with defined medium. $T_{\text{growth}}=37^{\circ}\text{C}$ and $T_{\text{induction}}=20^{\circ}\text{C}$. Induction by IPTG pulse at $t=13\text{ h}$. Feeding started at 10.1 h.



The electrophoresis results for the three bioreactor cultures (Figure 4.6) supported the above findings. Denser bands corresponding to subunits α (23 kDa) and β (60 kDa) of recombinant PGA were obtained for the enzyme extracts produced from cells cultivated in complex medium (cultures B1 and B2), while the bands obtained for the extract from cells cultivated in defined medium (culture B3) were clearly weaker. In addition, the gel results also showed that contaminant proteins were present at low concentrations in the enzyme extracts, regardless of either the cultivation strategy or the inducer used. This

was due to the low temperature employed during the induction phase (20° C), which helped to reduce the production of endogenous proteins by *E. coli*.

Fig. 4.6 - SDS-PAGE of clarified fraction obtained after lysis of recombinant *E. coli* cells cultivated in different media after 24 h of induction. B1: auto-induction; B2: Fed-batch with complex medium and B3: Fed-batch with defined medium. All samples contained 1 mg/mL of protein.



4.3.4 Partial purification of recombinant PGA from complex and defined media cultivations

Besides identification of the most suitable cultivation strategy for recombinant enzyme production, it is also important to assess the impact of the chosen cultivation protocol on the performance of the purification process. One of the drawbacks often associated with the use of complex medium is possible stimulation of the synthesis of diverse contaminant proteins, which could impair purification of the target protein.

The results obtained for the partial purification of PGA present in crude extracts obtained from cells grown in both types of medium (complex and defined) are shown in Table 4.3. The clarified extract generated from the cells cultivated in complex medium had a higher protein content, and consequently a lower specific enzyme activity. This extract retained ~30% of the PGA activity initially present, due to saturation of the resin. The recovery of PGA could be improved by reducing the loading of enzyme per gram of resin. Consequently, the global yields for the purification process were 72 and 64% for the extracts derived from the complex and defined media, respectively.

The eluted activity yields all exceeded 97%, indicative of similar interactions between the resin and the clarified fractions, irrespective of their source. Furthermore, the salt

concentration in the eluate buffer was satisfactory, and almost all the recombinant PGA was detached, leading to the high recovery observed in this step. Overall, 2.3-fold and 2.8-fold purity increases were obtained for the extracts from the complex and defined media cultivations, respectively.

These results are similar to those obtained by Pinotti *et al.* (2009), using the same protocol and resin for PGA purification. Although higher purification factors have been reported for penicillin acylase (MARCOS *et al.*, 2002), the main objective of this study was not to optimize the methodology, but rather to compare the performance of the purification process when handling cell lysates derived from cells cultivated and induced under different conditions. The results presented here demonstrate that cultivation in complex medium is a better strategy for PGA production, and does not jeopardize the performance of the purification process.

Table 4.3 - Results obtained in the batch adsorption-desorption process of PGA from recombinant *E. coli* in the resin Streamline SP XL at pH 4.8.

Samples	Cells harvested from complex medium			Cells harvested from defined medium		
	Enz. Act. (IU/L)	Prot. Conc. (mg _{prot} /L)	Spec. Act. (IU/mg _{prot})	Enz. Act. (IU/L)	Prot. Conc. (mg _{prot} /L)	Spec. Act. (IU/mg _{prot})
Clarified	500±45	480.8±32.1	1.04±0.70	420±51	305.1±15.6	1.38±0.42
Extract	130±21	213.1±43.4	0.61±0.07	150±32	235.1±43.1	0.64±0.21
Washing	0.2±0.1	3±1	0.3±0.2	0.2±0.1	0.4±0.1	0.1±0.3
Eluate	1200±82	510.6±14.2	2.35±0.03	893±76	231.1±16.2	3.86±0.34
η_{act}^{el} (%)	97±2			99±2		
η_{act}^{ads} (%)	74±6			64±4		
P.F.	2.3±0.3			2.8±0.4		

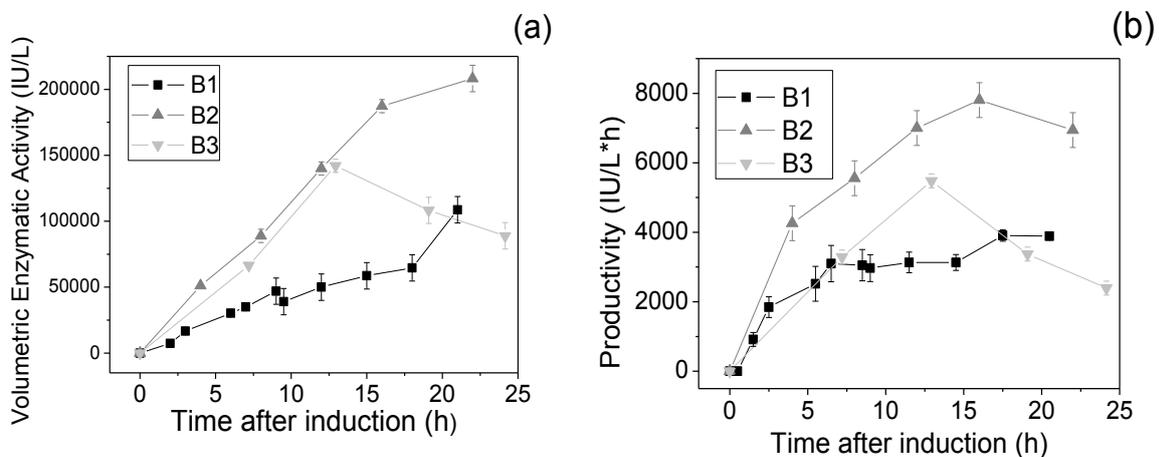
Clarified = enzymatic solution at initial time.; Extract = enzymatic solution after passing through the resin; Washing = buffer used to wash the resin; Eluate = NaCl buffer used to elute the enzyme; η_{act}^{ads} = Yield of adsorbed activity; η_{act}^{el} = Yield of eluted activity; PF = Purification factor.

4.4 Discussion

4.4.1 Comparison of enzyme production using different cultivation strategies

A comparison of all the cultivation strategies, in terms of enzyme production, is provided in Figure 4.7. As already mentioned, the fed-batch strategy with complex medium (experiment B2) provided the best enzyme concentration and productivity (Figures 4.7(a) and 4.7(b)). The auto-induction culture (experiment B1) exhibited a stationary protein productivity profile after 6.5 h of induction (Figure 4.7(b)), because the biomass concentration remained almost constant, while the specific enzyme activity increased linearly with induction time (Figure 4.3). Conversely, for the fed-batch cultivation (B2), both biomass concentration and specific PGA activity increased during the first 16 h of induction (Figure 4.4), resulting in a steeper increase in productivity (Figure 4.7(b)). Despite the low induction temperature used, Figure 4.7(b) shows that 16 - 18 h of lactose induction was sufficient to achieve high enzyme productivity for both auto-induction (B1) and fed-batch (B2) strategies. Figure 4.7(a) shows that the initial rate of enzyme accumulation was similar for HCD cultures B2 and B3 during the first 13 h of induction, due to the increasing biomass concentration and specific enzyme activity (Figures 4.4 and 4.5, respectively). The shift in the enzyme concentration observed in culture B3 after ~13 h of induction (Figure 4.7(a)) was caused by the decay in specific enzyme activity, as shown in Figure 4.5. A similar trend can be seen in the productivity curve obtained for culture B3 (Figure 4.7(b)).

Fig. 4.7 - Induction phase time profiles for (a) enzyme concentration (IU/L) estimated from Eq. 5 and (b) PGA productivity (IU/Lh) estimated from Eq. 6.



In summary, the best specific enzymatic activity was observed for auto-induction culture B1 (Figure 4.3), while the best enzyme concentration and productivity were achieved for the fed-batch culture with complex medium (B2) (Figures 4.7(a) and 4.7(b)). The restricted maximum specific activity of 2000 IU/gDCW for culture B2 was probably related to the difficulty of maintaining the temperature at the desired value during the induction phase, due to the presence of a highly concentrated suspension of growing cells. Using the auto-induction strategy, both enzyme productivity and concentration can be limited by the accumulation of biomass that may occur in this operational mode. Nevertheless, it remains a very attractive approach, because an enzyme extract with high PGA activity (130 IU per mL of centrifuged cell lysate) can be obtained in just 15 h of simple batch culture, even without an additional pulse of lactose.

4.4.2 Comparison of PGA expression for different clones of recombinant E. coli

The most recent and relevant results reported for PGA expression using different clones of *E. coli* and different induction strategies are presented in Table 4.4. Due to the high cell concentration reached, the volumetric activity (enzyme concentration) and productivity obtained in this work were superior to all the values reported in the literature to date. The specific PGA activity was similar to (HCDC) or higher than (auto-induction) the best published values (LIN; HSIAO; CHOU, 2002; SOBOTKOVÁ et al., 1996). These results demonstrate the importance of identifying cultivation conditions that can contribute to the twin goals of increased biomass formation and enhanced gene expression. In the present study, the use of a low induction temperature allied to a fed-batch cultivation strategy using complex medium was crucial for achievement of a superior enzyme titer and maximization of productivity.

Table 4.4 - PGA production in various *E. coli* expression systems for bioreactor cultures carried out under different induction strategies

<i>E. coli</i> strain/ construction	Ind.	Op. mode	T _{ind} (° C)	[Bio mass] (gDC W/L)	EA _{sp} (IU/DC W)	Vol. Enz.Act. (IU/mL)	Product. (IU/mL* h)	Ref.
RE3/ pKA18	Phenylacetic acid	Batch	28	5	1000	4.5	0.28*	(SOBOTK OVÁ et al., 1996)
MDDP7/ pTrcKnPAC2 902	IPTG	Fed- batch	28	34	2444*	83.3*	1.11*	(LIN; HSIAO; CHOU, 2002)
W3110/ pPA102	Cheese whey	Batch	29	1.5	781	0.901	0.053*	(DE LEÓN- RODRÍGU EZ et al., 2006)
9633/pGL-5	IPTG	Fed- batch	30	96.9*	157*	15	0.63*	(LIU; CHANG; LEE, 1999)
BL21(DE3)/p ET28b	IPTG	Batch	28	12	800	10	0.42*	(WEN et al., 2005)
DH5α/ Psm1fpga	IPTG	Batch	30	21.7*	153 mg/gDC W	79.88	0.67*	(CHENG et al., 2007)
DH5α/ pET30b	Constitutive	Batch	28.5	4.5	NA	43	2.58*	(KARTHI KEYAN et al., 2011)
BL21(DE3)/ pT101/D- TOPO	Lactose	Fed- batch	20	100	2000	190	7.8	This work
BL21(DE3)/ pT101/D- TOPO	Lactose	Batch (Auto- induction)	20	38	2800	94	3.9	This work

*Estimated from reported data, NR: Not reported, Ind: Inductor, Op. mode: operation mode, EA_{sp}: specific enzymatic activity, vol.enz.act.: Volumetric enzymatic activity, Product: productivity, Ref: Reference.

The results obtained indicate that the innovative high cell density strategy used in this work, combining exponential glycerol feeding, an intermittent lactose supply, and a low

induction temperature (20° C), is a promising technique for on-demand penicillin G acylase production by recombinant *E. coli* cells.

Acknowledgments

The authors would like to thank the São Paulo State Research Foundation (FAPESP) (process 2009/00127-12), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq/Brazil) and the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES) for funding this work, and Prof. Dr. Laura Pinotti and Amadeus Gomes de Azevedo for technical support.

5. CLONAGEM DE PGA EM *BACILLUS MEGATERIUM*

Optimal host-plasmid interaction in *Bacillus megaterium* strains producing recombinant penicillin G acylase.

A. M. VÉLEZ¹, L. S. GOTO¹, E.C.C. MATEO¹, L. ALTARUGIO¹, R. BIENDENDIECK², R. L. C. GIORDANO¹

¹ Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil.

²Institute of Microbiology, Technische Universität Braunschweig, Braunschweig, Germany.

Corresponding author: velez.ana@gmail.com

Abstract

Penicillin G acilase (PGA) is a key enzyme in the industrial production of β -lactamic antibiotics. The PGA produced in *Bacillus megaterium* is secreted to the extracellular medium, what represents a great advantage in industrial processing. In this work, the coding portion of *pac* gene, encoding for PGA from *Bacillus megaterium* ATCC14945 was cloned into pLipAhp expression plasmid. This construct (pga-pLipAhp) was used in the transformation of three different *B. megaterium* strain protoplasts, aiming studies to determine the best expresssion host in terms of PGA production. Strains used were *Bacillus megaterium* ATCC14945 (wild type homologous host), QM B1551 and PV361. Additionally, pga-pLipAhp plasmid stability in the absence of selective antibiotics was assayed. PV361, QM B1551 and ATCC 14945 have respectively shown about 95%, 95% and 10% plasmidial stability, after eight consecutive growths. PGA production has shown PV361 as the best production host (1897 ± 68 U_{nipab}/L), followed by QM B1551 (88 ± 9 U_{nipab}/L) and *B. megaterium* ATCC14945 (2 ± 1 U_{nipab}/L). Comparison of whole protease levels also indicated that strain PV361 should be the best protein expression host, with the lowest (48 ± 2 U/L) protease content among the three strains. QM B1551 was the second best in this respect (100 ± 4 U/L) and *B. megaterium* ATCC14945 the least attractive (4500 ± 100 U/L). These results indicate that PV361 should be the best overall host for production of PGA. The enzyme obtained in this expression system was submitted to batch purification by ion exchange chromatography (Q-sepharose) which enriched specific activity up to 5.76 U_{nipab}/mL. Thermal and pH stability with the purified enzyme showed that PGA has a half-life of 5 min at 60° C, 20 min at 50° C, resisting 1h at pH 10.0 and up to 8h at pH

5.0. Optimal enzyme stability is at pH 7.5. The maximum enzyme activity ($K_m=8.8 \mu\text{M}$) was found at 37° C, pH 8.0.

5.1 Introduction

Penicillin G acylase is an important industrial enzyme encoded by the *pac* gene. It has become the focus of attention of many researchers from a view of application or theoretical exploration. (WANG et al., 2006). In industry, PGA is used for the production of new β -lactam antibiotics. It hydrolyzes penicillin G yielding phenyl acetate and 6-aminopenicilanic acid (6-APA). The 6-aminopenicilanic acid, 6-APA, is an intermediary product in the production of semi-synthetic penicillin, such as amoxicillin and ampicillin (SOUZA et al., 2005).

Penicillin G acylase can be produced by different microorganisms, but comparative studies are rare between them. PGA from *Escherichia coli* has been studied the most (CHENG et al., 2007). *E. coli* PGA is predominantly exported to the periplasm (LIN; KUO; CHOU, 2001), while *B. megaterium* secretes PGA directly into the growth medium (VARY, 1991). Secreted enzyme should facilitate its purification and consequently decrease the downstream processing and final production costs (YANG et al., 2006). PGA from *B. megaterium* is industrially used for the outlined reverse synthesis reaction due to its higher synthesis rate compared to PGA of *E. coli* (FORNEY; WONG, 1989; FOSTER; POPHAM, 2002)

B. megaterium has also been used to produce L-glutamate, pyruvate, cobalamin, and to modify steroids and antibiotics (VARY, 1991). As for heterologous protein expression system, *B. megaterium* has been reported as a host for carboxymethylcellulose and dextran-sacharase industrial production (MALTEN et al., 2005). Molecular cloning and heterologous expression of *A. faecalis pac* gene in *B. subtilis* has been reported (ZHANG et al., 2006) and *B. megaterium pac* gene cloning for recombinant homologous expression was done, reaching enzymatic levels up to 1000 $\text{U}_{\text{NIPAB}}/\text{L}$ (YANG et al., 2006). Additionally, *B. megaterium* shows some advantages over *E. coli* as choice of protein expression host like lower production of alkaline proteases and other features like a well described secretion machinery (YANG et al., 2006) and several stable plasmidial replicons (ROSSO; VARY, 2005).

An important industrial production parameter is the segregational and structural stability of the recombinant expression plasmids throughout long-term culture under non-selective conditions (VALEŠOVÁ et al., 2004). The loss of plasmids copy number in daughter cells from cultures upon cell division and the obvious appearance of cells without plasmids is termed the segregational instability of the plasmid (DEVINE et al., 1989; LENSKI; BOUMA, 1987; VALEŠOVÁ et al., 2004).

Furthermore, enzyme characterization is necessary to compare properties with others, produced by other microorganisms or other expression systems. Kinetic analysis and characterization of the factors that influence enzymatic reaction velocity, such as pH, temperature and substrate concentration are good parameters to point differences between different PGA sources. Such characters could also point optimum enzymatic environment, as well as a kinetic model, very important when utilizing the enzyme in industrial process (SOUZA et al., 2005).

The purpose of this work was cloning of the *pac* gene from *B. megaterium* ATCC 14945 for expression viability studies in different *B. megaterium* strains (ATCC 14945, QM B1551 and PV361). For such, plasmid stability of the transformed strains was also studied. PGA expression levels were determined for relative yield comparisons. Enzyme properties such as optimum pH, temperature and kinetics were done after downstream purification steps.

5.2 Material and methods

5.2.1 General material

Bacterial strains used in this work are listed in Table 5.1. General microbial and recombinant DNA techniques were performed as described (SAMBROOK; RUSSELL, 2001). DNA isolation kits were from Qiagen. Restriction enzymes, T4 DNA ligase and *Pfu* DNA polymerase were obtained from Fermentas. Oligonucleotides were purchased from IDT. DNA sequencing was done by dideoxy chain termination method (SANGER F; NICKLEN; COURSON, 1977) in an automated DNA sequencer according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystem). Plasmid pLipAhp, a pSSBm derivative shuttle vector for xylose-inducible secreted expression in *Bacillus* was provided by Stammen *et al.* (2010).

Table 5.1 - Bacterial strains used in the present work.

Strain	Reference/source
<i>E. coli</i> DH5 α Strain for plasmid propagation	Novagen (TARTOF; HOBBS, 1987)
<i>B. megaterium</i> ATCC 14945	André Tosello foundation-Campinas, Brazil (MCCULLOUGH, 1985)
<i>B. megaterium</i> QM B1551	Dr. Patricia Vary (Illinois university, USA) (VARY, 1991)
<i>B. megaterium</i> PV361	Dr. Patricia Vary (VARY, 1991)
<i>B. megaterium</i> YYBm1 transformed with pRBBm49 (encoding SP _{lipA} -PGA)	Dr. Rebekka Biedendieck (Braunschweig University, Germany) (YANG et al., 2006)

5.2.2 Cloning and construction of expression Systems in *B. megaterium*.

ProPGA (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2004) encoding sequence was amplified using oligonucleotides PGApLIPAHP_FW, CCGCGGAGATCTCTGATAAGAATGAAGGGGTCAA and PGApLIPAHP_RV, GCTCAGCCGGCCTTACTCATATTTAATGCGCTAAC. *Bgl*III and *Ngo*MIV restriction sites were respectively adapted to 5' and 3' amplification product (bold face) and an additional Serine codon (underlined) was induced for framing purpose. PCR was performed in a Electron PX2 Thermal Cycler (Thermo Scientific) programmed to execute a 98° C initial 10 min denaturing step, followed by 30 cycles of 98° C for 10 s, 70° C 20 s, 72° C 1.5 min, and a final elongation step of 10 min at 72° C. *ProPGA* was amplified using 400 ng *Bacillus megaterium* genomic DNA and 100 pMol of each oligonucleotide in a 50 μ l reaction containing supplier recommended reagents (Fermentas). The PCR products, as well as expression vector pLipAhp, were digested with *Bgl*III and *Ngo*MIV, purified by 1 % agarose gel electrophoresis, and subsequently used in standard T4 DNA ligase reaction. Reaction product was transformed into *E. coli* DH5 α , by electroporation. Transformants were selected on LB medium supplemented with 100 μ g/mL ampicillin. Cloning was confirmed by PCR, plasmidial restriction analysis and DNA sequencing. Constructed plasmid pga-pLipAhp replaces native PGA prepro transit peptide with SP_{lipA} providing secreted protein production under xylose

induced control. Pga-pLipAhp was transformed into *B. megaterium* strains PV361, QM B1551 and ATCC14945 by protoplast transformation (YANG, 2007). Tetracycline resistant cells were evaluated for PGA expression.

5.2.3 PGA expression

Isolated colonies of each *B. megaterium* strain were separately inoculated in 50 mL LB media *supplemented with 10 µg/mL of* tetracycline and incubated in an orbital shaker at 37° C, 120 rpm for 16 h. After that, 5 mL of each flask content was added to 100 mL of fresh medium and incubated at 37° C, 250 rpm. Expression of the pga gene was induced by addition of xylose 0.5% (w/v) at mid-log growth phases, OD_{600nm} around 0.6. Expression was carried over 5 hours and medium samples were collected every hour. PGA production was estimated by enzymatic activity. SDS-PAGE indicated correct processing of cloned single-chained predicted proPGA to mature dimeric protein. *B. megaterium* YYBm1 pRBBm49 was gently supplied by Dr. Rebekka Biedendieck (Braunschweig University, Germany) (YANG et al., 2006), and was used as a comparative reference.

5.2.4 Determination of plasmid segregational stability without antibiotics.

The loss of the plasmid pga-pLipAhp from each transformant was studied in consecutive 50 mL batch subcultures in plain LB medium. All the cultures were shaken at 37° C, and induced with xylose 0.5% (w/v) at late growth phase. Culture samples were collected 5 h after induction, assayed for PGA activity and plated on plain LB agar. 1 mL of the culture was used as inoculum for the next subculture and the cycle was repeated 10 times. Not transformed cells were used as negative controls. A total of 75 colonies of each strain that grown 16 h after plating were isolated and transferred to new LB medium, with and without tetracycline. The number of tetracycline-sensitive colonies was estimated after another 16 h incubation time at 37° C (DEVINE et al., 1989; VALEŠOVÁ et al., 2004).

5.2.5 Partial purification

PGA was concentrated by ultrafiltration (cutoff of 30 kDa), and dialyzed against 10 mM Tris-HCl pH 7.5. The resulting sample was loaded into a Q-sepharose column (Amersham Pharmacia Biotech) pre-equilibrated with the same buffer. Purified protein was eluted from the ion-exchanger in a 300 mM stepped gradient of NaCl controlled by gravity. Partially purified PGA could be stored at -20° C in Tris-HCl 20 mM pH 7.0, NaCl 150 mM, glycerol 10% (v/v) for later experiments. Aliquots were reserved for SDS-PAGE analysis and protein concentration was determined by the Bradford method (BRADFORD, 1976).

5.2.6 PGA enzymatic characterization

PGA kinetics was studied by initial hydrolysis rate of the substrate 6-nitro-3-phenylacetamide benzoic acid (NIPAB) 0.6 mg/mL in 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, at 25° C (KUTZBACH; RAUENBUS, 1974). Product 6-nitro-3-aminobenzoic acid (NABA) formation was monitored at 405 nm ($\epsilon = 8,98 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in an Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec 2100 pro UV/visible spectrophotometer using 2 mL cuvette of 1 cm light path length, data collection every 30 s along 5 min.

Maximum activity temperature of the enzyme was also studied from 20 to 70° C. 0.6 mg/mL NIPAB in 50 mM phosphate buffer pH 7.5 was incubated at the different temperatures in a Pharmacia Biotech spectrophotometer with thermostatic bath and measuring PGA activity for 5 minutes. Using the different linear initial product formation velocities from each sample temperature, activation energy for the enzyme was estimated.

The effect of pH on enzymatic activity was determined by measuring the relative activity using 0.6 mg/mL NIPAB in 50 mM of different buffers: sodium acetate (pH 5.0), sodium phosphate (pH 6.0–8.0) and sodium carbonate (pH 9.0–10) in a Pharmacia Biotech spectrophotometer with thermostatic bath at 37° C for 5 minutes. The linear initial product formation velocities from each sample pH was estimated for maximum pH determination.

Thermal stability was also studied in 3 different temperatures. 20 μL aliquots of the partially purified enzyme were diluted in 50 mM phosphate buffer pH 8.0 and

incubated at 37°, 60° and 50° C for 80 minutes. The different protein samples were incubated in a thermostatic bath and aliquots were taken along the incubation time, cooled down and measured at 37° C. The relative NABA formation was determined after adding a fixed saturating NIPAB amount of 0.6 mg/mL.

