

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

ESTUDO DE CONDIÇÕES OPERACIONAIS NA PRODUÇÃO
DE PENICILINA G ACILASE POR DIFERENTES
MICROORGANISMOS

Renata Tiekko Oguri

Orientador:

Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano

Dissertação de Mestrado

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

**ESTUDO DE CONDIÇÕES OPERACIONAIS NA PRODUÇÃO
DE PENICILINA G ACILASE POR DIFERENTES
MICRORGANISMOS**

Renata Tieko Oguri

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Química da Universidade
Federal de São Carlos como parte dos
requisitos necessários à obtenção do título
de Mestre em Engenharia Química, área
de concentração em Pesquisa e
Desenvolvimento de Processo Químicos**

Orientador:

Profª. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano

São Carlos – SP

2006

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

O35ec

Oguri, Renata Tieko.

Estudo de condições operacionais na produção de penicilina G acilase por diferentes microrganismos / Renata Tieko Oguri. -- São Carlos : UFSCar, 2007.
113 p.

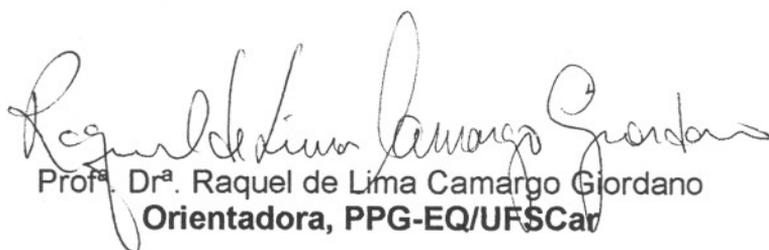
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Engenharia bioquímica. 2. Penicilina G acilase - produção. 3. *Xanthomonas*. 4. *Bacillus megaterium*. I. Título.

CDD: 660.63 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE
RENATA TIEKO OGURI, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM
20 DE DEZEMBRO DE 2006.

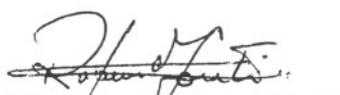
BANCA EXAMINADORA:



Prof.^a Dr.^a Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora, PPG-EQ/UFSCar



Dr.^a Mônica Rosas da Costa Lemma
DCF/UFSCar



Prof. Dr. Rubens Monti
UNESP/Araraquara

AGRADECIMENTOS

À professora Raquel de Lima Camargo Giordano pela confiança, orientação, dedicação, com críticas e elogios, que foram fundamentais para a elaboração deste trabalho.

À companheira de laboratório que se tornou mais do que amiga, Vanessa, pela enorme paciência ao ensinar e ajudar, além de ser a amiga de todas as horas - de madrugadas de trabalho, conversas e desabafos.

Aos amigos de laboratório que muito ajudaram nos ensaios e sem os quais não teria alcançado meus objetivos – Vanessa, Ariane, Sidnei e Edson.

A todos os amigos da pós-graduação, por fazerem dos dias de trabalhos períodos agradáveis, além dos momentos de descontração fora da faculdade, entre eles Geísa, Vanessa, Adriano, Ariane, Gilson, Dasciana, Fábio, Edson, Wellington, Rebecca, Marcelo, Rosi, Danny, Patrícia, Adilson, Juliana, Érica e Carol.

Aos técnicos de laboratório Amadeus e Edílson, por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos meus queridos amigos de Araraquara - amigos desde sempre e para sempre - Sabrina, Tatiane, Luciana, Karen, Lilian, Raquel, Simone, Amanda e Bilão, Pé, Aluísio, Lê e Fábio.

Às minhas amigonas, Cilene, Cecília, Marli, Larissa, Kika e Monique que me fazem acreditar que amizades verdadeiras resistem ao tempo e à distância.

A toda a minha família por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Aos meus irmãos, Fábio e Guilherme, e aos meus primos - irmãos, Denise e Henrique, simplesmente por fazerem parte da minha vida.

E finalmente, aos meus amados pais, Luiza e Nelson, e avós, Iracema e Luiz. Não tenho palavras para expressar minha gratidão à vocês que guiam meus passos e estão sempre ao meu lado, incentivando e apoiando.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

Penicilina G acilase (PGA) é das enzimas de maior impacto na saúde humana, pois catalisa a desacilação de penicilinas naturais, principalmente a penicilina G, para a obtenção do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), composto chave na produção de antibióticos β -lactâmicos. Ela é produzida por diferentes microrganismos, dentre os quais *Bacillus megaterium*, um dos poucos que secreta a enzima. A produção de PGA por esse microrganismo vem sendo estudada há tempos no DEQ-UFSCar. *Xanthomonas campestris* possui em seu DNA a seqüência genética que codifica PGA e teste preliminar de cultivo de linhagem desse microrganismo doada pelo Departamento de Genética e Evolução da UFSCar mostrou produção extracelular de PGA. Foi iniciado, por isso, meses depois, estudos de produção de PGA por *X.campestris*, reativando-se cultura do microrganismo que estava armazenada no DEQ-UFSCar. Em paralelo, foram obtidas e testadas outras linhagens desse microrganismo, procedentes da Coleção de Culturas Tropical (CCT) e do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR). Cultivos dessas novas linhagens de *X. campestris* mostraram crescimento celular pequeno, sem produção de PGA. Comparando-se essas novas linhagens com o microrganismo que se vinha trabalhando pode-se verificar então que este não era *X. campestris*. O microrganismo foi a seguir enviado para identificação na Fundação André Toselo. O laudo dessa Instituição mostrou que o microrganismo que vinha sendo cultivado era *Bacillus megaterium* de Bary 1884^{AL} (ATCC 35985). Esse resultado já era esperado, pois havia muitas semelhanças entre as duas culturas. Contudo, havia também algumas diferenças, que motivaram o envio para identificação criteriosa do microrganismo produtor de PGA. Assim, ao mesmo tempo em que foram realizadas tentativas de adaptação das novas linhagens de *X. campestris* visando produção de PGA, foram investigadas diferentes condições operacionais de produção da enzima com o microrganismo identificado como *B. megaterium*, tanto em câmara rotativa ‘shaker’ como em biorreator, bem como a caracterização da enzima produzida.

Ensaio de germinação/propagação de *Bacillus megaterium*, a 30°C, realizados em ‘shaker’, mostraram que o microrganismo atinge fase estacionária em 24 horas, com velocidade máxima específica de crescimento $\mu_{\text{máx}} = 0,33\text{h}^{-1}$. O pH inicial onde se obtém a maior atividade de PGA é 8,0 para o meio de crescimento (propagação) e pH 7,0 para o meio de produção. Cultivos a diferentes temperaturas mostraram que 30°C é a temperatura ótima tanto para o crescimento do microrganismo quanto para produção da enzima. O meio de cultivo composto por aminoácidos consumidos preferencialmente pelo microrganismo - 20 g/L, fenilacetato de potássio - 3,5 g/L, solução com diferentes sais - 0,22 g/L, e soro de queijo-20,0 g/L mostrou ser o mais eficiente na produção da PGA, atingindo máxima concentração celular e atividade enzimática, 4,59 g/L e 592 UI/L, respectivamente, em 36 horas de cultivo, com pHs para os meios de crescimento e produção iguais a 8,0 e 7,0, respectivamente, e temperatura controlada em 30°C.

Cultivos do microrganismo em biorreator de 2 L mostraram que a adição de nutrientes na forma de pulsos é estratégia eficiente, proporcionando aumento nos níveis de produção da enzima. Estudo da influência de oxigênio dissolvido na produção de PGA mostrou que manutenção de 10% de saturação durante todo o cultivo conduz à máxima atividade enzimática, 451 UI/L. Essa deve ser realmente a condição ótima para oxigênio, pois pela primeira vez se obteve maior atividade enzimática no biorreator e não no ensaio em “shaker”, sempre realizado em paralelo para padronização do estudo.