The effect of pH stability on the activity of the enzyme was also studied in a similar way. In brief, aliquots were incubated at 37° C in different 50 mM phosphate buffers ranging from pH 5, 7.5 and 10 along 5 h, and samples were taken along the incubation time. The relative activity was also determined after adding 0.6 mg/mL NIPAB.

5.2.7 Total protease assay

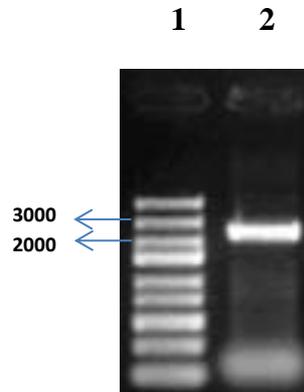
Growth media from each transformant expression culture was diluted 10 fold in 100 mM phosphate pH 6.5 and 150 µL of these samples were individually added to 250 µL of azocasein solution (20 mg/mL azocasein, 360 µM CaCl₂, 5 mM sodium azide, 100 mM phosphate buffer pH 6.5) (ZAMBARE; NILEGAONKAR; KANEKAR, 2011). Protease assay was incubated at 37° C for 1 h and the reaction was stopped by adding 100 µL of 1 M NaOH. Total proteins were precipitated using 1 mL cold of 5% trichloroacetic acid followed by incubation 30 min at 4° C, centrifugation at 13000xg, 5 min for precipitate removal. The absorption of released azodye was measured at 440 nm in a Amersham pharmacia biotech Ultrospec 2100 pro. UV/visible spectrophotometer using 2 mL cuvette of 1 cm light path length, subtracting fresh culture medium absorbance. *B. megaterium* YYBm1 pRBBm49 (YANG et al., 2006) was also used as a comparative reference.

5.3 Results and discussion

5.3.1 Molecular cloning

ProPGA PCR amplification yielded an expected 2.3 kb electrophoresis band (Fig. 5.1), which was cloned into pLipAhp and fully sequenced. The resulting plasmid Pga-pLipAhp was transformed into *B. megaterium* strains by protoplast transformation [3] (VARY et al., 2007).

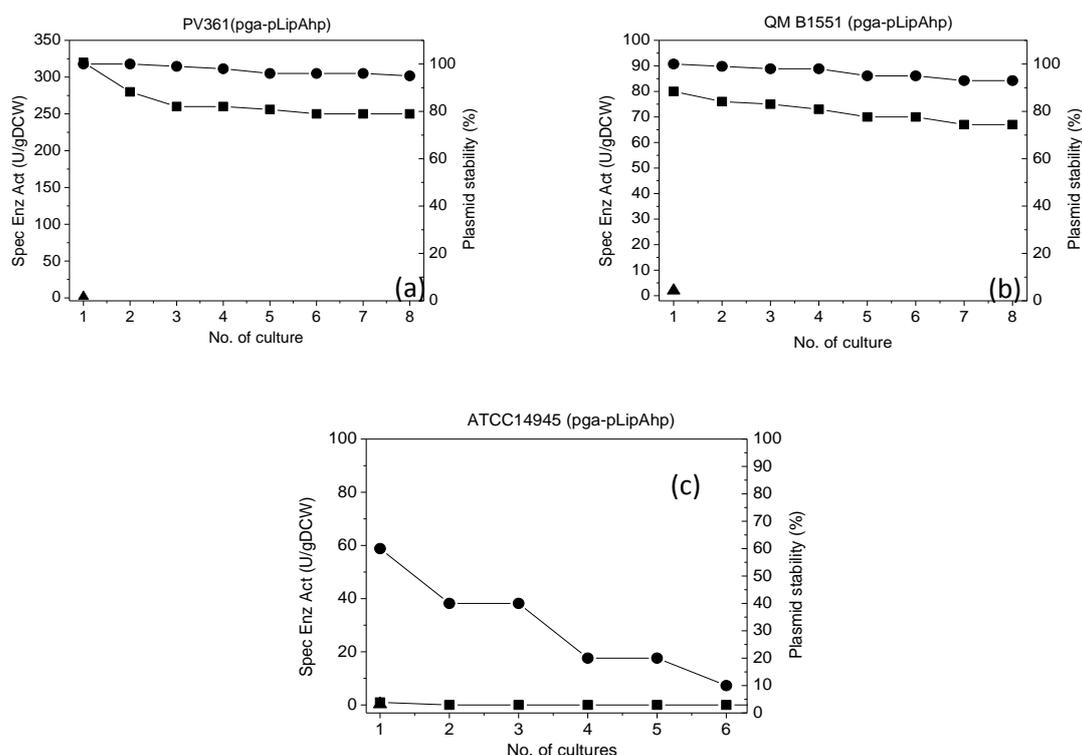
Figure 5.1 - Electrophoresis analysis of ProPGA PCR amplification product. 10 μ L of the PCR product were submitted to electrophoresis on 0.8% agarose TAE. 1- Molecular mass marker; 2 - ProPGA PCR product from *Bacillus megaterium* genomic DNA.



5.3.2 Plasmid segregation stability study

To investigate the influence of different hosts in pga-pLipAhp segregational stability and thus, PGA production stability, strains QM B1551, wild type ATCC 14945 and PV361 were transformed with pga-pLipAhp. The strains were cultured batch-wise under non-selective conditions in consecutive subcultures. The data on the segregational stability of the construction pga-pLipAhp and the production stability of the system for PGA are shown in Fig. 5.2. The strain PV361 exhibits remarkable superior production of PGA and since pga-pLipAhp was stably maintained under fermentation conditions without antibiotics selective pressure, it is assumed to be more stable and productive in this strain.

Figure 5.2 - Segregational stability of the recombinant plasmid pga-pLipAhp and production stability for PGA in successive cultures of different hosts. PGA production levels and loss of plasmid under non-selective medium were assayed in the three *B. megaterium* strains for comparisons. **(a)** *Bacillus megaterium* PV 361; **(b)** QM B1551; **(c)** ATCC14945. PGA production (■) was determined by specific enzymatic activity using NIPAB substrate. Negative control (▲) is the PGA enzymatic activity registered by each strain without expression plasmid. Percentage of plasmid stability (●) is based on the loss of antibiotics resistance along successive bacterial colony plating.



Strain PV361 has been tested as host in the production of HIV antigens for diagnostic kits development (GINSBURGH C, SPAULDING D, ROBEY G, SHIVAKUMAR AMO, VANGAS R, KATZ L, 1989). Also, recombinant expression plasmids that have been successfully used in PV361 include plasmids carrying transposon Tn917 variants (pTV1, pTV32 and pTV53) (WITTCHEN; MEINHARDT, 1995) and plasmid p0Cl carrying the *lux* genes from *Vibrio* (VARY, 1991). Here, the strain PV 361 (pga-pLipAhp) showed the best overall segregational and production stability. After 8 successive cultures PV 361 (pga-pLipAhp) have 95% of plasmid stability and high production of PGA was maintained. Strain QM B1551 (pga-pLipAhp) presented a high plasmid stability as it was previously reported (VARY et al., 2007). The system was very stable, after 8 successive cultures have 95% of plasmid stability,

however the specific enzymatic activity is about 4 fold smaller than that obtained with PV 361 (pga-pLipAhp). In cultures of strain ATCC 14945(pga-pLipAhp), plasmid-less cells were already detected in the first batch culture with just 60% of plasmid stability and decreasing along the successive cultures until 10% of plasmid stability in the sixth culture, and the strain presented a low production of PGA all the way. Considering these data, the strain PV 361 was the best host for the recombinant plasmid pga-pLipAhp obtaining 330 U/gDCW and a high plasmidial stability.

5.3.3 Comparative PGA production levels

Table 5.2 summarizes expression assays from the 3 strains transformed with pga-pLipAhp and the control strain YYBm1-pRBBm49. As shown, the growth rates (μ_{\max}) of all the strains are very similar, Bm ATCC14945 being a little smaller. In our experiments, μ_{\max} found for ATCC14945 (pga-pLipAhp) and PV361 (pga-pLipAhp) were respectively 1.7 and 1.4 fold higher compared to the not transformed parental strains (SUAREZ et al., 2012). Also, YYBm1-pRBBm49 production of PGA around 900 U_{NIPAB}/L was half of the reported by Yang *et al.* (2006).

The relative high secretion levels of proteases found for Bm ATCC14945 (Table 5.2) could be an obvious reason for the disappointing low PGA production. Senthivel and Pai (SENTHIVEL; PAI, 1996) report 3300 U/L of total proteases in the PGA production using *B. megaterium* NCIM 2670, close to what was found for *B. megaterium* ATCC14945 in the present work, and their PGA yield was reported as low as our finding. PV361 produces neutral proteases, like the parent stock, but advantageously has lost the ability to produce an extracellular megacin (VARY, 1991). Total protease levels of PV361 were found very close to YYBm1-pRBBm49 control, which were 100 times lower than ATCC14945. QM B1551 was found to produce intermediary proteases amounts and showed intermediary PGA recovery. PV361 (pga-pLipAhp), was 20 fold more productive than QM B1551 (pga-pLipAhp) in the PGA production and about 4 fold higher than the native PGA expression in *B. megaterium* ATCC14945 induced with phenilacetic acid, reported by Souza (SOUZA, 2007). Zhang *et al.* (2006) report the optimized *Alcaligenes faecalis* PGA recombinant production in *B. subtilis* reaching 1960 U_{nipab}/L, very close to our initial trials assays.

PGA production of PV361 (pga-pLipAhp) compared to control strain YYBm1-PRBBm49, is about 2 times higher and one reason for this could be due to the use of pLipAhp plasmid, which incorporates -35+ rbs+ region modifications done by Stammen *et al.* (2010), compared to PRBBm49 (YANG *et al.*, 2006).

Table 5.2 - *Bacillus megaterium* PGA activity (U_{NIPAB}/L) from different transformed strains. The enzymatic activity of PGA on NIPAB substrate was recorded 5 after induction with 0.5% of xylose. One unit is defined as the amount of enzyme causing an absorbance change of 1.0 cm⁻¹ at 405 nm. For total protease activity was used the azocasein-azodye method. All the cultures were done in LB medium added of 2.5 mM CaCl₂ (YANG *et al.*, 2006) and 10 µg/mL tetracycline at 37 ° C, 250 rpm.

Strain	μ_{max} (h ⁻¹)	Protease activity (U/L)	pga-pLipAhp (U _{NIPAB} /L)	Dry cell weight (gDCW/L)	Specific enzymatic activity (U/gDCW)
Bm ATCC14945 (pga-pLipAhp)	0.467±0.054	4500±100	2±1	2.9±0.1	1.0±0.1
QM B1551 (pga-pLipAhp)	0.564±0.045	100±4	88±9	3.2±0.3	27±3
PV 361 (pga-pLipAhp)	0.587±0.032	48±2	1897±68	4.0±0.5	474±14
YYBm1-PRBBm49 (control)	0.578±0.042	50±4	900±10	3.9±0.4	205±3

5.3.4 PGA purification

The extract of culture medium contains, alongside the enzyme of interest, other substances, including other proteins. The characterization of recombinant PGA requires enzyme concentration and purification. Culture medium was isolated from cells of *Bacillus megaterium* PV361 (pga-pLipAhp) by centrifugation and concentrated 3.5 fold by dialofiltration (30 kDa cutoff). Following, the extract was dialyzed (12 kDa cutoff) against Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 for buffer exchange.

Different anion-exchangers were screened for initial purification trials (data not shown). Stronger protein adsorption was observed on the Q Sepharose. At pH 7.0, PGA was eluted with 300 mM NaCl. The results of three-step purification procedure are summarized in table 5.3. Active fractions from the fermentation broth and the eluate from Q Sepharose were evaluated by SDS-PAGE (Fig. 5.3), showing that the enzyme consisted of two dissimilar α and β sub-units, like other PGAs (MARESOVÁ *et al.*,

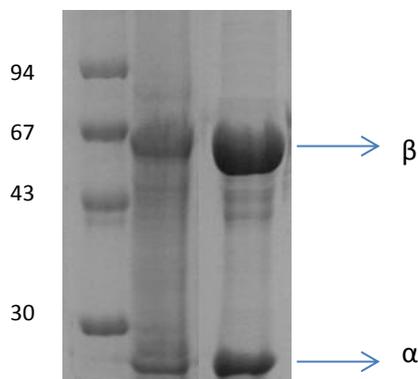
2010; MCDONOUGH; KLEI; KELLY, 1999; ŠKROB et al., 2003), with 23 kDa and 63 kDa respectively. This indicated that the protein should be in its mature processed form.

Table 5.3 - Purification profiles along PGA processing. Activity measurements (NIPAB substrate) were done along each of the purification and concentration steps. One unit is the amount of enzyme causing an absorbance change of 1.0 cm^{-1} at 405 nm.

	Total activity (U_{NIPAB})	Total protein (mg)	Specific activity (U_{NIPAB}/mg)	Recovery percentage	Purity factor
Raw medium	230.13	120.35	1.87	100	1
Concentrate	220.33	110.07	2.02	96.55	1.1
Dialyzed	220.97	70.36	3.12	99.32	1.75
Ion Exchange	70.61	10.37	5.76	32.91	3.08

The enzyme was purified 3-fold from crude culture medium, with recovery of 32.91%. The specific activity of purified enzyme was 5.6 U_{NIPAB}/mg of protein, measured with NIPAB. Comparing *Bacillus*-only systems, this is twice the yield reported for native PGA from *B. megaterium* NCIM 2670 (SENTHIVEL; PAI, 1996) and 19 times inferior to recombinant *B. megaterium* ATCC14945 PGA produced in *B. subtilis* (KANG; HWANG; YOO, 1991). Comparing other PGA sources, the final specific activity was about 3 times higher than the reported by Zhou *et al.* (2008) (*Alcaligenes faecalis* PGA produced in *E. coli*) and 4 times higher than *A. faecalis* PGA produced in *B. subtilis* (ZHOU et al., 2003). However, it was 5.5 times lower than *E. coli* PGA produced in *P. pastoris* (MARESOVÁ et al., 2010) and was 11 times lower than *Bacillus badius* PGA produced in *E. coli* (with His-tag purification system) (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2007).

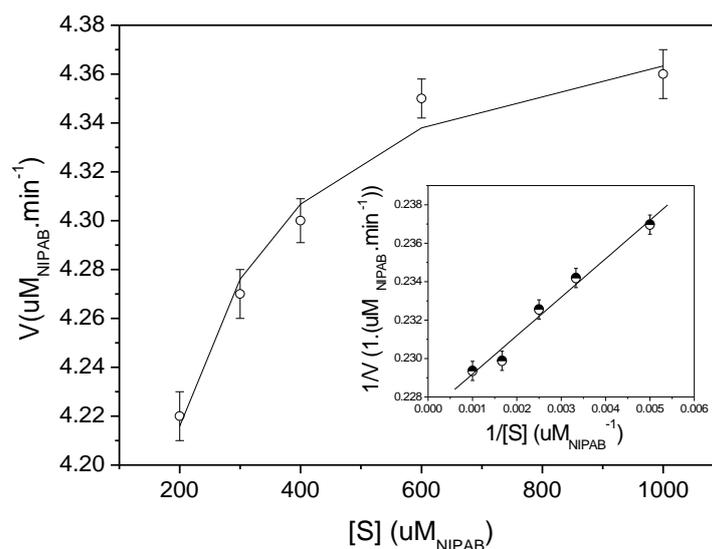
Figure 5.3 - Analysis of PGA purification by SDS-PAGE. Samples from the initial raw culture medium and the elution from ion exchange chromatography were submitted to SDS-PAGE 12% analysis. **1)** Molecular size marker, sizes indicated; **2)** Culture medium extract; **3)** Purified PGA from ion exchange chromatography. 10 μL samples at 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ protein concentration were loaded.



5.3.5 *Bacillus megaterium* PGA characterization

Kinetics of the majority of enzymatic reactions are represented by the Michaelis-Menten model, and for PGA, this was done with initial velocity points obtained by the NIPAB hydrolysis rates via product 6-nitro-3-aminobenzoic acid (NABA) formation, at different substrate concentrations (200-1000 μM). The slope of the product concentration versus time curve, determined from the initial linear phase of reaction represented the initial velocity for each initial substrate concentration (Fig. 5.4). The adjustment was initiated utilizing parameters estimated from linear adjustment points of the reverse velocity versus reverse substrate concentration curve in the Lineweaver-Burk plot (Fig. 5.4, insert). Our recordings on the partially purified recombinant *B. megaterium* PGA indicates $V_{\text{máx}} = 4,40 \pm 0,01 \mu\text{M NIPAB}/\text{min}$, $K_{\text{m}} = 8.8 \pm 0,7 \mu\text{M NIPAB}$. K_{m} values for different PGAs reported vary according to the enzyme source (SOUZA et al., 2005). *Acromobacter SP.* K_{m} was reported as 4,5 $\mu\text{M NIPAB}$ (ŠKROB et al., 2003), *E. coli* ATCCC 11105 has a K_{m} of 15 $\mu\text{M NIPAB}$ (ALKEMA et al., 2003) while *Bacillus badius* PGA produced in *E. coli* has a K_{m} as high as 41 μM (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2007).

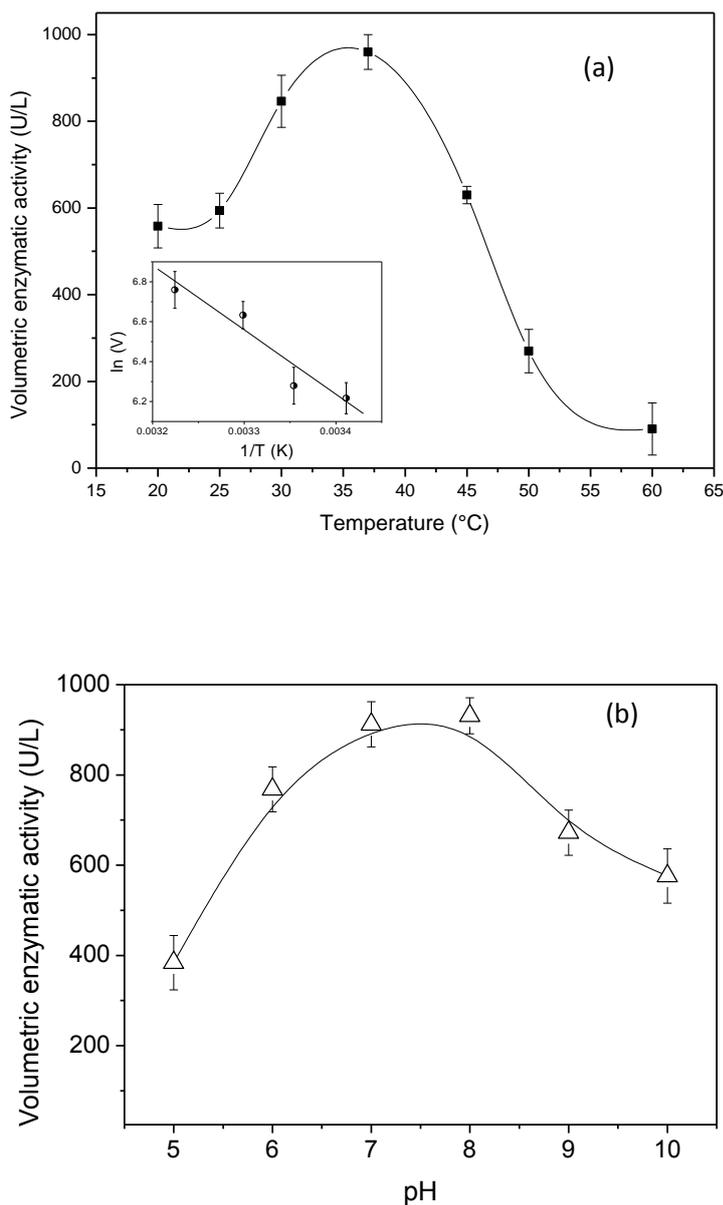
Figure 5.4. Kinetics modeling on the *Bacillus megaterium* PGA. The PGA Michaelis-Menten model based on the initial velocities of NIPAB hydrolysis catalyzed by purified recombinant PGA from *B. megaterium* PV361 (pga-pLipAhp), determined in initial substrate concentrations ranging from 200-1000 μM . Protein concentrations ranged from 200-1000 $\mu\text{g/mL}$. All the measurements were done in 50 mM phosphate buffer, pH 7.5, at 37° C. Product 6-nitro-3-aminobenzoic acid (NABA) formation was monitored at 405 nm in a Amersham Pharmacia Ultrospec 2100 pro UV/visible spectrophotometer using 2 mL cuvettes of 1 cm path length. **Insert** - Lineweaver-Burk plot data representation.



The Arrhenius plot of the enzyme was done by using the different linear initial product formation velocities from each sample temperature, representing the estimated activation energy for the enzyme around 26,29 kJ/mol, very close to the native *B. megaterium* PGA (25 kJ/mol) (SOUZA, 2007) and *E. coli* (KAZAN; ERTAN; ERARSLAN, 1997) PGA (30.24 kJ/mol). The PGA produced in this work has shown maximum enzymatic activity at 37° C (Fig 5.6(A)), the expected like native *B. megaterium* PGA (SOUZA et al., 2005).

In a similar way, figure 5.5 (B) shows the enzymatic activity velocities in different pH buffers. Maximum pH for the PGA in this work was pH 8.0, similar to the maximum pH for *Achromobacter* PGA (CAI et al., 2004; ŠKROB et al., 2003).

Figure 5.5. *Bacillus megaterium* PGA activity study in different temperatures and pHs. Optimal enzyme reaction environment was assayed using the linear initial product formation velocities from different temperature and pH values. **(a)** Effect of temperature in PGA activity, **insert** shows data in Arrhenius plot representation; **(b)** Effect of pH in PGA activity. All the measurements were done in an Amersham Pharmacia Biotech Ultrospec 2100 pro UV/visible spectrophotometer using 2 mL cuvette of 1 cm light path along 5 min. pH measurements were all done at 37° C.

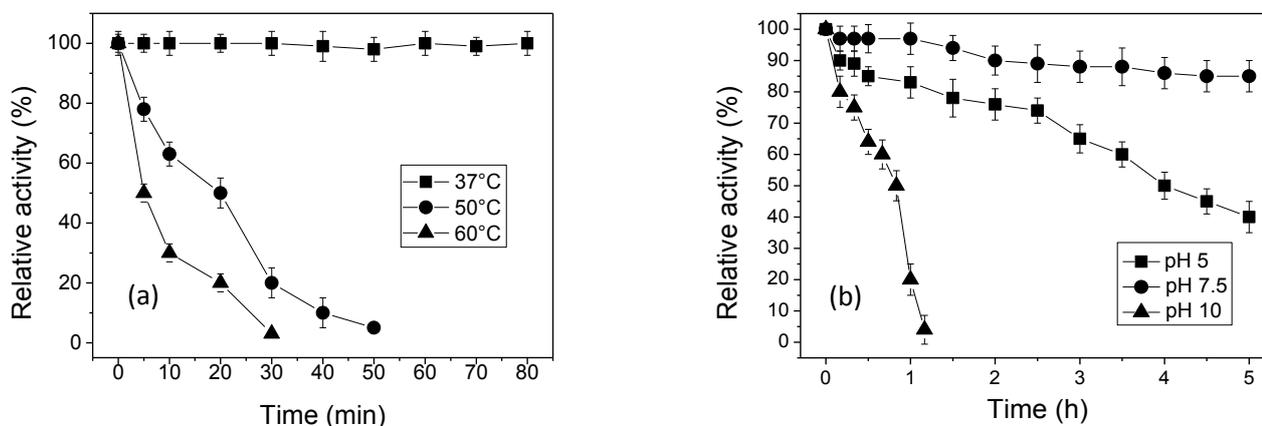


PGA thermal and pH stability were also studied on the partially purified enzyme. At 37° C, the enzyme was shown very resilient (Fig. 5.6(A)), recording no apparent loss up to 80 min. At 50° C, *B. megaterium* PGA has a half-life around 20 min and at 60° C, half of the activity is lost around a 5 min incubation time, being completely inactive

after 30 min. *B. megaterium* PGA is slightly more stable than *E. coli* PGA (VERHAERT et al., 1997) that has a half-life smaller than 20 min at 50° C and is totally inactive in 20 min at 60° C. However, *Achromobacter xylosoxidans* PGA has a half-life of 8 min at 60° C (CAI et al., 2004), and *Alcaligenes faecalis* PGA records no inactivation up to 20 min (VERHAERT et al., 1997). In this respect, *B. megaterium* PGA behaves closer to *E. coli* PGA.