Resultados obtidos na caracterização da enzima confirmaram os valores já obtidos anteriormente para PGA de *B. megaterium*: temperatura e pH ótimos foram 47°C e 8,0, respectivamente; parâmetros cinéticos obtidos por ajuste do modelo de Michaelis-Menten a dados de velocidades iniciais de hidrólise de penicilina G catalisada por PGA, a 37°C, foram: $V_{máx}$ $1,1 \cdot 10^{-3}$ mmol/min*UI e K_m 1,51 mM; meia-vida da enzima a 60°C é de 10 minutos, com inativação completa após 45 minutos de exposição. Quanto à estabilidade alcalina, verificou-se a completa desnaturação de PGA após 90 minutos de incubação a pH 11,0, com tempo de meia vida de 1 minuto.

ABSTRACT

Penicillin G acylase (PGA) is an enzyme of major impact in human health for catalyzing the deacilation of the penicillin G, to yield 6-aminopenicillanic acid (6-APA), key intermediate in the semi-synthetic antibiotics production. Several microorganisms produce PGA, but *Bacillus megaterium* is capable of secreting it to the medium. PGA from *B. megaterium* has been studied in DEQ-UFSCar. *Xanthomonas campestris* presents in your DNA the genetic sequence that codify acylase penicillin and tests with a strain of this microorganism from Departamento de Genética e Evolução da UFSCar showed PGA extracellular production. Studies in PGA production were initiated with the microorganism stored in DEQ-UFSCar. At the same time, strains of *X. campestris* from Coleção de Culturas Tropical (CCT) and Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR) were tested. However, assays with these strains showed little cellular growth and no enzymatic activity. The microorganism reactivated was send to Fundação André Toselo for identification. The result showed that the microorganism was *Bacillus megaterium*. Therefore, at the same time that realized adaptations tries with the new strain of *X. campestris*, studies of production operational conditions of PGA were performed with strain of *Bacillus megaterium*, in shaking flasks and bioreactor, as well the enzyme characterization

Germination/ propagation of *B. megaterium* experiments, at 30°C, carried out in shaking flasks showed that the growth time of microorganism in the inoculum step was 24 hours and maximum specific growth rate was $\mu_{\text{máx}} = 0.33\text{h}^{-1}$. Assays in shaking flasks were carried out in shaker at 30°C and 300 rpm intend to determine the most adequate pH for the enzyme production in both, microorganism propagation phase and enzyme production phase The results showed that the best pHs among the tested ones were pH 8.0 and 7.0, for the propagation and production phases, respectively, with 355 IU/L. The culture medium with preferentially consumed amino acids – 20,0 g/L, potassium phenylacetate – 3,5 g/L, solution with differents salts – 0,22 g/L and cheese whey – 20,0 g/L was the more efficient in PGA production, carried out maximum cellular growth and enzymatic activity, 4,59 g/L and 592UI/L, respectively, in 36 hours.

Assays in a 2-L bioreactor, with production medium in the presence of amino acids preferably consumed 10.0 g/L, cheese whey 20.0 g/L, solution of salts 0.22 g/L and inducer potassium phenylacetate 3.5 g/L, indicated that the addition of nutrients during the fermentation is a efficient strategy, providing enzyme production increase. In the study of the influence of oxygen dissolved, carried out in bioreactor too, maximum enzymatic activity was 451 IU/L with 10% of saturation. Moreover, the maximum enzyme production was observed in the bioreactor and not in shaking flasks, like in all experiments until this.

In the stage of characterization of the penicillin G acylase from *Bacillus megaterium*, optimum values of temperature and pH were, 47°C and 8.0, respectively. The Michaelis Menten model fitted resulting in estimated K_m and $V_{\text{máx}}$ parameters values of 1.51 mM and $1.1 \cdot 10^{-3}$ mmol/min*IU, respectively. The activation energy estimated was 27.12 KJ/mol. The results showed that PGA from *Bacillus megaterium* deactivate completely after 45 minutes of incubation at 60°C and 90 minutes in pH 11.0.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Introdução

1. Introdução.....	1
---------------------------	----------

CAPÍTULO 2 – Revisão Bibliográfica

2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. Penicilinas.....	4
2.1.1. Breve Histórico.....	4
2.1.2. Estrutura Química.....	5
2.1.3. Classificação.....	5
2.1.3.1. Penicilinas Biossintéticas.....	6
2.1.3.2. Penicilinas Semi-sintéticas.....	7
2.2. Penicilina G Acilase (PGA).....	8
2.2.1. Alternativas para Produção de Penicilina G Acilase.....	10
2.2.2. Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> no DEQ/UFSCar.....	12
2.3. <i>Xanthomonas campestris</i>	15
2.4. <i>Bacillus sp</i>	17
2.5. Cinética de Processos Fermentativos.....	19
2.5.1. Fases do Crescimento Microbiano.....	19
2.5.2. Influência das Condições do Meio no Crescimento Microbiano.....	21
2.6. Efeito da Composição dos Meios de Cultivo.....	22
2.7. Metabolismo Celular.....	24
2.7.1. Vias Catabólicas e Anabólicas.....	25
2.7.1.1. Degradação Oxidativa dos Aminoácidos.....	24
2.7.1.2. Biossíntese de Aminoácidos.....	27
2.7.1.3. Aminoácidos como Nutrientes na Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i>	29
2.8. Enzimas.....	29
2.8.1. Regulação da Produção de Enzimas.....	33
2.8.2. Cinética Enzimática.....	35
2.8.2.1. Energia de Ativação.....	35
2.8.2.2. Efeito da Concentração de Substrato	36

2.8.2.3. Efeito do pH.....	38
2.8.2.4. Efeito da Temperatura.....	39

CAPÍTULO 3 – Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos.....	41
3.1. Materiais.....	41
3.1.1. Microrganismos.....	41
3.2. Métodos.....	41
3.2.1. Nutrientes.....	41
3.2.2. Reagentes para Análises de Acompanhamento da Produção da Enzima.....	41
3.2.3. Equipamentos.....	42
3.2.3.1. Câmara Asséptica.....	42
3.2.3.2. Autoclaves.....	42
3.2.3.3. Câmara rotativa de temperatura controlada – “shaker”.....	42
3.2.3.4. Reator tipo Tanque Agitado Applikon.....	42
3.2.3.5. Centrífuga Refrigerada.....	43
3.2.3.6. Outros Equipamentos.....	43
3.2.4. Armazenamento do Microrganismo em Meio Sólido	43
3.2.5. Composição das Diferentes Soluções Utilizadas na Preparação dos Meios de Crescimento e Produção.....	45
3.2.6. Obtenção do Inóculo.....	46
3.2.7. Produção da Enzima em Câmara Rotativa.....	47
3.2.8. Produção da Enzima em Biorreator.....	48
3.2.9. Acompanhamento da Concentração Celular.....	49
3.2.10. Determinação da Atividade Enzimática – Método PDAB.....	49
3.2.11. Rompimento das Células de <i>X. campestris</i> para Análise de Produção Intracelular de PGA.....	50
3.2.12. Análise da Atividade Proteolítica no Caldo de Fermentação.....	50
3.2.13. Caracterização da PGA de <i>Bacillus megaterium</i>	50
3.2.13.1. Determinação da Temperatura e pH Ótimos.....	51
3.2.13.2. Estabilidades Térmica e Alcalina.....	51
3.2.13.3. Determinação dos Parâmetros Cinéticos – $V_{m\acute{a}x}$ e K_m	51
3.2.13.4. Determinação da Energia de Ativação - E_a	52