B. megaterium PGA pH stability assays (Fig. 6.6 (B)) showed that the enzyme is more stable at pH 7.5, losing very little activity up to 5 h. However at pH 10.0, complete inactivation is reached in 1 h. At pH 5.0, PGA half-life is around 4 h.

Figure 5.6. *Bacillus megaterium* PGA stability in different temperatures and pHs. PGA activity persistence was measured along incubation in different temperatures and pH buffer values. **a)** Relative PGA activity loss along different temperatures incubation; **(b)** PGA activity relative loss along different pH buffers incubation. Measurements were done using 2 mL cuvette of 1 cm light path along 5 min. pH incubations and measurements were done at 37° C.



Maximum activity of *B. megaterium* PGA preparation from this work and some other PGAs are listed in Table 5.4 and as briefly described, it is a catalyst more efficient than some other PGAs. Like *A. faecalis* e *E. coli*. PGAs, maximum activity temperature for the enzyme from *B. megaterium* is 37° C. Although its relative high enzymatic efficiency, other PGA sources like *Achromobacter*, *Bacillus badius* and *K. citrophila* show higher maximum reaction temperatures and obviously are more heat stable.

Table 5.4 - *Bacillus megaterium* PGA general activity comparison with other PGA sources. Maximum activity records are compared to *B. megaterium* PGA.

Source	T _{max act} (° C)	pH _{max act}	K _m (μM NIPAB)	Reference
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	60	8-8.5	27	(CAI et al., 2004)
<i>Achromobacter sp.</i>	60	7.5	4.5±0.2	(ŠKROB et al., 2003)
<i>Alcaligenes faecalis</i>	37	8.5	4.5	(ŠVEDAS et al., 1997)
<i>E. coli</i>	37	7.8	30	(ŠVEDAS et al., 1997)
<i>Bacillus badius</i>	50	7	41	(RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2007)
<i>K. citrophila</i>	55	8.5	17.6	(WEN et al., 2004)
<i>Bacillus megaterium</i>	37	8	8.8±0.7	This work

5.4 Conclusions

Penicillin G acylase is an important industrial enzyme for the semi-synthetic penicillins production. Also, *B. megaterium* PGA has the attractive feature of being secreted to the medium. From these premises, this work focused on the molecular cloning for the production of *B. megaterium* PGA. Different *B. megaterium* strains were studied as potential hosts for recombinant PGA production. From the three strains tested, *B. megaterium* PV 361 was the best overall host. The better plasmid and production stability allied to the lower proteases levels makes this host an nice choice for protein production. By using pga-pLipAhp, which replaces native preproPGA signal peptide with SP_{lipA}, cloned proPGA could be both secreted and processed to fully functional heterodimeric mature PGA. Transforming *B. megaterium* PV361 with this construct yielded 1897±68 U_{nipab}/L of PGA, four times more than the optimized conditions reported for wild type *B. megaterium* productivity (SOUZA, 2007) and two times the reported using a similar construct in YYBm1-PRBBm49 (YANG et al., 2006). Partial purification process was accomplished and, although remaining to be optimized, gave reasonable results and directions on obtaining *B. megaterium* PGA. Making PGA available, some enzyme characteristics could be studied. Our preparation of *B. megaterium* PGA has a K_m around 9 μM at 37° C in pH 7.5 Enzyme stability parameters are quite valuable for detailed purification and immobilization processes, required for industrial use of this enzyme as a biocatalyst. Thermal stability of *B. megaterium* PGA is similar to the *E. coli* PGA, with a half-life of 20 min at 50° C and up to 5 min at 60°

C. The enzyme loses activity in 1 hour at pH 10.0 or 8 hours at pH 5.0, being most stable at physiological pH 7.5. Although our *B. megaterium* PGA production system could not reach the most productive levels reported for other PGAs, it is yet promising, also accounting that the results to date are somewhat preliminary and no optimizations were done yet to inducing medium and culture conditions, for example.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support from "Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP" process number 2009/00127-2 and "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq".

6. SELEÇÃO DE MEIOS DE CULTIVO E ESCALONAMENTO DA PRODUÇÃO DE PENICILINA G ACILASE POR *BACILLUS MEGATERIUM* RECOMBINANTE

Os meios de cultivo são projetados para atender a demanda nutricional do microrganismo produtor, os objetivos do processo e a escala de operação. A seleção desses meios depende, para a maioria dos processos em larga escala, do custo, disponibilidade e propriedades de manejo dos componentes dos mesmos (LIMA et al., 2001).

Os componentes básicos, nutricionalmente importantes, são fontes de carbono, de nitrogênio, sais minerais e, em alguns casos, fatores de crescimento (LIMA *et al.*, 2001). Os sais minerais e traços de metais são peças chave na secreção de proteínas em *Bacillus megaterium* recombinante, como já reportado por David *et al.* (2010) e Sarvas *et al.* (2004).

Bacillus subtilis é conhecido pela dependência da concentração de íons de metal no meio externo para um bom processo de secreção de proteínas (THWAITE et al., 2002). A eficácia dos íons metal para atuar no enovelamento é determinada pela sua concentração no meio de cultivo e as propriedades dos polímeros aniônicos (ácido teicóico e teicuronico) que estão covalentemente ligados à parede celular (WARD, 1981).

A parede celular possui uma alta densidade de cargas negativas que, por conseguinte, atraem cátions positivos como Ca^{2+} , Fe^{3+} e Mg^{2+} . Estes cátions são necessários como fator de enovelamento para uma variedade de proteínas secretadas incluindo α -amilase e levansacarose em *Bacillus subtilis*, em particular os íons cálcio e ferro podem atuar como cofatores no processo simultâneo de enovelamento com o processo de translocação (CHAMBERT; PETIT-GLATRON, 1999; HARWOOD; CRANENBURGH, 2008). Por essas razões, é fundamental a realização de estudos para melhorar a composição dos meios utilizados em cultivos de *B. megaterium*.

Outro aspecto importante no desenvolvimento de um bioprocesso é a ampliação de escala. Na grande maioria dos processos, o desenvolvimento natural parte de uma menor escala de produção para uma escala maior. Essa variação de escala é conhecida como aumento de escala ou ‘*scale-up*’. Na escala de bancada, levando-se em consideração sua maior flexibilidade e menor custo de operação, os dados básicos sobre

o processo devem ser levantados dentro do maior nível de detalhamento possível. Nessa escala são realizadas tarefas básicas, como a seleção do microrganismo e o desenvolvimento do meio de cultura ideal. Também são escolhidas as condições de temperatura e pH para o processo, assim como a forma de operação do biorreator (SCHMIDELL et al., 2001).

Os principais objetivos desta etapa do trabalho foram: i) estudar a influência da composição de meios, definidos e complexos, sobre o crescimento de *B. megaterium* recombinante e a produção de PGA por este organismo; ii) selecionar os dois melhores meios definido e complexo e avaliar o desempenho dos mesmos em cultivos conduzidos em biorreator de bancada

6.1 Materiais e Métodos

6.1.1 Microrganismos

Para os ensaios de otimização de meios de cultura, utilizou-se a linhagem de *B. megaterium* PV 361 transformada com a construção pga-pLipAhp, obtidos conforme já descritos no capítulo 5. Todas as cepas foram conservadas em criotubos contendo 10% (v/v) de glicerol 80% e mantidas em ultra freezer a -80°C.

6.1.2 Métodos analíticos

6.1.2.1 Determinação da concentração celular

O crescimento celular foi medido de acordo com a densidade óptica do meio de cultura, no comprimento de onda de 600 nm e por medidas de massa seca (gms/L). As medidas de massa seca foram determinadas nos cultivos em biorreator, através da filtração de um volume conhecido da amostra em uma membrana com poro de 0,22 µm previamente pesada. A amostra foi submetida à secagem por 24 horas em estufa a 60°C

e pesada posteriormente. A partir das medidas de $DO_{600\text{ nm}}$ e Cx obteve-se a correlação $Cx=0.344*DO_{600\text{ nm}}$

6.1.2.2 Medida da atividade enzimática de PGA de *B. megaterium* recombinante

A atividade da enzima livre foi obtida determinando-se a velocidade inicial de hidrólise do ácido 6-nitro-3-fenilacetamidobenzóico (NIPAB), pH 7,5, a 37°C, em reação catalisada por PGA (KUTZBACH; RAUENBUS, 1974). O coeficiente de absorção molar do NIPAB ($9,09\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$) foi utilizado para calcular a atividade enzimática. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a produção de 1 μmol de 6-nitrofenol por minuto, nas condições experimentais estabelecidas.

Para as análises conduzidas em placas de 96 poços, os mesmos foram preenchidas com 200 μL do ácido 6-nitro-3-fenilacetamidobenzóico (NIPAB), pH 7,5, a 37°C, em reação catalisada por PGA (KUTZBACH; RAUENBUS, 1974). Depois de 12 horas de indução do cultivo de *B. megaterium* recombinante, amostras de 20 μL foram diluídas com água destilada 1:10 em placas de 96 poços de 200 μL e centrifugadas à 4000 rpm por 5 minutos. Um volume de 10 μL deste sobrenadante foi transferido para as placas com o substrato e posteriormente realizou-se a medição da cinética enzimática no leitor de microplacas “Tecan” a 405 nm, a cada 30 segundos, durante 5 minutos.

6.1.2.3 Determinação da concentração das fontes de carbono e de ácidos orgânicos

As concentrações das fontes de carbono (glicose, glicerol, xilose) e dos ácidos orgânicos nas amostras retiradas durante os cultivos em frascos agitados e biorreator foram determinadas por CLAE, utilizando a coluna Aminex HPX-87H da Bio-Rad como fase estacionária e a solução de ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel, à uma vazão de 0,6 mL/min e 60°C.

Para os experimentos realizados em frascos agitados e biorreator de 1 L, a concentração de glicose no sobrenadante das amostras foi quantificada utilizando-se um

analisador de glicose YSI (Biochemistry analyzer YSI 2700 Select, Kreienbaum WM e.K., Langenfeld, Alemanha) e de glicerol foi medida por HPLC.

Já para os experimentos em biorreator de 5 L, a concentração do glicerol no sobrenadante também foi medida durante o decorrer dos cultivos utilizando-se kit para determinação de triglicérides por metodologia enzimática-colorimétrica. A absorbância do complexo medida em 505 nm é diretamente proporcional à concentração de triglicérides. O branco, o padrão e as amostras convenientemente diluídas foram incubados por 10 minutos a 37°C e, em seguida, foram realizadas as leituras no espectrofotômetro num comprimento de onda de 505 nm.

6.1.2.4 Determinação da concentração de proteínas

O procedimento utilizado corresponde ao método descrito em Bradford (1976). Utilizou-se o reagente comercial Bradford da Sigma, incubando-se as amostras por 5 minutos e depois lendo-as no espectrofotômetro, com comprimento de onda de 595 nm. Tal reagente é adequado para ler amostras com concentrações entre 50 e 1400 µg/mL.

6.1.3 Descrição da estratégia experimental

A figura 6.1 apresenta esquematicamente a abordagem utilizada para a otimização da produção de penicilina G acilase em *Bacillus megaterium* recombinante e o escalonamento do bioprocesso.

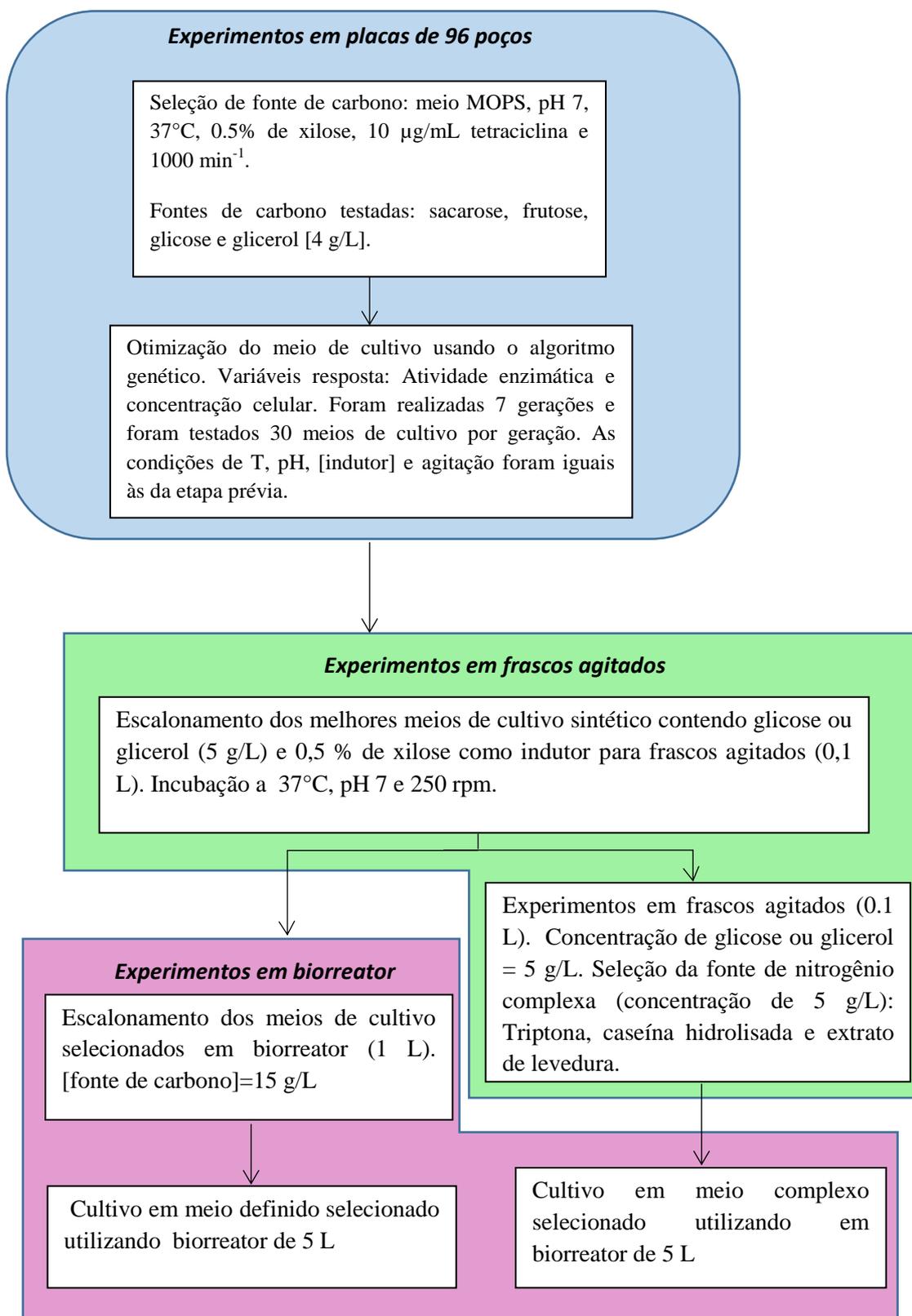
Na primeira etapa do trabalho, realizaram-se experimentos em placas de 96 poços, tendo como ponto de partida o meio MOPS, pH 7, reportado na tabela 6.1, contendo diferentes fontes de carbono (glicose, glicerol, frutose e sacarose). Para a seleção das duas melhores fontes de carbono e da melhor composição dos meios em ions metálicos, que maximizaram a atividade enzimática e concentração celular, foi empregado o algoritmo genético, com 7 gerações.

Na segunda etapa de desenvolvimento do trabalho, foram realizados experimentos em frascos agitados com os melhores meios de cultivo, identificados nos experimentos preliminares conduzidos nas placas de 96 poços. A partir destes

resultados, foram realizados experimentos em biorreatores de 1 L e 5 L com meio sintético.

Paralelamente à seleção dos meios sintéticos, realizou-se um estudo da influência de diferentes fontes de nitrogênio complexas sobre a produção da enzima recombinante e o crescimento celular, no qual foram testados 4 suplementos (triptona, hidrolisado de soja Soytone, caseína hidrolisada e extrato de levedura). A partir dos melhores resultados em frascos agitados, realizou-se um experimento em biorreator de 5 L contendo o meio complexo com o melhor nutriente.

Figura 6.1 - Metodologia experimental do processo de otimização e escalonamento para produção de Penicilina G Acilase em *Bacillus megaterium* recombinante.



Fonte: elaboração própria.

6.1.3.1 Seleção de meios de cultivo em placas de 96 poços

Para definição das composições do meio com algoritmo genético, utilizou-se o programa *Genetic Algorithms for the optimization of processes* (GALOP Versão 2.2, IBT Reasearch Center Jülich). A função multi-objetivo foi maximizar simultaneamente a quantidade de PGA recombinante no sobrenadante medido por NIPAB e o rendimento de biomassa de *B. megaterium* PV 361. A configuração do programa para os cultivos em placas de 96 poços para cada geração está resumida na tabela 6.1.

Tabela 6.1 - Configuração do programa GALOP para a otimização da composição de meio definido com algoritmo genético.

Número de variáveis de entrada	12
Variáveis de entrada	Concentração de sais no meio de cultura
Bits por variável	7
Faixa de variação	2 dezenas de magnitude
Tamanho da população	30
Gerações	7
Variáveis resposta	Densidade ótica (DO) Atividade enzimática (U/L)
Alvo	Aumento da biomassa Aumento da atividade enzimática
Seleção	50% biomassa 50% atividade enzimática
Scaling window	3
Método	Keep best, Ball bearing
Crossover	0,95
Taxa de mutação	0,016

Fonte: elaboração própria.

O tamanho da população é o número de meios testados por cada geração de experimentos, novas gerações foram selecionadas pelo programa GALOP a partir dos melhores resultados de gerações prévias. Paralelamente foram testadas concentrações de sais diferentes no meio. O algoritmo genético foi convergindo na função objetivo com menores intervalos de concentração de sais, conferindo maior estabilidade ao programa. O método utilizado ‘*keep best, ball bearing*’ selecionou como constantes os elementos

da composição com as melhores respostas, alterando na geração seguinte aqueles elementos susceptíveis à melhora.

Foram realizadas 7 gerações, onde cada geração era um conjunto de 30 experimentos em triplicata, realizados nas placas de 96 poços, usando 90 poços, os 6 poços restantes foram usados para controle.

Apresentam-se na tabela 6.2 o meio mínimo controle, MOPS pH 7.0 (adaptado de Yang *et al.*, (2006)) e na tabela 6.3 as concentrações dos sais que foram utilizados como níveis mínimo e máximo nas composições de entrada do algoritmo genético nas 7 gerações.

Tabela 6.2 - Composição do meio MOPS pH 7.

Componente	Concentração (g/L)
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1
MnCl ₂ .4H ₂ O	1,9791E-2
FeSO ₄ .7H ₂ O	1,39E-2
CaCl ₂	2,775E-1
NH ₄ Cl	2
K ₂ HPO ₄	2,3E-1
H ₃ BO ₃	2,473E-5
CuSO ₄	2,497E-6
ZnSO ₄	2,875E-6
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	3,708E-6
CoCl ₂	7,137E-6
KCl	7,455E-1
NaCl	0,745
K ₂ SO ₄	0,048
Fonte de carbono	4
MOPS pH 7	12,36

Fonte: adaptado de Yang *et al.* (2006).

Os outros três componentes do meio mínimo original (tabela 6.2) que não aparecem na tabela 6.3, mantiveram-se invariáveis. Estes componentes são: tampão do meio de cultura, MOPS pH 7, 12.36 g/L; NaCl, 0.745 g/L e K₂SO₄, 0.048 g/L.

Tabela 6.3 - Concentrações de sais utilizadas para a otimização do meio de cultivo.

Componente	1-6 geração		7 geração	
	Nível mínimo (g/L)	Nível máximo (g/L)	Nível mínimo (g/L)	Nível máximo (g/L)
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,01	1	0,4	1,4
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,9791E-3	1,9791E-1	0,05	0,15
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1,39E-3	1,39E-1	0,01	0,06
CaCl ₂	2,775E-2	2,775	0,5	1,5
NH ₄ Cl	0,2	10	1	5
K ₂ HPO ₄	2,3E-2	2,3E-1	0,15	0,35
H ₃ BO ₃	2,473E-6	2,473E-4	1,5E-4	5E-4
CuSO ₄	2,497E-7	2,497E-5	1,5E-5	5E-5
ZnSO ₄	2,875E-7	2,875E-5	2,5E-6	5.5E-5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	3,708E-7	3,708E-5	2,5E-5	5E-5
CoCl ₂	7,137E-7	7,137E-5	4E-5	9E-5
KCl	7,455E-2	7,455	4	10

Fonte: elaboração própria.

Para a preparação dos meios de cultura, foram preparadas soluções estoque de cada composto, as quais foram esterilizadas por filtração e misturadas um dia antes de realizar-se os cultivos nas placas de 96 poços.

Para o preparo do inóculo, 0,1 mL da cultura estoque de glicerol de *Bacillus megaterium* PV 361 foi transferida para 10 mL de meio LB com 10 µg/mL de tetraciclina e incubado em shaker a 37°C e 130 rpm até atingir uma DO de 4. Posteriormente, estas células foram centrifugadas em Eppendorfs de 2 mL, 5000 x g, por 5 min, retirando-se o sobrenadante. As células foram lavadas com o meio MOPS, pH 7 descrito na tabela 6.2. O inóculo foi diluído até atingir uma DO de 0,2 em 100 mL de MOPS pH 7 contendo 10 µg/mL de tetraciclina. Este meio sintético foi incubado em shaker a 37°C e 130 rpm até atingir uma DO de 4. Em seguida, realizou-se uma diluição até atingir uma DO de 0,1 nas placas de 96 poços.

Previamente, placas de 96 poços de 2 mL de volume foram preenchidas com 900 µL de meio sintético e 10 µg/mL de tetraciclina em triplicatas de meios de cultura selecionados aleatoriamente pelo programa GALOP e nos 6 poços finais, adicionou-se o meio de cultura controle MOPS, pH 7 com 10 µg/mL de tetraciclina, meio apresentado na tabela 6.2. As placas foram fechadas com Aeraseal sealingfilm (Sigma-

Aldrich, A9224-50 EA) e incubadas em um agitador Titramax 1000 (Heidolph, Düsseldorf) a 37°C, 1000 min⁻¹.

Depois de 7 horas de cultivo, realizou-se a indução destes meios de cultura com xilose 0.5% (w/v). Por fim, teve-se o meio MOPS, pH 7 induzido (controle positivo) e sem induzir (controle negativo). Após 12 horas de indução dos cultivos de *B. megaterium* recombinante, amostras de 20 µL foram diluídas com água destilada 1:10 em placas de 96 poços de 200 µL e quantificou-se a DO a 620 nm no leitor de microplacas ‘Tecan’.

Placas de 96 poços foram preenchidas com 200 µL do ácido 6-nitro-3-fenilacetamidobenzóico (NIPAB), pH 7,5, a 37°C, em reação catalisada por PGA (Kutzbach, 1974). Depois de 12 horas de indução do cultivo de *B. megaterium* recombinante, as amostras de 20 µL foram diluídas com água destilada 1:10 em placas de 96 poços de 200 µL e centrifugadas à 4000 rpm por 5 minutos. 10 µL deste sobrenadante foram transferidos nas placas com o substrato e posteriormente realizou-se a medição da cinética enzimática no leitor de microplacas “Tecan” à 405 nm, a cada 30 segundos, durante 5 minutos.

Importante ressaltar que tais experimentos de otimização têm de ser realizados em condições de crescimento não limitado por oxigênio. A concentração do oxigênio é influenciada pelo volume do cultivo e também pela quantidade de biomassa gerada, que está diretamente relacionada à quantidade da fonte de carbono presente inicialmente. Por este motivo, utilizou-se concentrações moderadas da fonte de carbono (4 g/L) e um volume de cultivo de 900 µL, no qual já foi reportado como ideal na produção de fragmentos de anticorpos por *B. megaterium* recombinante (DAVID et al., 2010).