CAPÍTULO 4 – Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão	54
4.1. Produção de Penicilina G Acilase no DEQ/ UFSCar.....	55
4.2. Produção de Penicilina G Acilase por <i>Xanthomonas campestris</i> em Câmara Rotativa ‘Shaker’.....	56
4.2.1. Produção de PGA por linhagem de <i>X. campestris</i> doada pela “Coleção de Culturas Tropicais (CCT)”.....	56
4.2.2. Produção de PGA por linhagem de <i>X. campestris</i> doada pelo Instituto Agrônômico do Paraná”.....	57
4.3. Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> em Câmara Rotativa ‘Shaker’.....	58
4.3.1. Determinação do Erro Experimental e da Variabilidade de Diferentes Inóculos.....	58
4.3.2. Padronização do Tempo de Inóculo e Concentração Celular na Etapa de Crescimento do Microrganismo.....	60
4.3.3. Otimização das Condições de Cultivo para Crescimento do Microrganismo e Produção da Penicilina G Acilase: pH Inicial e Temperatura.....	63
4.3.3.1. Influência do pH Inicial no Cultivo de <i>B. megaterium</i>	63
4.3.3.2. Influência da Temperatura no Cultivo de <i>B. megaterium</i>	70
4.3.4. Estudo da Composição de Meios de Cultivo na Produção da PGA por <i>B. megaterium</i>	71
4.4. Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> em Biorreator.....	76
4.4.1. 1º Ensaio em Biorreator: 20% de Oxigênio Dissolvido durante todo o Cultivo.....	78
4.4.2. 2º Ensaio em Biorreator: 20% de Oxigênio Dissolvido durante todo o Cultivo.....	79
4.4.3. 3º Ensaio em Biorreator: 20% de Oxigênio Dissolvido até 9 horas e Limitação em 5% até o Final do Cultivo.....	81
4.4.4. 4º Ensaio em Biorreator: Agitação Fixa em 300 rpm no Decorrer de todo o Cultivo e Adição de 1 Pulso.....	83
4.4.5. 5º Ensaio em Biorreator: 10% de Oxigênio Dissolvido durante todo o Cultivo.....	85
4.4.6. 6º Ensaio em Biorreator: 10% de Oxigênio Dissolvido durante todo o Cultivo.....	87
4.4.7. 7º Ensaio em Biorreator: 5% de Oxigênio Dissolvido até 17 horas e 10% até o Final do Cultivo e Adição de 5 Pulsos.....	90
4.4.8. Análise Comparativa dos Ensaios de Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> em Biorreator	93
4.5. Análise da Atividade Proteolítica nos Caldos de Fermentação.....	95
4.6. Justificativa para o Aumento do pH no Decorrer dos Cultivos.....	96
4.7. Caracterização de Penicilina G Acilase de <i>Bacillus megaterium</i>	97

4.7.1. pH e Temperatura Ótimos.....	97
4.7.2. Influência da Concentração de Substrato.....	99
4.7.3. Energia de Ativação (E_a).....	101
4.7.4 Estabilidades Térmica e Alcalina.....	102

CAPÍTULO 3 – Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos.....	40
3.1. Materiais.....	40
3.1.1. Microrganismos.....	40
3.1.2. Nutrientes.....	40
3.1.3. Reagentes para Análises de Acompanhamento da Produção da Enzima.....	40
3.1.4. Equipamentos.....	41
3.1.4.1. Câmara Asséptica.....	41
3.1.4.2. Autoclaves.....	41
3.1.4.3. Câmara rotativa de temperatura controlada – “shaker”.....	41
3.1.4.4. Reator tipo Tanque Agitado.....	41
3.1.4.5. Centrífuga Refrigerada.....	42
3.1.4.6. Outros Equipamentos.....	42
3.2. Métodos.....	42
3.2.1. Armazenamento do Microrganismo em Meio Sólido	42
3.2.2. Composição das Diferentes Soluções Utilizadas na Preparação dos Meios de Crescimento e Produção.....	44
3.2.3. Obtenção do Inóculo.....	45
3.2.4. Produção da Enzima em Câmara Rotativa.....	46
3.2.5. Produção da Enzima em Biorreator.....	47
3.2.6. Acompanhamento da Concentração Celular.....	48
3.2.7. Determinação da Atividade Enzimática – Método PDAB.....	48
3.2.8. Rompimento das Células de <i>X. campestris</i> para Análise de Produção Intracelular de PGA.....	49
3.2.9. Análise da Atividade Proteolítica no Caldo de Fermentação.....	49
3.2.10. Caracterização da PGA de <i>Bacillus megaterium</i>	50
3.2.10.1. Determinação da Temperatura e pH Ótimos.....	50
3.2.10.2. Estabilidades Térmica e Alcalina.....	50