6.1.3.2. Experimentos em frascos agitados

Após seleção de um meio do item anterior, com os melhores resultados de DO e atividade enzimática, foram realizados experimentos de escalonamento em frascos agitados e biorreator de 1 L. Nos experimentos de escalonamento sempre foi utilizado o meio MOPS, pH 7 como controle negativo e como controle positivo foi utilizado o meio LB low salt (10 g/L de triptona Oxoid, 5 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de NaCl, pH 7) (YANG, 2007).

Para o preparo do inóculo, uma amostra da cultura estoque em glicerol foi transferida para uma placa com LB ágar e 10 µg/mL de tetraciclina. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C. Selecionou-se uma colônia, a qual foi transferida para 10mL de meio contendo 10 µg/mL de tetraciclina. Em seguida, o inóculo foi incubado *overnight* sob rotação de 250 rpm a 37 °C em shaker. Quando o inóculo alcançou uma DO 600 de 4, lavou-se as células com meio sintético e estas foram transferidas para 100mL do novo meio, até atingir uma DO de 0.2, adicionando 10 µg/mL tetraciclina e, incubou-se em 250 rpm a 37 °C em frascos de 1 L. Para os ensaios em shaker, sempre foram utilizados 5 g/L da fonte de carbono escolhida.

Para a indução da produção da enzima, aguardou-se que a cultura atingisse DO 600 de 1 e posteriormente, adicionou-se 0.5% (v/v) de xilose, indutor do promotor P_{xylA} presente no vetor *shuttle* utilizado. Foram extraídas alíquotas de 1 mL ao longo de 12 h após indução, as quais foram centrifugadas (8000 x g por 5 min) e o sobrenadante foi utilizado para análise de atividade enzimática.

6.1.3.3 Cultivos em biorreator

Dois tipos de biorreatores foram empregados nesse estudo. 6 cultivos foram realizados (C1-C6), ainda com o objetivo de estudar a composição de meios de cultivo, no sistema de biorreatores em paralelo Dasgip[®] biorreactors referência SR1000, na Universidade Tecnológica de Braunschweig, Departamento de Engenharia Bioquímica, Braunschweig (Alemanha).

Com este sistema é possível realizar até 4 cultivos com volume de 1 L em paralelo, como é mostrado na figura 6.2. O sistema de biorreatores é composto pelos seguintes acessórios: computador munido de *software* de controle e monitoramento Dasgip[®], *software solutions* que pode controlar os 4 experimentos ao mesmo tempo, monitorando a concentração de oxigênio dissolvido, ajustada a 30% e sensor de concentração de oxigênio dissolvido Mettler Toledo GmbH, Giessen, (Alemanha). O pH é controlado pela adição de base (1 M de NH₄OH). Em todos os experimentos, a indução foi feita aplicando-se pulsos de xilose com concentração de 200 g/L de xilose para atingir 5 g/L na concentração final no biorreator.

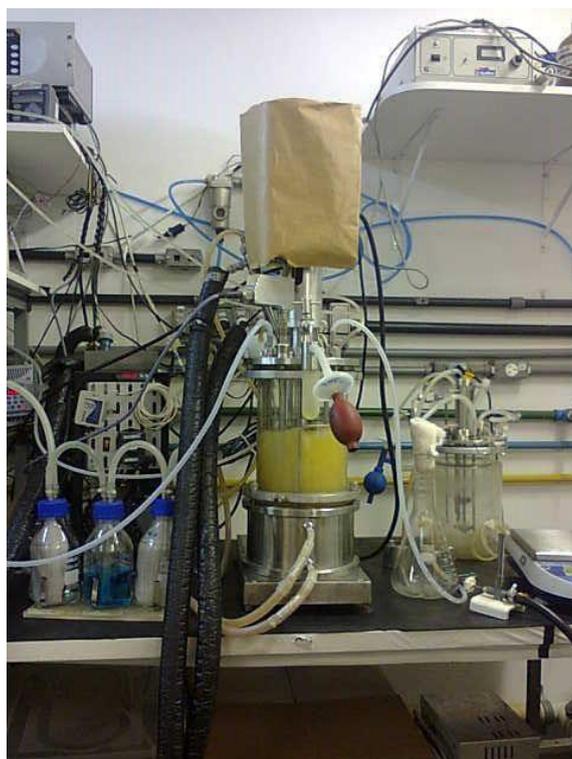
Figura 6.2 - Sistemas de biorreatores Dasgip[®] de 1L.



Fonte: Elaboração própria.

Os experimentos C7 e C8 foram realizados em biorreator *in-house* localizado no Lab. de Controle do DEQ/UFSCar, mostrado na figura 6.3. O aparato experimental para aquisição, monitoramento e controle do reator é formado pelos seguintes acessórios: computador munido de *software* de controle e monitoramento desenvolvido em Labview pela equipe de pesquisadores do Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos; compact Field Point (cFP) da National Instruments, para a comunicação entre os instrumentos e o computador; inversor de frequência controlando a velocidade de agitação via computador/cFP; bomba de alimentação ISMATEC controlada via computador/cFP; pHmetro GLI com aquisição via cFP; transmissor da concentração de oxigênio dissolvido (modelo CE, O2 4050) com aquisição via cFP; analisador de gases (Sick/MAIHAK S710) com aquisição digital direta via RS232 e também analógica via cFP; banho térmico, termopar com aquisição via cFP, bombas de ácido e base (Masterflex) com controle on/off via computador/cFP; além de 2 fluxômetros de massa (GFC AALBORG) empregados para suprir ar e oxigênio, controlados remotamente via cFP (HORTA, 2011).

Figura 6.3 - Biorreator de 5 L



Fonte: Elaboração própria.

Os cultivos tiveram controle de pH automático pela adição de hidróxido de amônio, controle da concentração de oxigênio dissolvido por atuação, tanto na velocidade de agitação como no enriquecimento automático da corrente gasosa com ar ou oxigênio puro. Nos experimentos conduzidos nos reatores de 5 L, devido à elevada concentração de biomassa presente, a indução foi realizada por meio de pulsos sequenciais de xilose, restaurando a sua concentração para 5 g/L no meio.

O volume inicial de batelada foi de 70% do volume do equipamento (0.7 L para 1 L e 3.5 L para o de 5 L) de forma que, após a adição dos pulsos, o volume do meio de cultivo fosse de, no máximo, 4,5 L. A formação de espuma foi controlada pela adição de polipropilenoglicol 30%. Os meios de cultivo para a realização de experimentos com volume de 1 e 5 L foram determinados a partir dos resultados obtidos e estão descritos na tabela 6.6.

Para os cultivos em biorreator de 5 L (C7 e C8), a concentração da fonte de carbono foi acompanhada ao longo do cultivo por meio do kit enzimático para triglicérides e quando se constatava esgotamento da mesma, meio suplementar contendo

fonte de carbono e nutrientes foi adicionado na forma de pulso. A composição dos pulsos está descrita na parte de resultados, na tabela 6.10.

6.2 Resultados e Discussões

6.2.1 Seleção de meios de cultivo utilizando placas de 96 poços

A miniaturização da escala de mililitro para microlitro pode ser vantajosa para a realização de um grande número de experimentos em paralelo. Por esta razão, as placas de microtitulação são cada vez mais utilizados como sistemas de cultivo para o “screening” e otimização de meios de cultivo (KENSY et al., 2009). Placas equipadas com diferentes quantidades (24, 48, 96 ou 384), com poços em forma redonda ou quadrada e diferentes geometrias de fundo (fundo redondo ou quadrado) são comumente usadas para o cultivo de organismos (DOIG et al., 2005; KENSY et al., 2005).

Neste estudo em placas de 96 poços, primeiro foram escolhidas 2 fontes de carbono, para depois realizar uma otimização dos meios de cultivos a partir dos resultados de crescimento celular e atividade enzimática de *Bacillus megaterium* recombinante.

6.2.1.1 Fonte de carbono

Antes de dar início à otimização das concentrações do meio de cultura, realizou-se um ensaio em placas de 96 poços, a fim de se estabelecer a influência da fonte de carbono no crescimento e na produção da proteína recombinante em *B. megaterium*. O estudo foi realizado com 4 diferentes fontes de carbono: sacarose, glicerol, glicose e frutose, com uma concentração de 4 g/L e meio MOPS pH 7, descrito na tabela 6.2. Os resultados deste ensaio preliminar estão apresentados na tabela 6.4.

Foi feito um acompanhamento da densidade ótica ($DO_{620\text{ nm}}$) destes cultivos para conhecer o μ_{max} até atingir a fase exponencial ($DO_{620\text{ nm}}=0.8$) e induzir a cultura com 0.5% de xilose. Após 12 horas da indução, retirou-se uma amostra para medir a atividade enzimática e também a DO com estas fontes de carbono.

Tabela 6.4 - Estudo da melhor fonte de carbono para a produção de PGA recombinante em *B. megaterium* PV 361.

Fonte de carbono	μ_{\max} (h^{-1}) antes da indução	Atividade Enzimática ($\text{U}_{\text{NIPAB/L}}$)	$\text{DO}_{620\text{nm}}$ após 12 h indução
Sacarose	0,051 \pm 0,002	1,17 \pm 0,15	0,9 \pm 0,2
Frutose	0,281 \pm 0,022	3,47 \pm 0,06	2,8 \pm 0,1
Glicose	0,348 \pm 0,031	4,87 \pm 0,12	3,3 \pm 0,1
Glicerol	0,431 \pm 0,012	5,93 \pm 0,06	3,5 \pm 0,2

Fonte: elaboração própria.

Como pode ser observado na tabela 6.4, a melhor fonte de carbono para a produção de PGA recombinante é o glicerol, obtendo-se os melhores resultados do μ_{\max} , DO e atividade enzimática, após 12 horas de indução. Com respeito à velocidade de crescimento, observou-se uma velocidade 10 vezes maior no meio contendo glicerol em relação ao cultivo em sacarose, 1,53 vezes maior em relação à frutose e 1,23 vezes em relação à glicose.

Nota-se que a atividade enzimática esteve fortemente relacionada com a biomassa produzida; os melhores resultados de $\text{DO}_{620\text{nm}}$, com glicerol e glicose, correspondem também aos melhores resultados em atividade enzimática. Devido a estes resultados, optou-se pelo glicerol e pela glicose como fontes de carbono para a produção de PGA recombinante em *B. megaterium* PV 361, sendo o meio inicial MOPS pH 7.

Com relação à literatura, fontes de carbono já foram testadas para a produção de anticorpos recombinantes em *B. megaterium* YYBm1 por David *et al.* (2011), obtendo-se os melhores resultados de densidade ótica e produção do anticorpo com frutose e sacarose. Por outro lado, as melhores velocidades de crescimento foram obtidas com glicose (0,64 h^{-1}) e sacarose (0,52 h^{-1}).

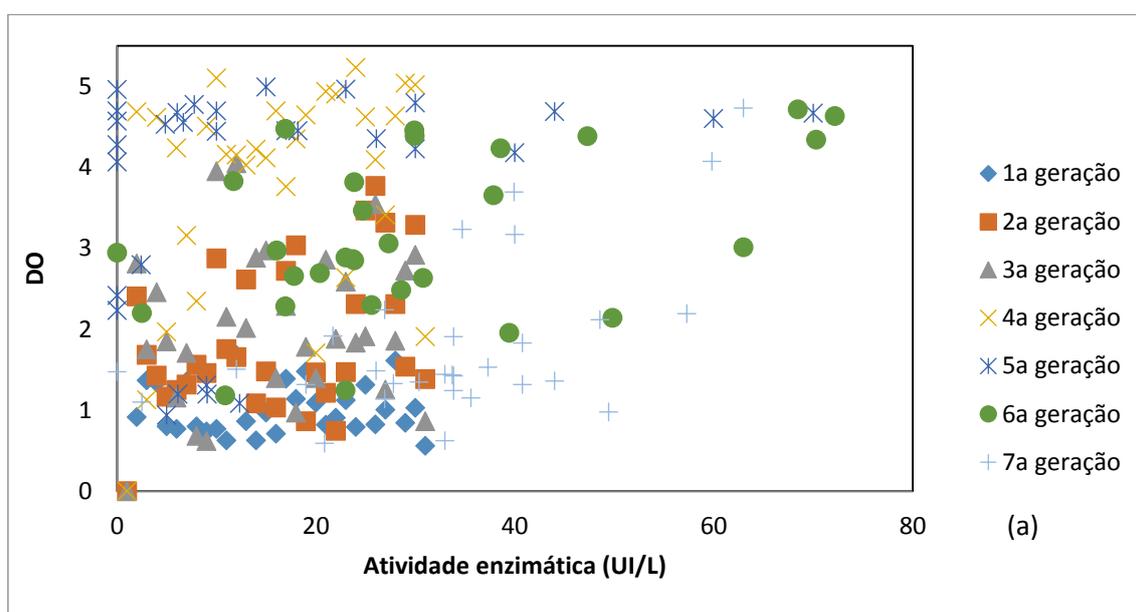
Korneli *et al.* (2013) também estudaram diferentes fontes de carbono (frutose, glicose e glicerol) para a produção de levansacarose por *B. megaterium*, obtendo a maior produção de enzima nos cultivos conduzidos com frutose e glicerol, e baixas atividades de levansacarose com glicose.

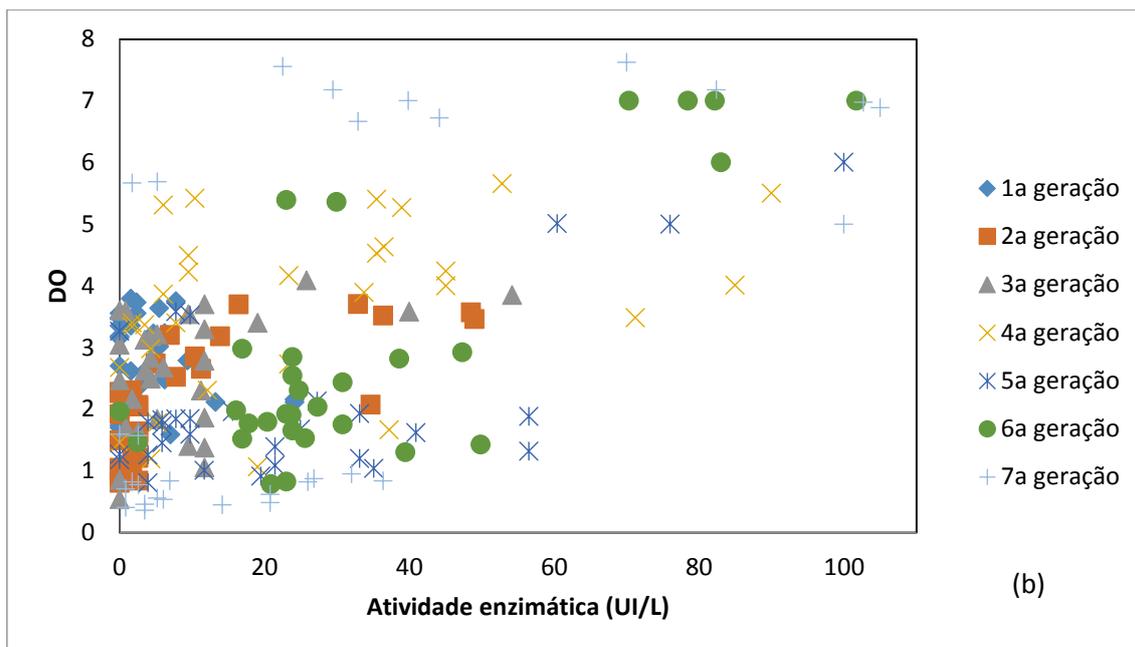
6.2.1.2 Estudo da otimização da composição de sais para as fontes de carbono selecionadas

Realizaram-se 30 ensaios em triplicata por cada geração e para o estudo de otimização, foram feitas 7 gerações para cada fonte de carbono (glicose e glicerol). Para cada fonte de carbono, foram obtidos 210 cultivos - apresentados nas Figura 6.4 a,b - relacionando cada um dos 12 componentes testados (variável de entrada) com a atividade enzimática e o crescimento celular obtido (variável de saída).

A composição de elementos traços é mais importante para a produção e secreção de proteínas recombinantes do que para a formação de biomassa, devido à adaptação evoluída e robustez que distingue *B. megaterium* como uma bactéria do solo ajustada a todos os tipos de habitat (VARY, 1994). Por este motivo, é de se esperar uma melhora na produção da enzima recombinante, mas não uma grande melhora no crescimento celular. Todos os resultados dos experimentos realizados em placas de 96 poços usando glicose como fonte de carbono estão resumidos na figura 6.4(a) e os experimentos realizados com glicerol são reportados na figura 6.4(b). É possível observar a evolução dos experimentos ao longo das gerações e resultados diferentes para glicose e para glicerol como fontes de carbono.

Figura 6.4 - Resultados obtidos após 12 h indução a partir das 7 gerações de experimentos produzidas a partir dos experimentos aleatórios criados com o algoritmo genético em placas de 96 poços incubadas a 37°C e 1000 rpm. (a) Glicose como fonte de carbono. (b) Glicerol como fonte de carbono.





Fonte: Elaboração própria.

Nas primeiras gerações, os valores de DO média e atividade enzimática eram baixos para a grande maioria dos experimentos. Este comportamento inicial é explicado pela grande faixa de concentrações estudadas, gerando diversas combinações aleatórias que não correspondem a boas condições de crescimento e produção de enzima. Por exemplo, encontraram-se precipitações nos cultivos que foram realizados com altas concentrações de FeSO_4 . Ao longo das gerações, este comportamento foi melhorando até encontrar uma faixa razoável para cada composto. Observa-se uma diferença positiva nos resultados após a quarta geração, com altas atividades enzimáticas, 50 vezes maiores do que as que foram obtidas na primeira geração e altas concentrações de biomassa, sendo 5 vezes os valores iniciais.

Para a sétima geração, foram redefinidas as faixas de concentração dos experimentos propostos pelo programa GALOP. As concentrações estão apresentadas na tabela 6.3 da seção de materiais e métodos. Com o intuito de se melhorar os resultados, trocou-se esta faixa na última geração, descartando concentrações consideradas inadequadas.

Comparando-se os resultados com as duas fontes de carbono, verifica-se que os melhores resultados de atividade enzimática e biomassa foram obtidos com glicerol. Depois de 12 horas de indução, foi possível identificar meios de cultivo com 110

$U_{NIPAB/L}$ e $DO_{620\text{ nm}}=7$. Estes resultados são maiores do que os melhores resultados atingidos com glicose, cujos melhores valores de atividade enzimática e $DO_{620\text{ nm}}$ foram, respectivamente, $76 U_{NIPAB/L}$ e 4.8.

A glicose é uma fonte de carbono facilmente assimilada pelas bactérias, oferecendo elevada velocidade específica máxima de crescimento. No entanto, a célula pode direcionar seu metabolismo para a formação de metabólitos indesejados, que podem causar a inibição do crescimento e produção de proteína. O acetato, conhecido por ser o principal inibidor do crescimento e síntese proteica (KLEMAN; STROHL, 1994; LEE, 1996; LULI; STROHL, 1990), é formado quando o fluxo de carbono na via metabólica central supera a demanda da biossíntese e da capacidade de geração de energia dentro da célula (LEE, 1996).

Na tabela 6.5 são apresentadas as composições da melhor combinação de concentrações para os cultivos realizados com glicose e com glicerol.

Tabela 6.5 Composição dos melhores meios escolhidos para a produção de PGA recombinante em *B. megaterium* PV 361. Concentrações em g/L.

Meio	MgCl ₂	MnCl ₂	FeSO ₄	CaCl ₂	NH ₄ Cl	K ₂ HPO ₄	H ₃ BO ₃	CuSO ₄	ZnSO ₄	Na ₂ MoO ₄	CoCl ₂	KCl
MOPSO pH 7 (controle)	0,1	0,01979	0,0139	0,2775	2	0,23	2,473E-5	2,497E-06	2,875E-6	3,708E-6	7,137E-6	0,7455
Meio A Glicose	0,563	0,1595	0,0778	0,5	3,21	0,101	1,59E-4	4,01E-05	7,47E-06	2,12E-05	2,58E-05	1,537
Meio B Glicerol	0,298	0,0815	0,0123	0,28	1,97	0,23	2,01E-4	2,19E-05	7,48E-06	3,54E-05	6,91E-05	6,038

Fonte: Elaboração própria

Apresenta-se aqui, separadamente, uma análise da influência da concentração dos diferentes sais na produção de PGA. O reagente CaCl₂ é citado com frequência na literatura como sendo composto chave para a otimização da produção de PGA por diferentes hospedeiros (IGNATOVA et al., 2003; STEPHENSON et al., 1998; YANG et al., 2006). O cálcio está presente em esporos de bactérias e é cofator da α -amilase e de algumas proteases. Geralmente, ele é transportado para o exterior da célula, podendo

ter um papel importante na estrutura de proteínas da parede celular e em polímeros extracelulares.

Relacionando os experimentos com as concentrações de CaCl_2 , observa-se uma grande convergência dos experimentos com melhores resultados para uma faixa entre 0.2-0.5 g/L de CaCl_2 . Segundo (YANG, 2007) altas concentrações de CaCl_2 podem afetar o crescimento celular e portanto, somente concentrações moderadas são adequadas.

No que diz respeito ao reagente MgCl_2 , este foi selecionado dada a sua importância no crescimento celular e pelos bons resultados relatados por David *et al.* (2011), no processo de produção/secreção. O magnésio é um íon necessário para bactérias e fungos pois seus ribossomos necessitam dessa molécula. Ele também atua como cofator enzimático e está presente em paredes e membranas celulares. Para a produção da enzima, os resultados convergiram para concentrações mais baixas em relação ao controle.

Segundo Petit-Glatron *et al.* (1993), o Fe^{3+} possui um efeito positivo na secreção de proteínas em *B. subtilis*. Entretanto, neste estudo, verificou-se o efeito contrário. A grande tendência foi de diminuição da concentração de Fe nos meios de cultura utilizados, conforme apresentado nas figuras 6.4(a) e (b). Na prática, quando estes cultivos foram realizados, observou-se precipitação quando grandes concentrações de Fe foram adicionadas.

Existem elementos traços necessários por todas as bactérias e fungos (Mn, Zn, Fe). O ferro está presente nos citocromos e nas ferredoxinas, sendo que seus três íons são cofatores enzimáticos. O ferro e o manganês são elementos traço importantes na regulação do metabolismo secundário e na excreção de metabólitos primários. À medida que as gerações foram se sucedendo, o problema da precipitação foi eliminado, justamente por que foram eliminadas aquelas gerações que possuíam altas concentrações de Fe.

Nesta otimização dos meios de cultivo, selecionou-se o NH_4Cl como fonte de nitrogênio, observando-se uma tendência à diminuição deste reagente. À medida que a concentração de NH_4Cl é diminuída, aumenta-se a produção da enzima recombinante. O problema dessa fonte está na diminuição do pH do meio durante a fermentação com

íons amônio, uma vez que o sistema de transporte do íon para dentro da célula envolve a antitransporte de íons hidrogênio para fora da célula (MOO-YOUNG, 2011).

No trabalho de DAVID *et al.*, (2011) o autor conclui que baixas concentrações de Co favorecem a produção dos fragmentos de anticorpos produzidos por *B. megaterium* recombinante, independentemente da troca de outros reagentes durante a otimização do meio de cultura. Porém neste trabalho, a tendência observado foi a oposta: a maior concentração de CoCl_2 , na faixa estudada, aumentou a produção de PGA recombinante e biomassa.

Com a otimização destes meios de cultura, com glicerol e glicose como fontes de carbono, e escolhendo os melhores meios para cada fonte de carbono, foi feito um estudo em frascos agitados para um melhor acompanhamento do crescimento celular e da atividade enzimática, já que o fornecimento de oxigênio em frascos agitados é melhor do que em placas de 96 poços.

6.2.2 Cultivos nos meios selecionados conduzidos em frascos agitados e biorreator de 1 L

A partir dos resultados obtidos através do algoritmo genético foram definidas as composições dos melhores meios de cultivo, denominados meio A e no meio B, descritos na tabela 6.6.

Tabela 6.6 - Composição dos meios utilizados para escalonamento da condição escolhida através do algoritmo genético.