3.2.10.3. Determinação dos Parâmetros Cinéticos – $V_{\text{máx}}$ e K_m	50
3.2.10.4. Determinação da Energia de Ativação - E_a	51

CAPÍTULO 4 – Resultados e Discussão

4. Resultados e Discussão.....	53
4.1. Produção de Penicilina G Acilase no DEQ/ UFSCar.....	54
4.2. Produção de Penicilina G Acilase por <i>Xanthomonas campestris</i> em Câmara Rotativa ‘Shaker’.....	55
4.2.1. Produção de PGA por linhagem de <i>X. campestris</i> doada pela “Coleção de Culturas Tropicais (CCT)”.....	55
4.2.2. Produção de PGA por linhagem de <i>X. campestris</i> doada pelo Instituto Agrônomo do Paraná”.....	56
4.3. Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> em Câmara Rotativa ‘Shaker’.....	57
4.3.1. Determinação do Erro Experimental e da Variabilidade de Diferentes Inóculos.....	57
4.3.2. Padronização do Tempo de Inóculo e Concentração Celular na Etapa de Crescimento do Microrganismo.....	59
4.3.3. Otimização das Condições de Cultivo para Crescimento do Microrganismo e Produção da Penicilina G Acilase: pH Inicial e Temperatura.....	62
4.3.3.1. Influência do pH Inicial no Cultivo de <i>B. megaterium</i>	62
4.3.3.2. Influência da Temperatura no Cultivo de <i>B. megaterium</i>	69
4.3.4. Estudo da Composição de Meios de Cultivo na Produção da PGA por <i>B. megaterium</i>	70
4.4. Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> em Biorreator.....	75
4.4.1. 1º Ensaio em Biorreator: 20% de Oxigênio Dissolvido durante todo o Cultivo.....	77
4.4.2. 2º Ensaio em Biorreator: 20% de Oxigênio Dissolvido durante todo o Cultivo.....	78
4.4.3. 3º Ensaio em Biorreator: 20% de Oxigênio Dissolvido até 9 horas e Limitação em 5% até o Final do Cultivo.....	80
4.4.4. 4º Ensaio em Biorreator: Agitação Fixa em 300 rpm no Decorrer de todo o Cultivo e Adição de 1 Pulso.....	82
4.4.5. 5º Ensaio em Biorreator: 10% de Oxigênio Dissolvido durante todo o Cultivo.....	84
4.4.6. 6º Ensaio em Biorreator: 10% de Oxigênio Dissolvido durante todo o Cultivo.....	86
4.4.7. 7º Ensaio em Biorreator: 5% de Oxigênio Dissolvido até 17 horas e 10% até o Final do Cultivo e Adição de 5 Pulsos.....	89
4.4.8. Análise Comparativa dos Ensaios de Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> em Biorreator.....	92
4.5. Análise da Atividade Proteolítica nos Caldos de Fermentação.....	94

4.6. Justificativa para o Aumento do pH no Decorrer dos Cultivos.....	95
4.7. Caracterização de Penicilina G Acilase de <i>Bacillus megaterium</i>	96
4.7.1. pH e Temperatura Ótimos.....	96
4.7.2. Influência da Concentração de Substrato.....	98
4.7.3. Energia de Ativação (E_a).....	100
4.7.4 Estabilidades Térmica e Alcalina.....	101