Componente (g/L)	Meio A (glicose)			Meio B (glicerol)		
	Placas de 96 poços (g/L)	Frascos agitados (g/L)	Biorreator (g/L)	Placas de 96 poços (g/L)	Frascos agitados (g/L)	Biorreator (g/L)
MgCl ₂ ·6H ₂ O		0,563			0,298	
MnCl ₂ ·4H ₂ O		0,1595			0,0815	
FeSO ₄ ·7H ₂ O		0,0778			0,0123	
CaCl ₂		0,5			0,28	
NH ₄ Cl		3,21			1,97	
K ₂ HPO ₄		0,101			0,23	
H ₃ BO ₃		1,59E-4			2,01E-4	
CuSO ₄		4,01E-5			2,19E-5	
ZnSO ₄		7,47E-6			7,48E-6	
Na ₂ MoO ₄		2,12E-5			3,54E-5	
CoCl ₂		2,58E-5			6,91E-5	
KCl		1,537			6,038	
NaCl		0,745			0,745	
K ₂ SO ₄		0,048			0,048	
MOPS pH 7		12,36			12,36	
Fonte de carbono	4	5	15	4	5	15
Antiespumante	--	--	1 mL/L	--	--	1 mL/L
Tetraciclina	10 µg/mL					

Fonte: Elaboração própria

Os meios A e B selecionados foram então empregados em cultivos realizados em frascos agitados e biorreator de 1 L.

Na tabela 6.7 são apresentados os resultados dos cultivos conduzidos com o meio A, contendo glicose como fonte de carbono, para as diferentes condições de cultivo estudadas. Para comparação, foram também incluídos os resultados obtidos com o meio MOPS e o meio LB.

Tabela 6.7 - Crescimento e produção de PGA recombinante obtidos com diferentes meios de cultivo com glicose como substrato após 12 horas de indução e com 5 g/L de xilose adicionada na metade da fase exponencial.

Meio de cultivo	Condição	μ_{\max} (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (gms/gFC)	DO final (600 nm)	Atividade específica (U _{NIPAB} /gms)	Atividade volumétrica (U _{NIPAB} /L)
Meio A	P _{glic}	0,39±0,03	--	4,8±0,2	46,4±0,3	76±5
	FA _{glic}	0,41±0,06	0,48±0,03	6,1±0,4	571±5	1200±80
	C1	0,45±0,04	0,73±0,09	17,4±1,2	98±4	588±20
MOPS	P _{glic}	0,35±0,03	--	3,3±0,5	4,3±0,2	4,9±0,1
	FA _{glic}	0,35±0,06	0,42±0,04	4,0±1,2	13,1±0,4	18±2
	C2	0,39±0,05	0,56±0,07	12,0±2,0	24±2	100±4
LB	FA _{glic}	0,43±0,07	0,49±0,04	12,4±2,1	270±5	1150±100
	C3	0,48±0,03	0,77±0,03	25,3±1,2	287±16	2500±140

Onde:

P_{glic}: Placas de 96 poços com 4 g/L de glicose

FA_{glic}: Frascos agitados com 5 g/L de glicose

C1-C3: Batelada em biorreator de 1 L com 15 g/L de glicose.

Fonte: Elaboração própria.

Como pode ser observado na tabela 6.7, os cultivos realizados com o meio A (meio desenvolvido a partir do algoritmo genético usando glicose como fonte de carbono) apresentaram melhores resultados com relação ao meio padrão (MOPS) e resultados ligeiramente inferiores quando comparados aos obtidos com o meio LB.

É importante determinar a capacidade de escalonamento dos resultados das placas de 96 poços com o objetivo de explorar os resultados obtidos. Se os resultados gerados em placas de 96 poços são similares com os obtidos a partir de frascos agitados, é possível escalonar os dados gerados a partir do “screening” das placas (KENSY; ENGELBRECHT; BÜCHS, 2009). Os valores de μ_{\max} apresentados na tabela 6.7, obtidos nos experimentos de 96 poços e frascos agitados são similares validando, assim, o escalonamento. Já foram publicados trabalhos realizando o escalonamento de *E. coli* e *H. polymorpha*, obtendo resultados similares entre os experimentos em placas de 96 poços e frascos agitados (KENSY; ENGELBRECHT; BÜCHS, 2009). Neste trabalho foram apresentados resultados similares na cinética de crescimento e produção de proteína fluorescente verde.

Os valores de $Y_{x/s}$ só foram apresentados para os experimentos em frascos agitados e biorreator, já que não foi possível quantificar o substrato nos experimentos em placas. Em todos os casos estudados, observou-se que os valores obtidos de $Y_{x/s}$ são

maiores para os cultivos em biorreator, sendo que o $Y_{x/s}$ em C1 foi 1,3 vezes maior do que em C2 e muito similar ao obtido em C3. Esse resultado já era esperado tendo em vista que nos cultivos em frascos agitados o crescimento está sujeito à limitação por oxigênio, o que não ocorre em cultivos em biorreator.

No caso da DO, era esperado que os resultados em frascos agitados fossem similares aos dos poços já que a concentração de glicose é semelhante. Também como esperado, a DO observado nos cultivos em biorreator é significativamente superior à alcançada nos frascos agitados. Em relação ao desempenho dos diferentes meios de cultivo nos ensaios em biorreator, a DO de C1 é 1,5 vezes menor com relação ao C3 e 1,4 vezes maior quando comparada com a do C2. Estes resultados mostram que o meio definido A, possui sais e componentes que melhoram o crescimento de *Bacillus megaterium* recombinante, mas que ainda é deficiente em alguns nutrientes para obter um crescimento celular mais elevado (maior μ_{max} e $Y_{x/s}$) com a mesma quantidade de substrato, atingindo valores maiores ou iguais aos obtidos no meio LB.

Com relação à atividade enzimática, observou-se melhores resultados nos experimentos em frascos agitados do que em placas de 96 poços. O meio A mostrou-se bastante eficiente, já que todos os resultados foram superiores aos obtidos no meio MOPS (meio padrão). Em frascos agitados, foram obtidos resultados similares ao utilizar o meio A e o LB, resultado que não se reproduziu em biorreator, obtendo níveis de atividade enzimática 4,2 vezes inferiores de C1 se comparados a C3. Porém, os resultados de C1 foram 5,8 vezes superiores em relação a C2, o que comprova a importância dos sais e metais para a produção de PGA.

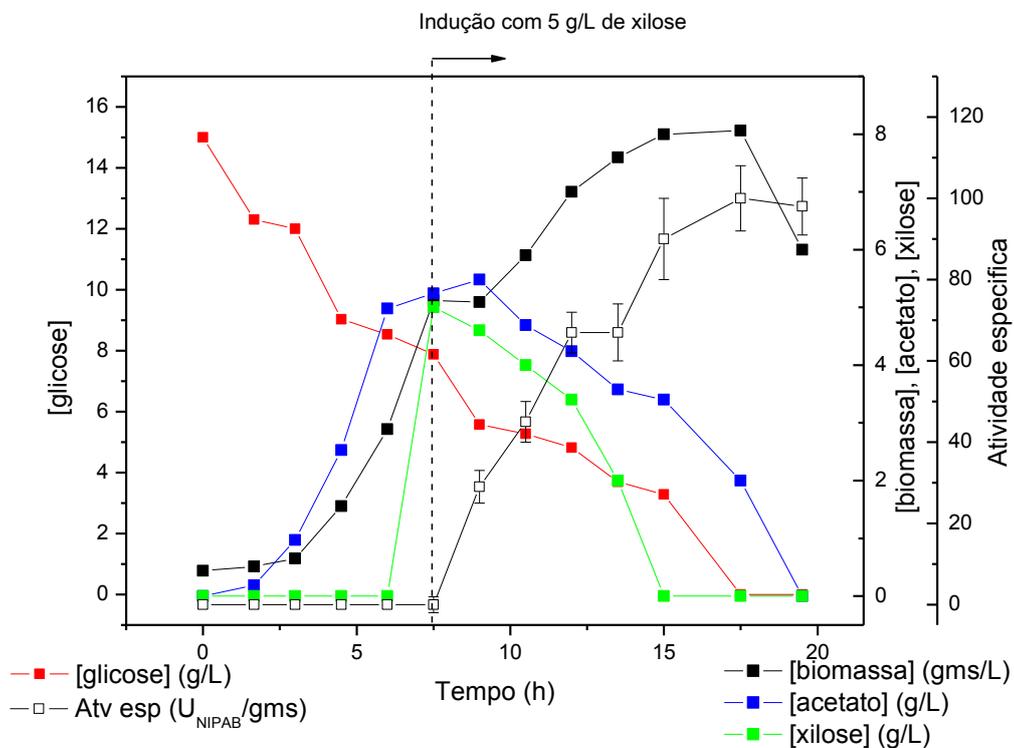
Na figura 6.5 é apresentado o cultivo em biorreator C1, onde se nota a baixa atividade enzimática obtida após 12 horas de indução, resultado também apresentado na tabela 6.7. Em 8 horas de cultivo, observou-se uma elevada produção de acetato, atingindo uma concentração de 5,4 g/L. Este acúmulo pode ser a explicação para a baixa concentração celular e atividade enzimática observadas em C1.

Após aproximadamente 7,5 horas de cultivo, na metade da fase exponencial de crescimento ($\mu_{max}=0,45 \text{ h}^{-1}$), foi realizada a indução, com adição de 5 g/L de xilose, mudando totalmente o comportamento do crescimento celular. O promotor P_{XylA} é desreprimido e a produção de PGA recombinante é induzida (YANG et al., 2006).

Durante a primeira hora de indução observou-se uma diminuição do crescimento celular à medida que a produção da enzima se iniciava. Após a indução, o acetato começou a ser consumido pelas células até ser totalmente eliminado no final do experimento.

Ao longo da fase de indução também é consumido o indutor, sendo exaurido após 7,5 horas de indução. A maior atividade enzimática deste cultivo foi obtida após 10 horas de indução, alcançando 806 U_{NIPAB}/L . O oxigênio dissolvido foi mantido em 30% da saturação durante todo o experimento, sendo uma ótima condição de aeração que não é obtida em frascos agitados e mesmo assim a atividade enzimática obtida neste cultivo foi 1,5 vezes inferior com respeito ao atingido em frascos agitados, obtendo uma atividade específica 5,7 vezes inferior. Este baixo resultado pode ser explicado pela limitação da síntese da enzima devido ao esgotamento de alguns sais presentes do meio A, uma vez que foi este foi desenvolvido para uma concentração de fonte de carbono de 5 g/L e o experimento foi realizado com uma concentração 5 vezes maior.

Figura 6.5 - Cultivo em biorreator de 1 L com meio A, indução com 5 g/L de xilose na metade da fase exponencial e 12 horas de indução.



Fonte: Elaboração própria.

Na tabela 6.8 são mostrados os resultados de escalonamento do meio B. Nestes experimentos, os valores de μ_{\max} para os experimentos em 96 poços e em frascos agitados são similares e validam o experimento, sendo que o único resultado diferente é o do cultivo em meio MOPS que, em frascos agitados, é 1,24 vezes superior.

Como esperado, devido à melhor condição de aeração, os resultados de $Y_{x/s}$ são maiores para os cultivos em biorreator, onde o C4 destacou-se, sendo 1,71 vezes maior que o de C5 e 1,2 vezes maior que o de C6.

Comparando a DO obtida em cada cultivo em biorreator, observa-se que a DO de C4 foi 2,8 vezes maior com respeito ao C5 porém, C6 foi 1,9 vezes maior que a de C4. Estes resultados mostram que o meio definido B, possui sais e componentes que melhoram o crescimento de *Bacillus megaterium* recombinante, mas ainda é deficiente em alguns nutrientes para obter um crescimento celular mais alto (maior μ_{\max} e $Y_{x/s}$), semelhante ao que ocorreu com o meio A.

Na tabela 6.8, pode-se observar que houve uma maior atividade enzimática no experimento em frascos agitados do que no realizado em placas de 96 poços, resultado também observado nos experimentos com glicose.

Em termos de atividade enzimática, os resultados obtidos com o meio B foram superiores quando comparado com o meio MOPS. Em frascos agitados, obtiveram-se medidas de atividade enzimática muito similares no meio B com respeito ao meio LB, resultado que não foi reprodutível no biorreator, assim como observado nos experimentos com o meio A, obtendo níveis de atividade enzimática 4,6 vezes inferiores de C4 com respeito ao C6. Novamente, atribui-se esse resultado ao esgotamento de componentes chave do meio, que está balanceado para uma concentração menor de fonte de carbono. Os resultados de C4 são 1,5 vezes superiores com relação ao C1, sugerindo o glicerol como melhor fonte de carbono para a produção de PGA.

Tabela 6.8 - Resultados cinéticos e produção de PGA recombinante com meios de cultivo com glicerol como substrato após 12 horas de indução com 5 g/L de xilose na metade da fase exponencial.

Meio de cultivo	Condição	μ_{\max} (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (gms/g)	DO final (600 nm)	Atividade específica (U _{NIPAB} /gms)	Atividade volumétrica (U _{NIPAB} /L)
Meio B	P _{gliol}	0,38±0,02	--	7,2±0,1	44,4±0,2	110±9
	FA _{gliol}	0,40±0,05	0,45±0,06	8,5±0,2	512±10	1500±100
	C4	0,43±0,04	1,01±0,04	25,3±2,1	100±5	870±40
MOPS	P _{gliol}	0,29±0,09	--	3,5±0,5	8,3±0,4	10±2
	FA _{gliol}	0,36±0,04	0,39±0,09	4,0±0,3	43,6±0,2	60±7
	C5	0,40±0,07	0,59±0,05	9,0±0,4	130,0±0,4	400±17
LB	FA _{gliol}	0,62±0,05	0,61±0,01	12±1	339±20	1400±200
	C6	0,64±0,07	0,84±0,08	48±6	242±5	4000±300

Onde:

P_{gliol}: Placas de 96 poços com 4 g/L de glicerol

FA_{gliol}: Frascos agitados com 5 g/L de glicerol

C4-C6: Batelada em biorreator de 1 L com 15 g/L de glicerol

Fonte: Elaboração própria.

Na figura 6.6 é apresentado o cultivo em biorreator C4. Ao longo das primeiras 12 horas de cultivo, houve produção de acetato, atingindo concentrações de 1,9 g/L, resultado, este, 3 vezes menor do que no C1. Uma vantagem particular do glicerol é o baixo nível de “overflow” que leva à formação de metabólitos inibidores provavelmente pelo estado reduzido do substrato, os triacilgliceróis, como o glicerol, encontram-se num estado mais reduzido que os carboidratos (que possuem diversos átomos de oxigénio). Assim, ao fazer-se a oxidação destes compostos, obtém-se mais do dobro da energia a partir de triacilgliceróis que de polissacarídeos, por grama de composto (MALAVIYA; JANG; LEE, 2012).

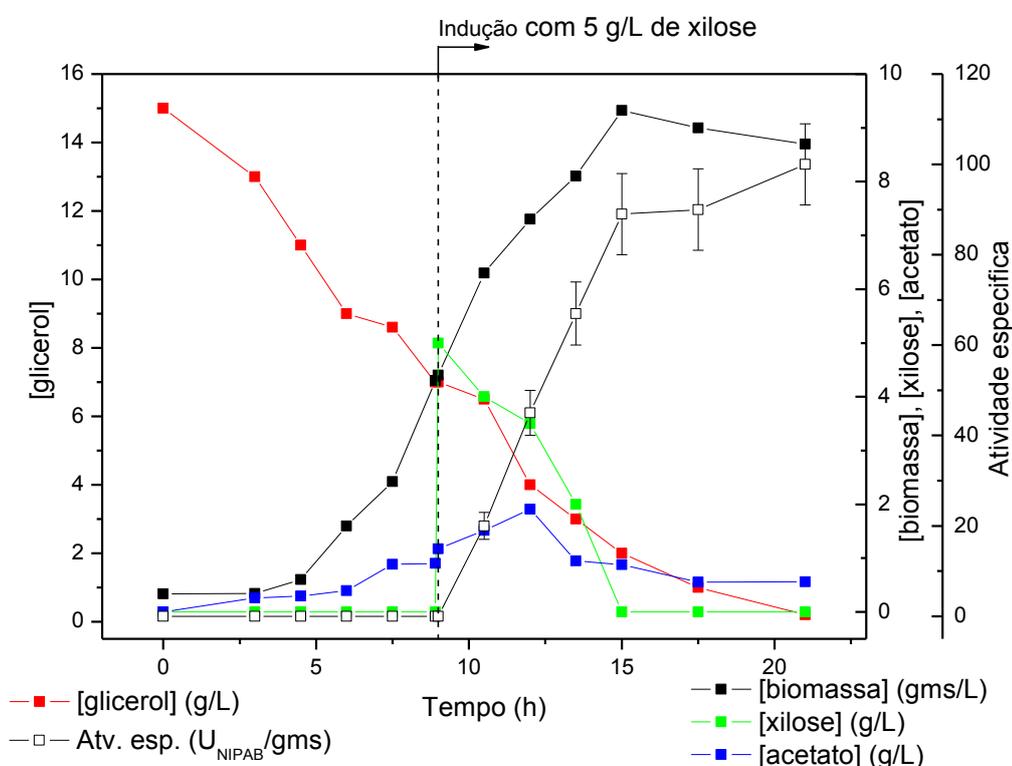
Após aproximadamente 9 horas de cultivo, quando foi obtida uma alta concentração celular com $\mu_{\max}=0,43$ h⁻¹, foi realizada a indução na metade da fase exponencial, também por meio da adição de pulso de xilose para obter uma concentração de 5 g/L no reator.

O crescimento celular não foi afetado após a indução, como observado no cultivo C1, atingindo uma DO máxima de 9,32 gms/L. A xilose também foi consumida no cultivo, sendo totalmente esgotada após 6 horas de indução; depois deste período a enzima de interesse continuou sendo produzida mas numa taxa de produção menor,

sendo que a atividade específica aumentou apenas 41 $U_{\text{nipab}}/\text{gms}$ depois que todo o indutor foi consumido (passando de 838 a 879 $U_{\text{nipab}}/\text{gms}$).

No experimento C4, com glicerol como fonte de carbono, também foi observado o mesmo problema do C1, onde a atividade enzimática específica foi menor do que a obtida em frascos agitados. A hipótese segue sendo a possível falta de nutrientes para a máxima produção da enzima em biorreator.

Figura 6.6 - Cultivo em biorreator de 1 L com meio B, indução com 5 g/L de xilose na metade da fase exponencial e 12 horas de indução.

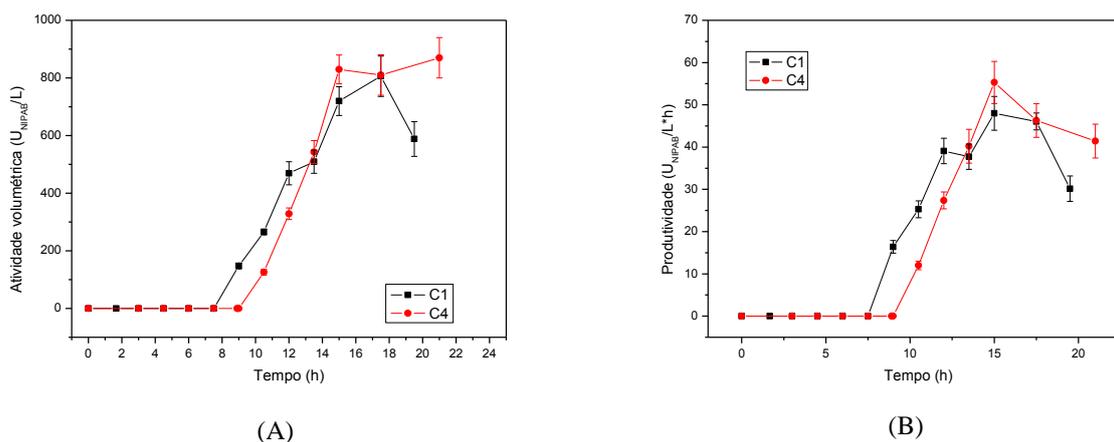


Fonte: Elaboração própria.

Com o intuito de melhorar a produtividade nos meios sintéticos, Yang, (2007), realizou um estudo sistemático em placas de 96 poços, testando diferentes grupos de aminoácidos. Neste trabalho, a atividade específica foi melhorada adicionando, no meio de cultivo, todos os aminoácidos excluindo-se: fenilalanina, tirosina e triptofano, já que são usualmente produzidos a partir da via pentose-fosfato.

Na figura 6.7, os meios A (com glicose) e B (com glicerol) são comparados com o objetivo de escolher um destes meios para dar continuidade ao estudo da influência das fontes de nitrogênio.

Figura 6.7 - Comparação dos cultivos C1 (com glicose como fonte de carbono) e C4 (com glicerol como fonte de carbono). (a) Atividade volumétrica (b) Produtividade.



Fonte: Elaboração própria.

Como pode ser observado na figura 6.7 (a), a atividade volumétrica dos dois ensaios variou apenas 1,09 vezes, obtendo 806 U_{NIPAB}/L com glicose como fonte de carbono e 870 U_{NIPAB}/L com glicerol. Na figura 6.7 (b) nota-se que o melhor resultado alcançado, em termos de produtividade, foi com o glicerol após 15 horas de cultivo. A partir dessa constatação e levando em consideração a baixa produção de acetato, selecionou-se o glicerol como fonte de carbono para os futuros experimentos.

Nos cultivos C1-C6 com *Bacillus megaterium* PV 361 é observado o consumo do indutor como fonte de carbono, este resultado depende muito da linhagem. Yang, (2007) realiza um estudo de indução com xilose após consumo de glicose como fonte de carbono em várias linhagens de *B. megaterium* recombinante. As linhagens MS941 e WH320 apresentam consumo de xilose, entrando numa segunda fase exponencial após o pulso deste indutor, porém as linhagens YYBm1 e WH323 morreram na presença da xilose, mostrando que não conseguem consumir xilose como fonte de carbono.

6.2.3 Cultivos em biorreator de 5 L com meio B

A partir dos resultados obtidos com os cultivos C1-C6, foram realizados dois cultivos com o objetivo de produzir PGA recombinante com dois meios: Meio definido (meio B) e meio complexo (meio B + fonte de nitrogênio complexa), o qual foi escolhido após estudos com diferentes suplementos conduzidos em frascos agitados.

Devido à falta de nutrientes detectada nos cultivos C1 e C4, foi realizado um estudo em frascos agitados para a suplementação de biotina como nutriente. Vários autores já analisaram a necessidade de vitaminas como suplemento no meio de cultivo (DAVID et al., 2010, 2011; KORNELI et al., 2012, 2013). Korneli *et al* (2013) reportam um aumento de 30% na produção da proteína verde fluorescente adicionando 100 µg/L de biotina.

Na tabela 6.9 são reportados os resultados dos cultivos em frascos agitados, que antecederam o cultivo em biorreator de 5 L. Como é observado nos resultados com e sem biotina, a DO obtida foi 1,08 vezes maior no experimento com 100 µg/L de biotina e a atividade enzimática foi 1,6 vezes maior que o resultado com o experimento controle, levando a um aumento de 60% da atividade enzimática. Em termos de atividade específica, também é observado um aumento de 1,7 vezes em relação ao experimento controle.

Com estes resultados em frascos agitados com meio B e 100 µg/L de biotina, foi realizado o experimento em biorreator de 5 L (C7). Para este experimento aplicou-se pulsos de xilose e glicerol (ver a composição na tabela 6.10) de 150 mL para induzir a produção de PGA recombinante e fornecer glicerol como fonte de carbono, assim que todo o glicerol, presente no meio inicial, fosse consumido pelas células.

Escolheu-se a estratégia de múltiplos pulsos com o intuito de evitar que a concentração de glicerol excedesse 50 g/L, já que concentrações acima desse valor podem inibir o crescimento celular (KORNELI et al., 2013).

Tabela 6.9 - Resumo dos resultados da comparação do meio B com e sem biotina para a produção de PGA recombinante em frascos agitados e biorreator de 5 L com glicerol como fonte de carbono, usando o meio B e 100 µg/L de biotina. Cultivos induzidos na metade da fase exponencial com 5 g/L de xilose, com 12 horas de indução.

Condição	μ_{\max}	$Y_{x/s}$	DO	Atividade específica (U _{NIPAB} /gms)	Atividade específica (U _{NIPAB} /mg proteína)	Atividade volumétrica (U _{NIPAB} /L)
FA (controle)	0,40±0,05	0,45±0,06	8,5	512	2,23	1500
FA (com 100 µg/L de biotina)	0,61±0,11	0,69±0,09	9,2	882	2,67	2400
C7 (com 100 µg/L de biotina)	0,75±0,09	0,62±0,06	87,2	120	2,42	3000

Onde:

FA: Frascos Agitados com 5 g/L de glicerol.

C7: Cultivo em biorreator de 5 L com meio definido e 20 g/L de glicerol.

Fonte: Elaboração própria.

Na tabela 6.10 é descrita a composição dos pulsos realizados durante o cultivo C7. Não há grandes diferenças na composição do pulso e do meio de cultivo, apenas optou-se por dobrar a concentração de CaCl₂, já que é um íon que ajuda na secreção das proteínas recombinantes (YANG et al., 2006) e da biotina, devido aos ótimos resultados obtidos em frascos agitados.

Como pode ser observado na tabela 6.9, o cultivo C7 alcançou elevado valor de DO, mas a atividade específica do cultivo C7 comparado com o cultivo em frascos agitados foi 7,3 vezes inferior. Era esperado que os resultados, em ambas as condições, fossem semelhantes, porém nos cultivos em biorreator realizados com os meios desenvolvidos a partir do algoritmo genético, houve deficiência de nutrientes, frente ao aumento de 5 para 20 g/L na concentração inicial da fonte de carbono. Entretanto, devido a problemas de precipitação de sais em elevadas concentrações, não foi possível triplicar a concentração desses sais. Os resultados de atividade específica em relação à proteína total para os 3 cultivos, incluindo o C7, são muito similares, ambos com elevadas atividades específicas, o que facilita o processo de purificação.

Tabela 6.10 - Composição do pulso de 150 mL para a realização dos cultivo em biorreator de 5 L com meio definido (C7) e meio complexo (C8).

Componente	C7 Concentração (g/L)	C8 Concentração (g/L)
MgCl ₂ x6H ₂ O	0,298	0,298
MnCl ₂ x4H ₂ O	0,0815	0,0815
FeSO ₄ x7H ₂ O	0,0123	0,0123
CaCl ₂	0,5	0,5
NH ₄ Cl	1,97	1,97
K ₂ HPO ₄	0,23	0,23
H ₃ BO ₃	2,01E-4	2,01E-4
CuSO ₄	2,19E-5	2,19E-5
ZnSO ₄	7,48E-6	7,48E-6
Na ₂ MoO ₄	3,54E-5	3,54E-5
CoCl ₂	6,91E-5	6,91E-5
KCl	6,038	6,038
NaCl	0,745	0,745
K ₂ SO ₄	0,048	0,048
Glicerol	533	533
Xilose	133	133
Biotina	2,7 mg/L	2,7 m/L
Fonte de nitrogênio complexa	---	90
Tetraciclina	10 mg/L	10 mg/L

Fonte: Elaboração própria.

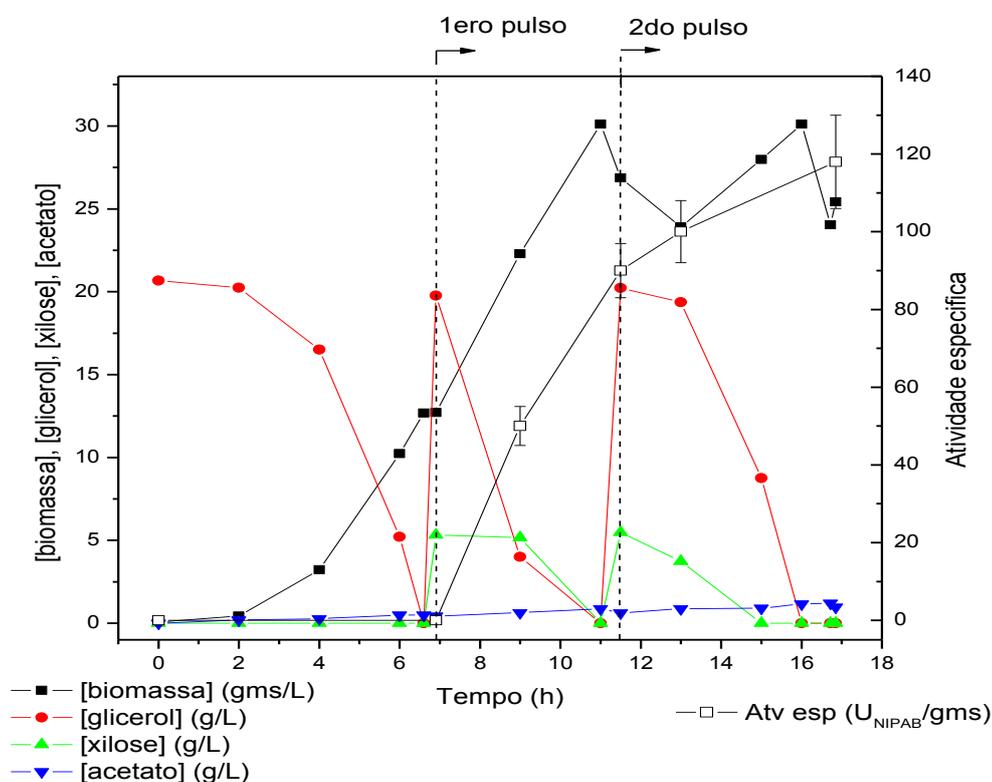
Na figura 6.8 são mostrados os resultados do cultivo C7. Neste cultivo todo o glicerol inicialmente presente foi consumido após 6,5 horas de batelada, levando a um μ_{\max} de 0,73 h⁻¹ e uma concentração celular de 12,5 gms/L. Em seguida realizou-se o primeiro pulso onde, apesar da indução com 5 g/L de xilose, as células continuaram crescendo até atingir uma concentração celular próxima de 30 gms/L em 11 horas de cultivo. A xilose passou a ser consumida após 9 horas de cultivo, sendo totalmente esgotada em 11 horas, momento em que outro pulso foi realizado, quando se observou uma queda da concentração celular, talvez devido à falta de fonte de carbono, já que em 11 horas todo o glicerol e xilose já haviam sido consumidos.

Depois do segundo pulso, observa-se uma queda na concentração celular até 25 gms/L em 13 horas, que pode ser explicada pela diluição do meio causada pelo volume adicionado com os pulsos. Observa-se, em seguida, consumo intenso de glicerol 4 horas depois do segundo pulso, com 15 horas de cultivo, quando a concentração celular chega a 28 gms/L. Em 16 horas de cultivo, obteve-se 30 gms/L e depois deste ponto só se observa diminuição na concentração celular até às 17 horas de cultivo devido ao

esgotamento dos substratos, quando o experimento é encerrado. Note-se que durante todo o experimento, a concentração de acetato é muito baixa, em torno de 1 g/L, devido ao uso do glicerol como fonte de carbono, como já foi discutido no cultivo C4.

Com respeito à atividade específica, foi observado um grande aumento com o primeiro pulso, mas após o segundo pulso o aumento foi de apenas 33%, passando de 90 U_{NIPAB}/gms para 120 U_{NIPAB}/gms no tempo final de cultivo. Mais uma vez, esse comportamento reforça que a produção da enzima depende tanto do fornecimento do indutor como da disponibilidade de componentes chave.

Figura 6.8 - Cultivo C7 com meio B, 20 g/L de glicerol e pulsos com glicerol e xilose, após batelada com 12 horas de indução.



Fonte: Elaboração própria.

Considerando a boa produção de enzima nos experimentos realizados com o meio LB, decidiu-se realizar um novo estudo em frascos agitados utilizando o meio B com 5 g/L de glicerol, suplementado com 5 g/L de diferentes fontes de aminoácidos, relatadas na tabela 6.11.

Foram testados alguns suplementos para meio de cultivo como: caseína hidrolisada, extrato de levedura e triptona Oxoid. Como já foi comentado, *Bacillus megaterium* é fortemente susceptível à variação da fonte de aminoácidos (Yang, 2007), sendo importante escolher um suplemento que favoreça o aumento da produção da proteína recombinante.

Tabela 6.11 - Estudo da fonte de aminoácidos em frascos agitados usando o meio B com 5 g/L de glicerol e 5 g/L de NH₄Cl como padrão e C8.

Fonte de nitrogênio complexa	μ_{\max}	$Y_{x/s}$	[acetato] (g/L)	DO _{final}	Atividade volumétrica (U _{NIPAB} /L)	Atividade específica (U _{NIPAB} /gms)
NH ₄ Cl (Controle)	0,40±0,02	0,44±0,01	0,9	5	1500	872
Caseína hidrolisada	0,56±0,04	0,59±0,05	3,2	12,5	5480	1274
Extrato de levedura	0,61±0,03	0,57±0,02	1,1	13,4	4200	911
Triptona Oxoid	0,62±0,06	0,68±0,03	2,6	10	5400	1570
Triptona Oxoid +100 µg/L biotina	0,64±0,04	0,67±0,04	2,5	12	6000	1454
C8	0,83±0,02	0,66±0,02	0,4	104,56	48000	1334

Fonte: Elaboração própria.

A partir destes resultados, observa-se uma melhora nos valores de atividade enzimática e DO para todos os cultivos suplementados com nutrientes complexos. O controle, que é o meio B com 5 g/L de NH₄Cl, é inferior no mínimo 2 vezes a qualquer um dos resultados obtidos com as fontes de aminoácidos estudadas. Os resultados de atividade enzimática também foram afetados positivamente, obtendo-se os melhores resultados com triptona Oxoid. Esta triptona já foi testada e utilizada por Yang *et al* (2006), mostrando bons resultados de atividade enzimática quando o ensaio foi comparado com a triptona Bacto.

Também foram mensuradas as concentrações de metabólitos no final destes experimentos. Constatou-se uma maior produção de acetato quando utilizado a caseína

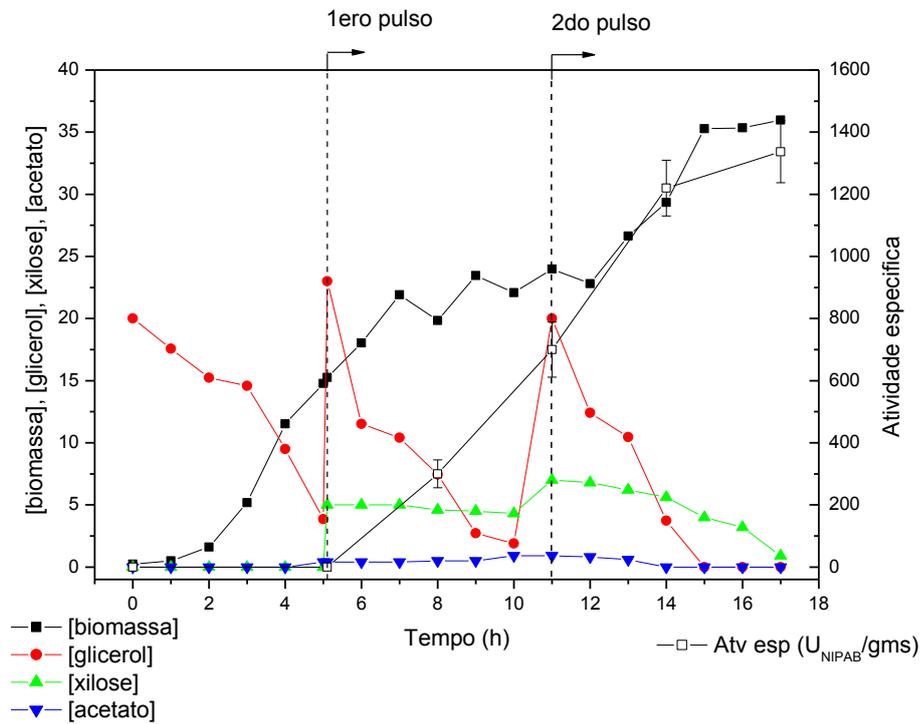
hidrolisada e uma menor produção ao utilizar extrato de levedura, com valores similares aos obtidos no controle. A produção de metabólitos em frascos agitados pode ser explicada devido à limitação por oxigênio que ocorre nestes experimentos.

Diante dos resultados obtidos nos experimentos em frascos agitados para as diferentes fontes de nitrogênio relatados na Tabela 6.11, definiu-se a triptona como a nutriente a ser incorporado no meio B, juntamente com a biotina. Essa nova formulação de meio foi utilizada no cultivo em biorreator C8, cujos principais resultados são mostrados na Figura 6.9 e também na Tabela 6.11. Neste experimento o μ_{\max} atingiu $0,83 \text{ h}^{-1}$, valor superior ao alcançado nos cultivos C1-C7. Todo o glicerol foi consumido com 5 horas de cultivo, sendo realizado o primeiro pulso de glicerol e xilose com composição reportada na tabela 6.10. O crescimento foi exponencial até 7 horas de cultivo, quando a formação de biomassa se estabilizou por 4 horas, provavelmente devido à limitação por algum nutriente. Com 10 horas de cultivo, o glicerol foi praticamente esgotado ($3,85 \text{ g/L}$), sendo realizado o segundo pulso de glicerol+nutrientes com 11 horas. Após este pulso, atingiu-se uma segunda fase exponencial até 15 horas, quando a concentração celular chegou a 35 gms/L , permanecendo estável até o final do cultivo com 17 horas.

Diferentemente do observado no C7, neste cultivo a xilose foi consumida mais lentamente e a produção de acetato foi praticamente nula ($0,4 \text{ g/L}$). Este cultivo apresentou um ótimo desempenho, obtendo resultados de biomassa 10 vezes maiores com relação aos obtidos em frascos agitados e 8 vezes maiores com respeito à atividade enzimática volumétrica.

Com respeito à atividade específica, os resultados em frascos agitados e biorreator foram similares, reforçando a importância do fornecimento de aminoácidos para a síntese de PGA pela célula. A atividade específica em função das proteínas totais foi de $4,45 \text{ U}_{\text{NIPAB}}/\text{mg}$ de proteínas, resultado superior ao produzido pelo C7 com meio definido, devido a alta concentração de PGA obtida no cultivo C8.

Figura 6.9 - Cultivo C8 com triptona Oxoid como fonte de aminoácidos, 100 µg/L de biotina, 20 g/L glicerol e indução após batelada, por meio de pulsos .



Fonte: Elaboração própria.

Estes resultados de atividade enzimática e biomassa de C7 e C8 podem ser confrontados com outros cultivos em biorreator de *Bacillus megaterium* ou *Bacillus subtilis* publicados na literatura. Na tabela 6.12 são reunidos os principais resultados dos trabalhos publicados com *Bacillus*, para comparação com os resultados obtidos no presente trabalho.

Tabela 6.12 - Produção de PGA em *Bacillus* recombinantes e *Bacillus megaterium* selvagem em biorreator reportados na literatura.

Hospedeiro	Origem do gene	Condição de operação	Meio de cultivo	Cx (gms/L)	Atividade enzimática (U/L)	Referencia
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC14945	Selvagem	Batelada	Complexo	24	131	(ILLANES et al., 1994)
			Definido	17	114	
<i>Bacillus megaterium</i> UM-cat	<i>Bacillus megaterium</i>	Batelada	LB	--	9060	(PANBAN GRED et al., 2000)
<i>Bacillus subtilis</i> W600 (pMA5)	<i>Alcaligenes faecalis</i>	Batelada alimentada	Amido solúvel	20	1960	(ZHANG et al., 2006)
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC14945	Selvagem	Batelada	Soro de queijo hidrolisado	4	275	(SOUZA, 2007)
<i>Bacillus megaterium</i> YYBm1	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC14945	Batelada	Meio mínimo + aminoácidos	13	1823	(YANG, 2007)
<i>Bacillus megaterium</i> PV 361	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC14945	Batelada com pulsos sequenciais	Sintético (C7)	30	3000	Este trabalho
			Complexo (C8)	36	48000	

Fonte: Adaptado de Yang, 2007 e complementado pelo autor deste trabalho.

Confrontando os resultados deste estudo com os da literatura, observa-se que a atividade volumétrica do C7 obtida com meio sintético é 26 vezes maior do que o resultado relatado por Illanes *et al* (1994), com meio sintético e 1,6 vezes maior do que o resultado de Yang (2007). Realizando comparações com os valores obtidos no C8, observa-se que estes resultados são 174 vezes superiores em relação aos resultados obtidos por Souza (2007) com *Bacillus megaterium* selvagem e soro de queijo hidrolisado e 24 vezes superior com relação ao obtido por Zang *et al* (2006) com amido solúvel. Em comparação aos estudos de Pangranbed *et al* (2000), os resultados de atividade volumétrica do cultivo C8 são 5 vezes superiores. Desta forma, pode-se afirmar que a abordagem experimental adotada, iniciada com o *screening* por meios de cultivo utilizando placas com 96 poços, frascos agitados e escalonamento para

biorreator foi bem sucedida, levando ao aumento da concentração celular e da atividade volumétrica.

Só com fins de comparações globais, foi utilizada a equação (3) do capítulo 4 para converter os valores obtidos de unidades de NIPAB para unidades internacionais. A partir desta equação é encontrado que 48000 $U_{\text{NIPAB}}/\text{L}$ é equivalente a 105600 UI/L, obtendo 2933 UI/gms e 6211 UI/L*h da produtividade com 17 horas de cultivo.

6.3 Conclusões

A composição do meio tem um papel fundamental e deve refletir o balanço adequado entre íons e nutrientes para oferecer um ambiente propício para maximizar o crescimento e a secreção da enzima recombinante.

Escolheu-se o glicerol como fonte de carbono, assimilado mais lentamente pela via glicolítica por *Bacillus megaterium*, o que contribui para minimizar a formação de acetato.

Obteve-se uma diminuição da atividade específica pelo escalonamento de frascos agitados para biorreator de 1 L, devido à falta de nutrientes, uma vez que os meios sintéticos foram desenvolvidos para baixas concentrações celulares correspondentes à baixa concentração de fonte de carbono inicialmente presente (~ 4 g/L). A adição de nutrientes como a biotina e de suplementos ricos em aminoácidos, como a triptona, permitiram preservar a atividade específica mesmo com elevadas concentrações celulares, garantindo uma elevada produção volumétrica da enzima.

Com o meio sintético desenvolvido pelo algoritmo genético, contendo glicerol como fonte de carbono e suplementado por biotina e por Triptona obteve-se em cultivo em biorreator produção de PGA em níveis no mínimo 5 vezes superiores aos resultados que já foram publicados por outros autores.

7. CONCLUSÕES

7.1 Conclusões específicas

7.1.1 PGA de *E.coli* por *E.coli* recombinante

O estudo com *E.coli* foi iniciado na etapa de expressão, utilizando microrganismo recombinante doado.

Estudo da influência da temperatura na fase de indução, em frascos agitados, mostrou que a melhor produção de PGA ativa é obtida com $T_{ind}=20^{\circ}\text{C}$. Isso ocorre possivelmente devido a que a menor temperatura evita formação de agregados de uma forma inativa da enzima.

Diferentes estratégias testadas nos cultivos em biorreator, com diferentes meios de auto-indução, sintético e complexo, em batelada alimentada, permitiram atingir altas concentrações celulares e atividades enzimáticas. A utilização de glicerol como fonte de carbono, pulsos de lactose e baixa temperatura na indução, resultaram em concentrações de biomassa finais de 100 gms/L e 120 gms/L, e atividades enzimáticas de 210000 e 80000 UI/L para meios complexo e definido, respectivamente.

7.1.2 PGA de *B. megaterium* por *B. megaterium* recombinante

O estudo com *B. megaterium* partiu do isolamento do gene *pac*, que codifica PGA de *B. megaterium* ATCC14945.

O gene *pac*, juntamente com um gene promotor e outro codificando resistência a antibiótico (para seleção da linhagem clonada), foi então clonado no plasmídeo pLipAhp.

Foram testadas, quanto à estabilidade plasmidial e capacidade produtiva, três linhagens de protoplastos de *B. megaterium* como hospedeiros para expressão de PGA: *B. megaterium* PV 361, QM B1551 e ATCC 14945. PV 361, como QM B1551, mostrou-se estável após 8 cultivos consecutivos, atingindo atividade enzimática de 4173 UI/L de Penicilina G Acilase, resultado 4 vezes superior com respeito a *B. megaterium* selvagem e 2 vezes meios com respeito ao reportado por construções similares na literatura. Essa linhagem foi então selecionada como hospedeira.

Caracterização da enzima mostrou meia vida de 5 minutos a 60°C, 20 min a 50°C, mantém 100% de atividade por 1 h, a pH 10 e por 8 horas, a pH 5. A temperatura e pH de atividade máxima é 37°C e 8,0, respectivamente, com $K_m=8.8 \mu\text{M}$, e manutenção de 100% de atividade, no mínimo, por 5 horas nessas condições.

Foi a seguir realizado estudo para otimização do meio de produção da enzima visando aumento da expressão da enzima. A partir de um estudo sistemático iniciado em placas de 96 poços e depois escalonado para frascos agitados e biorreator de 1 L, selecionou-se fonte de carbono (glicerol), otimizou-se concentrações de sais e definiu-se a adição de suplementos complexos de aminoácidos, que conduziram a aumento na produção da enzima (3 vezes) e de 1,8 vezes na de biomassa.

Cultivos em biorreator de 5 L, com pulsos para desreprimir o promotor P_{xyIA} de *B. megaterium* recombinante, nas condições previamente otimizadas, permitiram atingir o expressivo aumento na produção de PGA recombinante de *B. megaterium* por *B. megaterium* de 105600 UI/L, com 36 gms/L de massa celular.

7.2 Conclusões Gerais

Foi possível, neste trabalho, comparar dois sistemas de expressão de PGA: um intra-celular, por *E.coli*, e um secretado, com *B. megaterium*.

Foram atingidas produtividades de 7800 UI/mL*h e 6211 UI/L*h para *E. coli* e *B. megaterium* respectivamente. Esses resultados, para cada um dos microrganismos, são superiores aos publicados na literatura.

Não foi realizado um estudo comparativo de custos do processo, mas se acredita que para produtividades tão próximas, a seleção do microrganismo deva recair em *B. megaterium*. Com esse microrganismo, não só se evita a etapa de rompimento celular, como se obtém a enzima já concentrada, na ausência de quantidades significativas de proteínas contaminantes, uma vez que a fonte de nitrogênio é triptona. Uma etapa de microfiltração para separação do microrganismo e de ultra/diafiltração em membrana de 10 KDa já são suficientes para se ter a enzima pronta para uso comercial.

8. RECOMENDAÇÕES

- Estudo da purificação dos caldos obtidos a partir do C7 e C8, cultivos de *Bacillus megaterium* recombinante realizados com meio sintético e meio definido.
- Clonagem e expressão de PGA recombinante com cauda histidina para facilitar a purificação da proteína recombinante.
- Clonagem com o gene de PGA de *Alcaligenes faecalis* ou outro tipo de microrganismo termofilo, produtor de uma enzima termoestável, dado que este pode ser vantajoso para processos industriais com altas temperaturas.
- Estudo econômico de ambos processos com *E. coli* e *B. megaterium* recombinante.

9. REFERENCIAS

ABIAN, O. et al. Stabilization of Penicillin G Acylase from *Escherichia coli*: Site-Directed Mutagenesis of the Protein Surface To Increase Multipoint Covalent Attachment. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 2, p. 1249–1251, 2004.

AKKAYA, Ö. et al. Mutations in the translation initiation region of the *pac* gene resulting in increased levels of activity of penicillin G acylase. **World journal of microbiology & biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 2159–64, maio. 2012.

ALKEMA, W. B. L. et al. Kinetics of enzyme acylation and deacylation in the penicillin acylase-catalyzed synthesis of beta-lactam antibiotics. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 18, p. 3675–3683, set. 2003.

ANGARDI, V.; CALIK, P. Beet molasses based exponential feeding strategy for thermostable glucose isomerase production by recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 88, n. 5, p. 845–852, 2013.

AUSUBEL, F. M. **Current Protocols in Molecular Biology**. [s.l.] John Wiley & Sons, 1998.