CAPÍTULO 5 – Conclusões

5. Conclusões.....	105
--------------------	-----

CAPÍTULO 6 – Referências Bibliográficas

6. Referências Bibliográficas.....	108
------------------------------------	-----

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1: Penicilinas biossintéticas.....	6
Tabela 2.2: Comparação dos valores de K_m de penicilinas G acilases provenientes de diferentes microrganismos reportados em literatura, utilizando-se penicilina G como substrato.....	10
Tabela 2.3: Comparação das enzimas com catalisadores químicos.....	30
Tabela 3.1: Composição do meio sólido LB para preservação de <i>Xanthomonas campestris</i>	44
Tabela 3.2: Composição do meio sólido NA para preservação de <i>Xanthomonas campestris</i>	44
Tabela 3.3: Composição do Meio Sólido para adaptação de <i>Xanthomonas campestris</i>	44
Tabela 3.4: Composição da solução de sais utilizada nos meio de cultivo para produção de penicilina G acilase (10 vezes concentrada).....	45
Tabela 3.5: Composição da solução de aminoácidos preferenciais.....	45
Tabela 3.6: Composição da solução de aminoácidos totais.....	46
Tabela 3.7: Composição para os meios de crescimento.....	47
Tabela 3.8: Composição dos meios de cultivo para produção de PGA	48
Tabela 4.1: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por linhagem de <i>X. campestris</i> doada pela CCT.....	57
Tabela 4.2: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por linhagem de <i>X. campestris</i> doada pelo Instituto Agrônômico do Paraná.....	58
Tabela 4.3: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> em cultivos com meio padrão para determinação do erro experimental e variabilidade de inóculos.....	59
Tabela 4.4: Crescimento celular em função do tempo do inóculo de <i>B. megaterium</i> , a 30°C e pH 8,0.....	60
Tabela 4.5: Valores de concentração celular após 24 horas de cultivo sob iguais condições de <i>B. megaterium</i> obtido de diferentes “slants”.....	62
Tabela 4.6: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> em cultivos com meio padrão – pHs iniciais 7,0 e 8,0 para meio de crescimento e produção.....	64
Tabela 4.7: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> em cultivos com meio padrão – pH inicial 7,0 para meio de crescimento e pHs iniciais 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5 para os meios de produção.....	65
Tabela 4.8: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> em cultivos com meio padrão – pHs alternados para meios de crescimento e produção.....	66
Tabela 4.9: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> em cultivos com meio padrão – pHs alternados para meios de crescimento e produção.....	67
Tabela 4.10: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> em cultivos contendo solução tampão.....	69
Tabela 4.11: Valores de concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> em cultivos a diferentes temperaturas.....	70

Tabela 4.12: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> em cultivos contendo aminoácidos totais a 10,0 e 20,0 g/L.....	72
Tabela 4.13: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> em cultivos contendo aminoácidos preferenciais a 10,0 e 20,0 g/L.....	73
Tabela 4.14: Concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> em cultivo contendo uréia.....	75
Tabela 4.15: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> em meio LB –bactotripton/extrato de levedura e meio contendo água de maceração de milho (CSL).....	76
Tabela 4.16: Ensaios de produção de PGA por <i>B. megaterium</i> realizados em biorreator – variáveis para o estudo da influência de oxigênio dissolvido e composições dos pulsos.....	77
Tabela 4.17: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 1° Ensaio em biorreator, 20% O.D.....	78
Tabela 4.18: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 2° Ensaio em biorreator, 20% O.D.....	80
Tabela 4.19: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 3° Ensaio em biorreator, 20% O.D. no início e 5% O.D. após 9 hs de cultivo.....	81
Tabela 4.20: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 4° Ensaio em biorreator, agitação fixa em 300 rpm e adição de 1 pulso.....	84
Tabela 4.21: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 5° Ensaio em biorreator, 10% O.D.....	86
Tabela 4.22: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 6° Ensaio em biorreator, 10% O.D. e adição de 3 pulsos.....	88
Tabela 4.23: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 7° Ensaio em biorreator, 5% O.D. até 17 horas e 10% até o final do cultivo.....	91
Tabela 4.24: Atividade enzimática de PGA de <i>B. megaterium</i> em diferentes pHs.....	98
Tabela 4.25: Atividade enzimática de PGA de <i>B. megaterium</i> em diferentes temperaturas.....	98
Tabela 4.26: Velocidades iniciais de hidrólise de PenG catalisada por PGA de <i>B. megaterium</i> , para diferentes concentrações do substrato.....	99
Tabela 4.27: Valores dos parâmetros cinéticos e respectivos erros, obtidos pelo ajuste dos pontos experimentais da reação de hidrólise de PenG catalisada por PGA de <i>B. megaterium</i> ao modelo de Michaelis-Menten.....	100
Tabela 4.28: Valores da regressão linear para o cálculo da energia de ativação, reta $Y=A+BX$	101
Tabela 4.29: Acompanhamento da atividade enzimática de PGA após diferentes períodos de incubação a 60°C.....	103