AYADI, D. Z. et al. Excretory overexpression of *Paenibacillus pabuli* US132 cyclodextrin glucanotransferase (CGTase) in *Escherichia coli*: gene cloning and

- optimization of the culture conditions using experimental design. **Biologia**, v. 66, n. 6, p. 945–953, 2011.
- BABAEIPOUR, V. et al. Over-production of human interferon- γ by HCDC of recombinant Escherichia coli. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 112–117, jan. 2007.
- BALASINGHAM, K. et al. Isolation and kinetics of Penicillin Amidase from Escherichia coli. **Biochimica et biophysica acta**, v. 276, n. 1, p. 250–256, 1972.
- BASKAR, G.; RENGANATHAN, S. Optimization of L-asparaginase production by Aspergillus terreus MTCC 1782 using response surface methodology and artificial neural network-linked genetic algorithm. **Asia-pacific journal of chemical engineering**, v. 7, n. 2, p. 212–220, 2012.
- BEIGI, L.; KARBALAEI-HEIDARI, H. R.; KHARRATI-KOPAEI, M. Optimization of an extracellular zinc-metalloprotease (SVP2) expression in Escherichia coli BL21 (DE3) using response surface methodology. **Protein expression and purification**, v. 84, n. 1, p. 161–6, jul. 2012.
- BIEDENDIECK, R. et al. Plasmid system for the intracellular production and purification of affinity-tagged proteins in Bacillus megaterium. **Biotechnology and bioengineering**, v. 96, n. 3, p. 525–537, 2007.
- BIEDENDIECK, R. et al. Export, purification, and activities of affinity tagged Lactobacillus reuteri levansucrase produced by Bacillus megaterium. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 74, n. 5, p. 1062–73, abr. 2007.
- 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**, v. 72, p. 248–54, 7 maio. 1976.
- BRIGIDI, P. et al. Genetic transformation of intact cells of Bacillus subtilis by electroporation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 67, n. 1–2, p. 135–138, 1990.
- BROSIUS, J.; ERFLE, M.; STORELLA, J. Spacing of the -10 and -35 regions in the tac promoter -e ffect on its invivo activity. **Journal of biological chemistry**, v. 260, n. 6, p. 3539–3541, 1985.
- BROWN, B. J.; CARLTON, B. C. Plasmid-mediated transformation in Bacillus megaterium. **Journal of bacteriology**, v. 142, n. 2, p. 508–512, 1980.
- BRUGGINK, A. et al. Penicillin Acylase in the Industrial Production of Lactam Antibiotics. **Organic process research & development**, v. 2, n. 2, p. 128–133, 1998.
- BUNK, B. et al. Bacillus Megaterium and Other Bacilli: Industrial Applications. In: **Encyclopedia of Industrial Biotechnology**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc., 2009.
- BURGER, S. et al. Expression of recombinant Clostridium difficile toxin A using the Bacillus megaterium system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 307, n. 3, p. 584–588, ago. 2003.
- BYLUND, F. et al. Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. **Bioprocess Engineering**, v. 18, n. 3, p. 171–180, mar. 1998.
- CABRERA, Z. et al. Asymmetric hydrolysis of dimethyl phenylmalonate by immobilized penicillin G acylase from E. coli. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 997–1000, abr. 2007.

- CAI, G. et al. Cloning, overexpression and characterization of a novel thermostable Penicillin G Acylase from *Achromobacter xylosoxidans*: probing the molecular basis for its high thermostability. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2764–2770, 2004.
- CAINELLI, G. et al. Penicillin G acylase mediated synthesis of the enantiopure (S)-3-amino-azetidin-2-one. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 19, p. 3231–3235, 1997.
- CALIK, P.; LEVENT, H. Effects of pulse feeding of beet molasses on recombinant benzaldehyde lyase production by *Escherichia coli* BL21(DE3). **Applied microbiology and biotechnology**, v. 85, n. 1, p. 65–73, nov. 2009.
- CALLERI, E. et al. Penicillin G Acylase-Based Stationary Phases: Analytical Applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, p. 243–258, 2004.
- CHAMBERT, R.; PETIT-GLATRON, M. F. Anionic polymers of *Bacillus subtilis* cell wall modulate the folding rate of secreted proteins. **FEMS microbiology letters**, v. 179, n. 1, p. 43–7, 1 out. 1999.
- CHANDEL, A. K. et al. The realm of penicillin G acylase in β -lactam antibiotics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, n. 3, p. 199–207, fev. 2008.
- CHEN, C. et al. High-level accumulation of a recombinant antibody fragment in the periplasm of *Escherichia coli* requires a triple-mutant (degP prc spr) host strain. **Biotechnology and bioengineering**, v. 85, n. 5, p. 463–474, mar. 2004.
- CHEN, R. Bacterial expression systems for recombinant protein production: *E. coli* and beyond. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 5, p. 1102–7, 2012.
- CHENG, S. et al. High-level production penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis* in recombinant *Escherichia coli* with optimization of carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 3, p. 326–330, ago. 2007.
- CHENG, T. et al. Expression and purification of penicillin G acylase enzymes from four different micro-organisms, and a comparative evaluation of their synthesis/hydrolysis ratios for cephalixin. **Protein expression and purification**, v. 46, n. 1, p. 107–13, mar. 2006.
- CHOU, C. P. et al. Manipulation of carbon assimilation with respect to expression of the pac gene for improving production of penicillin acylase in *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, v. 69, n. 1, p. 27–38, 26 mar. 1999.
- CHOU, C. P. et al. Genetic manipulation to identify limiting steps and develop strategies for high-level expression of penicillin acylase in *Escherichia coli*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 63, n. 3, p. 263–72, 5 maio. 1999.
- CUI, J.-D. Optimization of medium for phenylalanine ammonia lyase production in *E. coli* using response surface methodology. **Korean journal of chemical engineering**, v. 27, n. 1, p. 174–178, jan. 2010.
- CUTAYAR, J.; POILLON, D. High cell density culture of *E. coli* in a fed-batch system with dissolved oxygen as substrate feed indicator. **Biotechnology letters**, v. 11, n. 3, p. 155–160, 1989.
- DA SILVA, A. J. et al. Cloning, auto-induction expression, and purification of rSpaA swine erysipelas antigen. **Current microbiology**, v. 65, n. 4, p. 369–374, out. 2012.

DA SILVA, A. J. et al. Non-conventional induction strategies for production of subunit swine erysipelas vaccine antigen in rE . coli fed-batch cultures. **Springer Plus (Accepted for publication)**, 2013.

DAGUER, J.-P. et al. Autogenous modulation of the Bacillus subtilis sacB-levB-yveA levansucrase operon by the levB transcript. **Microbiology**, v. 150, n. Pt 11, p. 3669–3679, nov. 2004.

DAI, M. et al. Expression of penicillin G acylase from the cloned pac gene of Escherichia coli ATCC11105. Effects of pacR and temperature. **European journal of biochemistry / FEBS**, v. 268, n. 5, p. 1298–303, mar. 2001.

DAVEY, M. R. et al. Plant protoplasts: status and biotechnological perspectives. **Biotechnology advances**, v. 23, n. 2, p. 131–71, mar. 2005.

DAVID, F. et al. Optimization of antibody fragment production in Bacillus megaterium: the role of metal ions on protein secretion. **Journal of biotechnology**, v. 150, n. 1, p. 115–24, 1 out. 2010.

DAVID, F. et al. Single cell analysis applied to antibody fragment production with Bacillus megaterium: development of advanced physiology and bioprocess state estimation tools. **Microbial cell factories**, v. 10, n. 1, p. 23, jan. 2011.

DAVID, F. et al. Antibody production in Bacillus megaterium: strategies and physiological implications of scaling from microtiter plates to industrial bioreactors. **Biotechnology journal**, v. 6, n. 12, p. 1516–31, dez. 2011.

DE LEÓN-RODRÍGUEZ, A. et al. Production of penicillin acylase by a recombinant Escherichia coli using cheese whey as substrate and inducer. **Biomolecular engineering**, v. 23, n. 6, p. 299–305, dez. 2006.

DEGERING, C. et al. Optimization of Protease Secretion in Bacillus subtilis and Bacillus licheniformis by Screening of Homologous and Heterologous Signal Peptides. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 19, p. 6370–6376, 2010.

DEVINE, K. M. et al. Replication and segregational stability of Bacillus plasmid pBAA1. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 2, p. 1166–72, fev. 1989.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Blucher, 2007. p. 1182

DOIG, S. D. et al. Modelling surface aeration rates in shaken microtitre plates using dimensionless groups. **Chemical Engineering Science**, v. 60, n. 10, p. 2741–2750, maio. 2005.

DUGGLEBY, H. J. et al. Penicillin Acylase has a single aminoacid catalytic center. **Nature**, v. 373, n. 6511, p. 264–268, jan. 1995.

ELANDER, R. P. Industrial production of beta-lactam antibiotics. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 5-6, p. 385–392, jun. 2003.

ELVIN, C. M. et al. Modified bacteriophage lambda promoter vectors for overproduction of proteins in Escherichia coli. **Gene**, v. 3, p. 123–126, 1990.

ENFORS, S. O. et al. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. **Journal of biotechnology**, v. 85, n. 2, p. 175–85, 13 fev. 2001.

ERARSLAN, A.; ERTAN, H. Thermostabilization of penicillin G acylase obtained from a mutant of Escherichia coli ATCC 11105 by bisimidoesters as homobifunctional

cross-linking agents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 7, p. 629–635, jul. 1995.

FADNAVIS, N. W. et al. Efficient chemoenzymatic synthesis of (2S,3S)-3-hydroxyleucine mediated by immobilised penicillin G acylase. **Journal of the chemical society-perkin transactions**, n. 24, p. 3577–3578, 1997.

FLORES, G.; SOBERÓN, X.; OSUNA, J. Production of a fully functional, permuted single-chain penicillin G acylase. **Protein science**, v. 13, p. 1677–1683, 2004.

FORNEY, L. J.; WONG, D. C. L. amidase from *Escherichia coli*. Alteration of the Catalytic Efficiency of Penicillin Amidase from *Escherichia coli*. v. 55, n. 10, 1989.

FOSTER, S. J.; POPHAM, D. L. Structure and synthesis of cell wall, spore cortex, teichoic acids, S-layers, and capsules. In: SONENSHEIN, L.; LOSICK, R.; HOCH, J. A. (Eds.). **Bacillus Subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells**. [s.l.] American Society for Microbiology, 2002.

FÜRCH, T. et al. Effect of different carbon sources on central metabolic fluxes and the recombinant production of a hydrolase from *Thermobifida fusca* in *Bacillus megaterium*. **Journal of biotechnology**, v. 132, n. 4, p. 385–94, 1 dez. 2007.

FURMAN, T. C. et al. Recombinant human insulin-like growth factor-II expressed in *Escherichia coli*. **Bio-technology**, v. 5, n. 10, p. 1047–1051, 1987.

GAMER, M. et al. A T7 RNA polymerase-dependent gene expression system for *Bacillus megaterium*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 82, n. 6, p. 1195–203, abr. 2009.

GANAPATHY, K.; NARAYANA, V.; SUBRAMANYAN, B. **Problem Solving Techniques**. [s.l.] Andhra Pradesh, India., 1998. p. 177–202

GARTNER, D.; GEISSENDORFER, M.; HILLEN, W. Expression of the *Bacillus subtilis* xyl operon is repressed at the level of transcription and is induced by xylose. **journal of bacteriology**, v. 170, n. 7, p. 3102–3109, jul. 1988.

GEDDES, A. M.; KLUGMAN, K. P.; ROLINSON, G. N. Introduction: historical perspective and development of amoxicillin/clavulanate. **International journal of antimicrobial agents**, v. 30 Suppl 2, p. S109–12, dez. 2007.

GEHL, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. **Acta physiologica Scandinavica**, v. 177, n. 4, p. 437–47, abr. 2003.

GINSBURGH C, SPAULDING D, ROBEY G, SHIVAKUMAR AMO, VANGAS R, KATZ L, F. J. **Sporulation promoter spoVG controlled expression of PP42 gene of HIV-1 in Bacillus megaterium**. AAbstract from an International Conference on AIDS, Montreal. **Anais...**1989

GRONENBORN, B. Overproduction of phage lambda repressor under control of the lac promoter of *Escherichia coli*. **Molecular & general genetics : MGG**, v. 148, n. 3, p. 243–50, 17 nov. 1976.

GUZMAN, L. M. et al. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose P-BAD promoter. **Journal of bacteriology**, v. 177, n. 14, p. 4121–4130, jul. 1995.

HALDIMANN, A.; DANIELS, L. L.; WANNER, B. L. Use of new methods for construction of tightly regulated arabinose and rhamnose promoter fusions in studies of

- the Escherichia coli phosphate regulon. **Journal of bacteriology**, v. 180, n. 5, p. 1277–86, mar. 1998.
- HANNIG, G.; MAKRIDES, S. C. Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. February, p. 54–60, 1998.
- HARWOOD, C. R.; CRANENBURGH, R. Bacillus protein secretion: an unfolding story. **Trends in microbiology**, v. 16, n. 2, p. 73–9, fev. 2008.
- HEWITT, L. et al. Structure of a slow processing precursor penicillin acylase from Escherichia coli reveals the linker peptide blocking the active-site cleft. **Journal of molecular biology**, v. 302, n. 4, p. 887–898, 29 set. 2000.
- HOLLAND, J. H. **Adaptation in natural and artificial systems**. First edit ed. Cambridge, MA, USA: University of Michigan Press, 1975.
- HORTA, A. C. L. **Sistema automático de supervisão e controle de cultivos de alta densidade celular de E. coli recombinante**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2011.
- HORTA, A. C. L. et al. Robust artificial intelligence tool for automatic start-up of the supplementary medium feeding in recombinant E. coli cultivations. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 34, n. 7, p. 891–901, set. 2011.
- HORTA, A. C. L. et al. Intensification of high cell-density cultivations of rE. coli for production of S. pneumoniae antigenic surface protein, PspA3, using model-based adaptive control. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 35, n. 8, p. 1269–1280, out. 2012.
- HUANG, C.-J.; LIN, H.; YANG, X. Industrial production of recombinant therapeutics in Escherichia coli and its recent advancements. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 383–99, mar. 2012.
- HUECK, C. J. et al. Cloning, expression and functional analyses of the catabolite control protein CcpA from Bacillus megaterium. **Molecular Microbiology**, v. 16, n. 5, p. 855–864, 1995.
- HUTWIMMER, S. et al. Algorithm-based design of novel synthetic media for Metarhizium anisopliae simulating its nutritional conditions in the environment. **Journal of applied microbiology**, v. 105, n. 2, p. 459–68, ago. 2008.
- IGNATOVA, Z. et al. Improvement of Posttranslational Bottlenecks in the Production of Penicillin Amidase in Recombinant Escherichia coli Strains. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 2, p. 1237–1245, 2003.
- ILLANES, A. et al. Production of Penicillin Acylase from Bacillus megaterium in Complex and Defined Media. **Process Biochemistry**, v. 29, p. 263–270, 1994.
- JANA, S.; DEB, J. K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in Escherichia coli. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 289–98, maio. 2005.
- JIA, L. et al. From shake flasks to bioreactors: survival of E. coli cells harboring pGST-hPTH through auto-induction by controlling initial content of yeast extract. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 90, n. 4, p. 1419–1428, maio. 2011.
- JIANFEI, L. et al. Optimization of Fermentation Media for Enhancing Nitrite-oxidizing Activity by Artificial Neural Network Coupling Genetic Algorithm. **Chinese journal of chemical engineering**, v. 20, n. 5, p. 950–957, 2012.

- JOSÉ, L. et al. Partial characterization of Penicillin Acylase from fungi *Aspergillus fumigatus* and *mucor*. **Moscow University chemistry bulletin**, v. 44, n. 1, p. 53–56, 2003.
- KAMASAKA, H. et al. *Bacillus stearothermophilus* Neopullulanase Selective Hydrolysis of Amylose to Maltose in the Presence of Amylopectin. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1658–1664, 2002.
- 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**, v. 17, n. 2, p. 99–108, fev. 1991.
- KAR, T. et al. Investigation of the effect of different extracellular factors on the lipase production by *Yarrowia lipolytica* on the basis of a scale-down approach. **Journal of industrial microbiology & biotechnology**, v. 35, n. 9, p. 1053–9, set. 2008.
- KARTHIKEYAN, R. et al. Biocalorimetric and respirometric studies on production of Penicillin G acylase from *Bacillus badius* pac in *E. coli* DH5 α . **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 3, p. 223–229, ago. 2011.
- KAZAN, D.; ERTAN, H.; ERARSLAN, A. Stabilization of *Escherichia coli* penicillin G acylase against thermal inactivation by cross-linking with dextran dialdehyde polymers. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 48, p. 191–197, 1997.
- KEILMANN, C.; WANNER, G.; BÖCK, A. Molecular basis of the exclusive low-temperature synthesis of an enzyme in *E. coli*: penicillin acylase. **Biological chemistry Hoppe-Seyler**, v. 374, n. 10, p. 983–992, out. 1993.
- KENSY, F. et al. Oxygen transfer phenomena in 48-well microtiter plates: determination by optical monitoring of sulfite oxidation and verification by real-time measurement during microbial growth. **Biotechnology and bioengineering**, v. 89, n. 6, p. 698–708, 20 mar. 2005.
- KENSY, F. et al. Validation of a high-throughput fermentation system based on online monitoring of biomass and fluorescence in continuously shaken microtiter plates. **Microbial cell factories**, v. 8, p. 31, jan. 2009.
- KENSY, F.; ENGELBRECHT, C.; BÜCHS, J. Scale-up from microtiter plate to laboratory fermenter: evaluation by online monitoring techniques of growth and protein expression in *Escherichia coli* and *Hansenula polymorpha* fermentations. **Microbial cell factories**, v. 8, p. 68, jan. 2009.
- KILIKIAN, B. V et al. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1019–1025, 2000.
- KIM, E.-K. et al. Large-scale production of soluble recombinant amyloid- β peptide 1-42 using cold-inducible expression system. **Protein expression and purification**, v. 86, n. 1, p. 53–7, nov. 2012.
- KLEMAN, G. L.; STROHL, W. R. Acetate metabolism by *E. coli* in high cell density fermentation. **Applied and environmental microbiology**, v. 60, n. 11, p. 3952–3958, nov. 1994.
- KOHLSTEDT, M.; BECKER, J.; WITTMANN, C. Metabolic fluxes and beyond-systems biology understanding and engineering of microbial metabolism. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 88, n. 5, p. 1065–75, nov. 2010.

- KORNELI, C. et al. Influence of fructose and oxygen gradients on fed-batch recombinant protein production using *Bacillus megaterium*. **Engineering in life sciences**, v. 11, n. 4, SI, p. 338–349, 2011.
- KORNELI, C. et al. Debottlenecking recombinant protein production in *Bacillus megaterium* under large-scale conditions-targeted precursor feeding designed from metabolomics. **Biotechnology and bioengineering**, v. 109, n. 6, SI, p. 1538–1550, jun. 2012.
- KORNELI, C. et al. Getting the big beast to work--systems biotechnology of *Bacillus megaterium* for novel high-value proteins. **Journal of biotechnology**, v. 163, n. 2, p. 87–96, 20 jan. 2013.
- KORNELI, C. et al. High yield production of extracellular recombinant levansucrase by *Bacillus megaterium*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 8, p. 3343–53, abr. 2013.
- KORZ, D. J. et al. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 59–65, 21 fev. 1995.
- KRAUS, A. et al. Identification of a co-repressor binding site in catabolite control protein CcpA. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 955–963, 1998.
- KRZESLAK, J. et al. Heterologous production of *Escherichia coli* penicillin G acylase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of biotechnology**, v. 142, n. 3-4, p. 250–8, 15 jul. 2009.
- KUTZBACH, C.; RAUENBUS, E. Preparation and general properties of crystalline Penicillin Acylase from *Escherichia coli* ATCC-11 105. **Hoppe-seyler's zeitschrift für physiologische chemie**, v. 355, n. 1, p. 45–53, 1974.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.
- LANGEN, L. M. VAN et al. Penicillin acylase-catalyzed peptide synthesis : a chemo-enzymatic route to stereoisomers of. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 11, p. 1077–1083, 2000.
- LEE, E.-J. et al. Enhanced production of carboxymethylcellulase of a marine microorganism, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* A-53 in a pilot-scaled bioreactor by a recombinant *Escherichia coli* JM109/A-53 from rice bran. **Molecular biology reports**, v. 40, n. 5, p. 3609–21, maio. 2013.
- LEE, H. Y. et al. Improved precursor-directed biosynthesis in *E. coli* via directed evolution. **Journal of antibiotics**, v. 64, n. 1, p. 59–64, jan. 2011.
- LEE, K.-M. et al. Sequential and simultaneous statistical optimization by dynamic design of experiment for peptide overexpression in recombinant *Escherichia coli*. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 135, n. 1, p. 59–80, 2006.
- LEE, S. K.; KEASLING, J. D. Heterologous protein production in *Escherichia coli* using the propionate-inducible pPro system by conventional and auto-induction methods. **Protein expression and purification**, v. 61, n. 2, p. 197–203, out. 2008.
- LEE, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli*. **Trends in biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 98–105, mar. 1996.
- LEE, Y. M.; KIM, J. S.; KIM, W. J. Optimization for the maximum bacteriocin production of *Lactobacillus brevis* DF01 using response surface methodology. **Food science and biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 653–659, jun. 2012.

- LEECH, H. K. et al. Characterization of the cobaltochelatase CbiXL: evidence for a 4Fe-4S center housed within an MXCXXC motif. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 43, p. 41900–7, 24 out. 2003.
- LELOUP, L. et al. Differential Dependence of Levansucrase and Amylase Secretion on SecA (Div) during the Exponential Phase of Growth of *Bacillus subtilis* Differential Dependence of Levansucrase and α -Amylase Secretion on SecA (Div) during the Exponential Phase of G. **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 6, p. 1820, 1999.
- LENSKI, R. E.; BOUMA, J. E. Effects of segregation and selection on instability of plasmid pACYC184 in *Escherichia coli* B. **Journal of bacteriology**, v. 169, n. 11, p. 5314–5316, nov. 1987.
- LI, Q. et al. Use of focused acoustics for cell disruption to provide ultra scale-down insights of microbial homogenization and its bioprocess impact recovery of antibody fragments from rec E. coli. **Biotechnology and bioengineering**, v. 109, n. 8, p. 2059–2069, 2012.
- LIANG, J. D. et al. Optimal culture conditions for keratinase production by a novel thermophilic *Myceliophthora thermophila* strain GZUIFR-H49-1. **Journal of applied microbiology**, p. 871–880, 17 jan. 2011.
- LIMA, U. A. et al. **Biociencia industrial-Vol.3**. [s.l.] Editora Edgard Blücher Ltda., 2001. p. 593
- LIN, W.-J.; KUO, B.-Y.; CHOU, C. A biochemical engineering approach for enhancing production of recombinant penicillin acylase in *Escherichia coli*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 24, n. 4, p. 239–247, 1 nov. 2001.
- LIN, Y.-H.; HSIAO, H.-C.; CHOU, C. P. Strain improvement to enhance the production of recombinant penicillin acylase in high-cell-density *Escherichia coli* cultures. **Biotechnology progress**, v. 18, n. 6, p. 1458–1461, 2002.
- LIU, J.-F. et al. Significantly enhanced production of recombinant nitrilase by optimization of culture conditions and glycerol feeding. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 89, n. 3, p. 665–72, fev. 2011.
- LIU, Y.-C.; CHANG, W.-M.; LEE, C.-Y. Effect of oxygen enrichment aeration on penicillin G acylase production in high cell density culture of recombinant *E. coli*. **Bioprocess Engineering**, v. 21, n. 3, p. 227–230, 3 set. 1999.
- LÜDERS, S. et al. Influence of the hydromechanical stress and temperature on growth and antibody fragment production with *Bacillus megaterium*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 81–90, jul. 2011.
- LULI, G. W.; STROHL, W. R. Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 4, p. 1004–1011, 1990.
- MADIGAN, M. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. [s.l.] Ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- MALAVIYA, A.; JANG, Y.-S.; LEE, S. Y. Continuous butanol production with reduced byproducts formation from glycerol by a hyper producing mutant of *Clostridium pasteurianum*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 93, n. 4, p. 1485–94, fev. 2012.

- MALTEN, M. et al. Coexpression of the type I signal peptidase gene sipM increases recombinant protein production and export in *Bacillus megaterium* MS941. **Biotechnology and bioengineering**, v. 91, n. 5, p. 616–621, 2005.
- MALTEN, M. et al. A *Bacillus megaterium* Plasmid System for the Production, Export, and One-Step Purification of Affinity-Tagged Heterologous Levansucrase from Growth Medium †. **Applied and environmental microbiology**, v. 72, n. 2, p. 1677–1679, 2006.
- MARCOS, J. . et al. Application of surface response analysis to the optimization of penicillin acylase purification in aqueous two-phase systems. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 7, p. 1006–1014, dez. 2002.
- MARESOVÁ, H. et al. Heterologous expression of leader-less pga gene in *Pichia pastoris*: intracellular production of prokaryotic enzyme. **BMC biotechnology**, v. 10, p. 7, jan. 2010.
- MARTÍN, L. et al. Cloning and sequencing of the pac gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **FEMS microbiology letters**, v. 125, n. 2-3, p. 287–92, 15 jan. 1995.
- MARTIN, P. A. W.; LOHR, J. R.; DEAN, D. H. Transformation of *Bacillus thuringiensis* protoplasts by plasmid deoxyribonucleic acid. **Journal of bacteriology**, v. 145, n. 2, p. 980–983, 1981.
- MASSOLINI, G. et al. Elucidation of the enantioselective recognition mechanism of a penicillin G acylase-based chiral stationary phase towards a series of 2-aryloxy-2-arylacetic acids. **Chirality**, v. 18, n. 8, p. 633–643, 2006.
- MATANGUIHAN, R. M.; KONSTANTINOV, K. B.; YOSHIDA, T. Dielectric measurement to monitor the growth and the physiological states of biological cells. **Bioprocess Engineering**, v. 11, n. 6, p. 213–222, nov. 1994.
- MAYER, R. J.; DOHERTY, F. J. Ubiquitin. In: **Essays in biochemistry**, v 27. Portland, London, England: Portland press, 1992. v. 27p. 37–48.
- MCCULLOUGH, J. E. **Method of increased production of Penicillin Acylase**, 1985.
- MCDONOUGH, M. A; KLEI, H. E.; KELLY, J. A. Crystal structure of penicillin G acylase from the Bro1 mutant strain of *Providencia rettgeri*. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 8, n. 10, p. 1971–81, out. 1999.
- MENZELLA, H. G.; CECCARELLI, E. A.; GRAMAJO, H. C. Novel *Escherichia coli* strain allows efficient recombinant protein production using lactose as inducer. **Biotechnology and bioengineering**, v. 82, n. 7, p. 809–817, jun. 2003.
- MIERAU, I. et al. Industrial-scale production and purification of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* using the nisin-controlled gene expression system NICE: the case of lysostaphin. **Microbial cell factories**, v. 4, p. 15, 27 maio. 2005.
- MINJIE, G.; ZHONG-PING, S. Process Control and Optimization for Heterologous Protein Production by Methylophilic *Pichia pastoris*. **Chinese journal of chemical engineering**, v. 21, n. 2, p. 216–226, 2013.
- MOBITEC GMBH GERMANY. *Bacillus megaterium* protein expression system. p. 1–26, 2008.
- MONTEAGUDO, J. M. et al. Determination of the best nutrient medium for the production of the l-lactic acid from beet molasses - A statistical approach. **Acta biotecnologica**, v. 13, n. 2, p. 103–110, 1993.

- MONTES, T. et al. Genetic modification of the penicillin G acylase surface to improve its reversible immobilization on ionic exchangers. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 1, p. 312–319, jan. 2007.
- MOO-YOUNG, M. **Comprehensive biotechnology**. 2nd editio ed. [s.l: s.n.].
- MORO, A.; SANCHEZ, J. C.; SERGUERA, C. Transformation of *Bacillus megaterium* by electroporation. **Biotechnology techniques**, v. 9, n. 8, p. 589–590, 1995.
- NAGLAK, T. J., HETTWER, D. J. E WANG, H. Y. Chemical permeabilization of cells for intracellular product release. In: ASENJO, J. A. (Ed.). **Separation Process in Biotechnology**. [s.l.] Mercel Dekker, Inc., U.S.A., 1990. p. 177–205.
- NAM, D. H.; RYU, D. D. Y. Biochemical properties of Penicillin amidohydrolase from *Micrococcus luteus*. **Applied and environmental microbiology**, v. 38, n. 1, p. 35–38, 1979.
- NAVEENA, B. J. et al. Wheat bran an inexpensive substrate for production of lactic acid in solid state fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6 - Optimization of fermentation conditions. **Journal of scientific & industrial research**, v. 62, n. 5, p. 453–456, 2003.
- NELSON, D. L.; LEHNINGER, A. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 5. ed. [s.l.] W. H. Freeman, 2008. p. 1100
- NEU, H. C.; HEPPEL, L. A. Release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during formation of spheroplasts. **Journal of biological chemistry**, v. 240, n. 9, p. 3685–3692, 1965.
- NIELSEN, J.; VILLADSEN, J.; LIDÉN, G. Principles Bioreaction Engineering Principles Second Edition. **Kluwer academic/Plenum publishers, New York**, 2003.
- NUCCI, E. R. et al. Comparing the performance of multilayer perceptrons networks and neuro-fuzzy systems for on-line inference of *Bacillus megaterium* cellular concentrations. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 30, n. 6, p. 429–38, nov. 2007.
- OSPINA, S. S. et al. Characterization and use of a Penicillin Acylase biocatalyst. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 53, n. 2, p. 205–213, 1992.
- PANBANGRED, W. et al. High expression of the penicillin G acylase gene (*pac*) from *Bacillus megaterium* UN1 in its own *pac* minus mutant. **Journal of applied microbiology**, v. 89, n. 1, p. 152–7, jul. 2000.
- PARMAR, A. et al. Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). **Biotechnology advances**, v. 18, p. 289–301, 2000.
- PASSARINHA, L. A.; BONIFACIO, M. J.; QUEIROZ, J. A. Application of a Fed-Batch Bioprocess for the Heterologous Production of hSCOMT in *Escherichia coli*. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 19, n. 9, p. 972–981, 2009.
- PESSOA JR, A.; KILIKIAN, B. **Purificação de Produtos Biotecnológicos**. [s.l: s.n.].
- PINOTTI, L. **Produção e purificação de Penicilina G Acilase**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2003.
- PINOTTI, L. M. et al. Study of different media for production of penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 84-6, p. 655–663, 2000.

- PINOTTI, L. M. et al. Inoculum studies in production of penicillin G acylase by *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 98, p. 679–686, 2002.
- PINOTTI, L. M. et al. Maintenance of penicillin G acylase expression by *B. megaterium*: Preservation methods and activity recovery. **Brazilian journal of chemical engineering**, v. 24, n. 3, p. 307–313, 2007.
- PINOTTI, L. M. et al. The penicillin G acylase production by *B. megaterium* is amino acid consumption dependent. **Biotechnology and bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 346–353, jun. 2007.
- PINOTTI, L. M. et al. Recovery and partial purification of penicillin G acylase from *E. coli* homogenate and *B. megaterium* culture medium using an expanded bed adsorption column. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2-3, p. 111–118, maio. 2009.
- PINSACH, J. et al. Influence of process temperature on recombinant enzyme activity in *Escherichia coli* fed-batch cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, n. 7, p. 507–512, dez. 2008.
- PINSACH, J.; DE MAS, C.; LÓPEZ-SANTÍN, J. Induction strategies in fed-batch cultures for recombinant protein production in *Escherichia coli*: Application to rhamnulose 1-phosphate aldolase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, n. 2, p. 181–187, set. 2008.
- PLHÁCKOVÁ, K. et al. Isolation and characterization of a new strain of *Achromobacter* sp. with beta-lactam antibiotic acylase activity. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 62, n. 5-6, p. 507–16, out. 2003.
- RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Recent biotechnological interventions for developing improved penicillin G acylases. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 97, n. 1, p. 1–13, jan. 2004.
- RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Application of cross-linked enzyme aggregates of *Bacillus badius* penicillin G acylase for the production of 6-aminopenicillanic acid. **Letters in applied microbiology**, v. 44, n. 1, p. 43–9, jan. 2007.
- RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Molecular cloning and characterization of thermostable beta-lactam acylase with broad substrate specificity from *Bacillus badius*. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 103, n. 5, p. 457–63, maio. 2007.
- RAMANAN, R. et al. Classification of pressure range based on the characterization of *Escherichia coli* cell disruption in high pressure homogenizer. **American journal of biochemistry and biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 21–29, 2009.
- RAMANAN, R. N. et al. Optimization of osmotic shock process variables for enhancement of the release of periplasmic interferon- α 2b from *Escherichia coli* using response surface method. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 196–202, fev. 2010.
- RAMIREZ, D. M.; BENTLEY, W. E. Enhancement of recombinant protein-synthesis and stability via coordinated amino-acid addition. **Biotechnology and bioengineering**, v. 41, n. 5, p. 557–565, mar. 1993.
- RASHID, J.; SAMAT, N.; YUSOFF, W. Screening and optimization of medium composition for mannanase production by *Aspergillus terreus* SUK-1 in solid state fermentation using statistical experimental methods. **Research journal of microbiology**, v. 7, n. 5, p. 242–255, 2012.

- REN, Q. et al. High level production of tyrosinase in recombinant Escherichia coli. **BMC biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 18, jan. 2013.
- RESTAINO, O. F. et al. High cell density cultivation of a recombinant E. coli strain expressing a key enzyme in bioengineered heparin production. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 9, p. 3893–900, maio. 2013.
- RHEE, M. S. et al. Development of plasmid vector and electroporation condition for gene transfer in sporogenic lactic acid bacterium, Bacillus coagulans. **Plasmid**, v. 58, n. 1, p. 13–22, jul. 2007.
- RINCON, J. et al. Optimization of the fermentation of whey by lactobacillus-casei. **Acta biotecnologica**, v. 13, n. 4, p. 323–331, 1993.
- ROCCHIETTI, S. et al. Influence of the enzyme derivative preparation and substrate structure on the enantioselectivity of penicillin G acylase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 88–93, 2002.
- ROCHE, D.; PRASAD, K.; REPIC, O. Enantioselective acylation of β -aminoesters using penicillin G Acylase in organic solvents. **Tetrahedron Letters**, v. 40, n. 19, p. 3665–3668, maio. 1999.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos**. [s.l.] Casa do Pão Editora, 2005. p. 325
- RODRÍGUEZ-CARMONA, E. et al. Recombinant Fab expression and secretion in Escherichia coli continuous culture at medium cell densities: Influence of temperature. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 446–452, mar. 2012.
- ROSSO, M.-L.; VARY, P. S. Distribution of Bacillus megaterium QM B1551 plasmids among other B. megaterium strains and Bacillus species. **Plasmid**, v. 53, n. 3, p. 205–17, maio. 2005.
- RUIZ, J. et al. Alternative production process strategies in E. coli improving protein quality and downstream yields. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 1039–1045, set. 2009.
- RYGUS, T.; HILLEN, W. Inducible high level expression of heterologous genes in Bacillus-megaterium using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 594–599, 1991.
- SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico**. [s.l.: s.n.]. p. 120
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SANDOVAL-BASURTO, E. A. et al. Culture of Escherichia coli under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down system: Metabolic response and production of recombinant protein. **Biotechnology and bioengineering**, v. 89, n. 4, p. 453–463, 2005.
- SANGER F; NICKLEN, S.; COURSON, A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 74, n. 12, p. 5463–5467, 9 fev. 1977.
- SANTOS, J. A. L. et al. Freeze/thawing and sonication of Escherichia coli TB1 cells for cytochrome b(5) recovery. **Bioseparation**, v. 6, n. 2, p. 81–89, 1996.

SARGO, C. R. **Aperfeiçoamento de cultivos de alta densidade celular de rE. coli utilizando glicerol como fonte de carbono.** [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2011.

SARRA, M. et al. Application of factorial design to the optimization of medium composition in batch cultures of the *Streptomyces lividans* TK21 producing a hybrid antibiotic. **Biotechnology letters**, v. 15, n. 6, p. 559–564, 1993.

SARVAS, M. et al. Post-translocational folding of secretory proteins in Gram-positive bacteria. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1694, n. 1-3, p. 311–27, 11 nov. 2004.

SAVIDGE, T. A.; COLE, M. Penicillin acylase (bacterial). In: HASH, J. H. (Ed.). **Antibiotics**. [s.l.] Academic Press, 1975. v. 43p. 705–721.

SCHMIDELL, W. et al. **Biotechnologia industrial-Vol.2.** primeira e ed. [s.l: s.n.]. p. 541

SCHMIDT, F. R. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 68, p. 425–435, 2005.

SEEGER, A. et al. Comparison of temperature- and isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside-induced synthesis of basic fibroblast growth factor in high-cell-density cultures of recombinant *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 947–953, 1995.

SEIDEL, G. et al. Quantitative interdependence of effectors, CcpA and cre in carbon catabolite regulation of *Bacillus subtilis*. **FEBS journal**, v. 272, n. 10, p. 2566–2577, 2005.

SENEROVIC, L. et al. High-level production and covalent immobilization of *Providencia rettgeri* penicillin G acylase (PAC) from recombinant *Pichia pastoris* for the development of a novel and stable biocatalyst of industrial applicability. **Biotechnology and bioengineering**, v. 93, n. 2, p. 344–354, 2006.

SENTHIVEL, S. G.; PAI, J. S. Purification of Penicillin Acylase of *Bacillus megaterium*. **Biotechnology techniques**, v. 10, n. 8, p. 611–614, 1996.

SHAN, J. et al. Statistical optimization of medium composition and culture condition for the production of recombinant anti-lipopolysaccharide factor of *Eriocheir sinensis* in *Escherichia coli*. **Chinese journal of oceanology and limnology**, v. 29, n. 6, p. 1249–1259, nov. 2011.

SHAW, S. et al. Enzymatic synthesis of cephalothin by penicillin G acylase*. **Enzyme and microbial technology**, v. 26, n. 2-4, p. 142–151, 1 fev. 2000.

SHEPARD, S. R.; BOYD, G. A.; SCHRIMSHER, J. L. Routine manufacture of recombinant proteins using expanded bed adsorption chromatography. **Bioseparation**, v. 10, n. 1-3, p. 51–56, 2001.

SHEWALE, J. G.; SIVARAMAN, H. Penicillin Acylase -enzyme-production and its application in the manufacture of 6-APA. **Process Biochemistry**, v. 24, n. 4, p. 146–154, 1989.

SHOJAOSADATI, S. A. et al. Recent advances in high cell density cultivation for production of recombinant protein. v. 6, n. 2, p. 63–84, 2008.

SILVA, R. G. et al. Using a medium of free amino acids to produce penicillin G acylase in fed-batch cultivations of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **Brazilian journal of chemical engineering**, v. 23, n. 1, p. 37–43, 2006.

- SILVA, R. G. et al. Artificial neural networks to infer biomass and product concentration during the production of penicillin G acylase from *Bacillus megaterium*. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 83, n. 5, p. 739–749, 2008.
- SKERRA, A. Use of tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. **Gene**, v. 151, n. 1-2, p. 131–135, 1994.
- ŠKROB, F. et al. Novel penicillin G acylase from *Achromobacter* sp. CCM 4824. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 6, p. 738–744, maio. 2003.
- SOBOTKOVÁ, L. et al. Development of a high-expression system for penicillin G acylase based on the recombinant *Escherichia coli* strain RE3 (pKA1S). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 389–397, 1996.
- SOBOTKOVÁ, L.; GRAFKOVÁ, J.; KYSL, P. Effect of phenylacetic acid on the growth and production of penicillin G acylase of recombinant and host strains derived from *Escherichia coli* W. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 992–999, 2002.
- SOBOTKOVA, L.; PLHSIEKOVI, K.; KYSLIK, P. Cloning of Penicillin G Acylase-encoding gene from *Escherichia coli* high-producing strain RE3. **Biotechnology letters**, v. 17, n. 7, p. 723–728, 1995.
- SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Microbial cell factories**, v. 4, n. 1, p. 1, 4 jan. 2005.
- SØRENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of biotechnology**, v. 115, n. 2, p. 113–28, 26 jan. 2005.
- SOUZA, V. R. DE et al. Characterization of the Penicillin G Acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 48, n. June, p. 105–111, 2005.
- SOUZA, V. R. DE. **Diferentes meios de cultivo e condições operacionais na produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium***. [s.l.] Federal University of São Carlos, 2007.
- STAMMEN, S. et al. High-yield intra- and extracellular protein production using *Bacillus megaterium*. **Applied and environmental microbiology**, v. 76, n. 12, p. 4037–46, jun. 2010.
- STEPHENSON, K. et al. The influence of protein folding on late stages of the secretion of K -amylases from *Bacillus subtilis*. **FEBS letters**, v. 430, n. 3, p. 385–9, 3 jul. 1998.
- STUDIER, F. W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. **Protein Expression and Purification**, v. 41, n. 1, p. 207–234, maio. 2005.
- STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of molecular biology**, v. 189, n. 1, p. 113–30, 5 maio. 1986.
- SUAREZ, C. A. G. et al. Assessment of the Metabolism of Different Strains of *Bacillus megaterium*. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 55, n. August, p. 485–490, 2012.
- ŠVEDAS, V. et al. Kinetic study of penicillin acylase from *Alcaligenes faecalis*. **FEBS Letters**, v. 417, n. 3, p. 414–418, nov. 1997.

- TARTOF, K. D.; HOBBS, C. A. Improved media for growing plasmid and cosmid clones. **Focus**, v. 9, n. 2, p. 12, 1987.
- TERPE, K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, n. 2, p. 211–22, set. 2006.
- THWAITE, J. et al. Optimization of the cell wall microenvironment allows increased production of recombinant *Bacillus anthracis* protective antigen from *B. subtilis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 1, p. 227–234, 1 jan. 2002.
- TOPGI, R. S. et al. Use of enzyme penicillin acylase in selective amidation/amide hydrolysis to resolve ethyl 3-amino-4-pentynoate isomers. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 7, n. 10, p. 2221–2229, out. 1999.
- TYLER, R. C. et al. Auto-induction medium for the production of [U-15N]- and [U-13C, U-15N]-labeled proteins for NMR screening and structure determination. **Protein expression and purification**, v. 40, n. 2, p. 268–278, abr. 2005.
- VALDEZ-CRUZ, N. A et al. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. **Microbial cell factories**, v. 9, p. 18, jan. 2010.
- VALEŠOVÁ, R. et al. Optimization of the host–plasmid interaction in the recombinant *Escherichia coli* strains overproducing penicillin G acylase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 1, p. 74–80, jul. 2004.
- VANDAMME, E. J. **Biotechnology of industrial antibiotics**. [s.l.] M. Dekker, 1984. p. 808
- VARY, P. S. et al. *Bacillus megaterium*--from simple soil bacterium to industrial protein production host. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 76, n. 5, p. 957–67, out. 2007.
- VARY, P. S. (WHEATON/ILL.). **Plasmidless strain of *Bacillus megaterium* QM B1551** United States of America, 1991.
- VERHAERT, R. M. D. et al. Molecular cloning and analysis of the gene encoding the thermostable penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3412–3418, 1997.
- VIITANEN, M. I. et al. Cheese whey-induced high-cell-density production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. **Microbial cell factories**, v. 10, p. 1–10, 2003.
- VOHRA, P. K. et al. Enhanced production of penicillin G acylase from a recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology letters**, v. 23, p. 531–535, 2001.
- WANG, T. et al. Enhancing enzymatic activity of penicillin G acylase by coexpressing pcm gene. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 72, n. 5, p. 953–8, out. 2006.
- WANG, W. et al. Proteome analysis of a recombinant *Bacillus megaterium* strain during heterologous production of a glucosyltransferase. **Proteome science**, v. 3, p. 4, 31 maio. 2005.
- WANG, W.; HOLLMANN, R.; DECKWER, W.-D. Comparative proteomic analysis of high cell density cultivations with two recombinant *Bacillus megaterium* strains for the production of a heterologous dextranucrase. **Proteome science**, v. 4, p. 19, jan. 2006.
- WARD, J. B. Teichoic and teichuronic acids: biosynthesis, assembly, and location. **Microbiological reviews**, v. 45, n. 2, p. 211–43, jun. 1981.

- WEN, Y. et al. Expression, purification, and characterization of His-tagged penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila* in *Escherichia coli*. **Protein expression and purification**, v. 38, n. 1, p. 24–8, nov. 2004.
- WEN, Y. et al. Expression and overproduction of recombinant penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila* in *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 233–237, jul. 2005.
- WEN, Y. et al. Expression and overproduction of recombinant penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila* in *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 2, p. 233–237, jul. 2005.
- WENG, Y.-P. et al. Optimization of the overexpression of glutamate mutase S component under the control of T7 system by using lactose and IPTG as the inducers. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3-4, p. 465–469, fev. 2006.
- WEUSTERBOTZ, D. et al. Continuous computer-controlled production of formate dehydrogenase (FDH) and isolation on a pilot-scale. **Chemical engineering and technology**, v. 17, n. 2, p. 131–137, 1994.
- WITTCHEM, K. D.; MEINHARDT, F. Inactivation of the major extracellular protease from *Bacillus megaterium* DSM319 by gene replacement. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 42, n. 6, p. 871–7, mar. 1995.
- WORTHINGTON CORPORATION; DIAGNOSTICS, B. **Manual of Clinical Enzyme Measurements**. [s.l.] Worthington Diagnostics, 1972. p. 54
- WU, J.-Y. et al. Cell disruption enhanced the pure EGFP recovery from an EGFP-intein-surface protein production system in recombinant *E. coli*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 68, p. 12–18, out. 2012.
- XU, J. et al. Galactose can be an inducer for production of therapeutic proteins by auto-induction using *E. coli* BL21 strains. **Protein expression and purification**, v. 83, n. 1, p. 30–36, maio. 2012.
- YAN, J. et al. Effects of lactose as an inducer on expression of *Helicobacter pylori* rUreB and rHpaA, and *Escherichia coli* rLTKA63 and rLTB. **World journal of gastroenterology**, v. 10, n. 12, p. 1755–1758, jun. 2004.
- YANG, S. et al. Expression and purification of extracellular penicillin G acylase in *Bacillus subtilis*. **Protein expression and purification**, v. 21, n. 1, p. 60–4, fev. 2001.
- YANG, Y. et al. High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*. **Microbial cell factories**, v. 5, p. 36, 2006.
- YANG, Y. et al. *Bacillus megaterium* as a recombinant protein production host. **Microbial cell factories**, v. 5, p. 74, 2006.
- YANG, Y. **Production and secretion of recombinant proteins using Bacillus megaterium**. [s.l.] Technical university of Braunschweig, 2007.
- YANG, Y. et al. Codon optimized *Thermobifida fusca* hydrolase secreted by *Bacillus megaterium*. **Biotechnology and bioengineering**, v. 96, n. 4, p. 780–794, mar. 2007.
- YE, Q. et al. High-level production of heterologous proteins using untreated cane molasses and corn steep liquor in *Escherichia coli* medium. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 517–25, jun. 2010.

YIM, S. et al. High-level secretory production of human granulocyte-colony stimulating factor by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 24, n. 4, p. 249–254, 1 nov. 2001.

ZAMBARE, V.; NILEGAONKAR, S.; KANEKAR, P. A novel extracellular protease from *Pseudomonas aeruginosa* MCM B-327: enzyme production and its partial characterization. **new biotechnology**, v. 28, n. 2, SI, p. 173–181, 2011.

ZHANG, M. et al. Production of *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase in *Bacillus subtilis* WB600 (pMA5) fed with partially hydrolyzed starch. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 555–560, ago. 2006.

ZHANG, Y.; TAIMING, L.; LIU, J. Low temperature and glucose enhanced T7 RNA polymerase-based plasmid stability for increasing expression of glucagon-like peptide-2 in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 29, n. 1, p. 132–139, maio. 2003.

ZHOU, J. et al. Penicillin G acylase purification with the aid of high-throughput screening approach. **Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 39, n. 3, p. 195–202, maio. 2008.

ZHOU, Z. et al. Purification and characterization of *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase expressed in *Bacillus subtilis*. **Acta biochimica et biophysica sinica**, v. 35, n. 5, p. 416–422, 2003.

ZUZEK, M. et al. Optimization of fermentation medium by a modified method of genetic algorithms. **Biotechnology techniques**, v. 10, n. 12, p. 991–996, 1996.