Tabela 4.30: Acompanhamento da atividade enzimática de PGA em ensaios de estabilidade alcalina a pH 11,0.....	103
--	------------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1: Estrutura química do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) com a porção variável acilada na posição 6.....	5
Figura 2.2: Estrutura química de antibióticos semi-sintéticos.....	8
Figura 2.3: Hidrólise enzimática da penicilina G.....	9
Figura 2.4: Micrografia de <i>X. campestris</i>	16
Figura 2.5: Curva de crescimento típico para cultivo de células em batelada.....	19
Figura 2.6: Comparação de processo químico com processo enzimático na hidrólise da penicilina G mostrando as vantagens de sua utilização para este fim.....	32
Figura 2.7: Mecanismo de indução de enzimas postulado por Jacob e Monod.....	34
Figura 2.8: ΔG e E_a de (a) uma reação não enzimática; (b) uma reação enzimática.....	35
Figura 2.9: Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima.....	36
Figura 2.10: Efeito do pH na atividade relativa de uma enzima.....	39
Figura 2.11: Efeito da temperatura na atividade enzimática. O ótimo de temperatura 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).....	40
Figura 3.1: (A) Reator Applikon com capacidade de 2,0 L; (B) Reator acoplado ao sistema de aquisição de dados.....	42
Figura 4.1: Crescimento celular em função do tempo do inóculo de <i>B. megaterium</i> , a 30°C e pH 8,0.....	61
Figura 4.2: Influência da temperatura na produção de PGA por <i>B. megaterium</i>	70
Figura 4.3: Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 1° Ensaio em biorreator, 20% O.D.....	79
Figura 4.4: Valores de concentração celular e atividade enzimática na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 2° Ensaio em biorreator, 20% O.D.....	80
Figura 4.5: Valores de concentração celular e atividade enzimática na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 3° Ensaio em biorreator, 20% O.D. no início e 5% O.D. após 9 hs de cultivo.....	82
Figura 4.6: Valores de concentração celular e atividade enzimática na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 4° Ensaio em biorreator, agitação fixa em 300 rpm e adição de 1 pulso.....	85
Figura 4.7: Valores de concentração celular e atividade enzimática na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 5° Ensaio em biorreator, 10% O.D.....	86
Figura 4.8: Valores de concentração celular e atividade enzimática na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 6° Ensaio em biorreator, 10% O.D. e adição de 3 pulsos.....	89
Figura 4.9: Valores de concentração celular e atividade enzimática na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> : 7° Ensaio em biorreator, 5% O.D. até 17 horas e 10% O.D. até o final do cultivo.....	92

Figura 4.10: Ensaios de influência da concentração de oxigênio dissolvido, realizados em biorreator, a 30°C: (A) Valores de atividade enzimática, em UI/L; (B) Valores de concentração celular, em g/L.....	93
Figura 4.11: Valores máximos de atividade específica em cada ensaio, em UI/g _{célula} , no estudo de influência da concentração de oxigênio dissolvido.....	95
Figura 4.12: Determinação do pH ótimo.....	98
Figura 4.13: Determinação da temperatura ótima.....	98
Figura 4.14: Ajuste do Modelo de Michaelis-Menten a velocidades iniciais de hidrólise de Penicilina G , determinadas para várias concentrações de substrato, a pH 8,0 e 37°C.....	100
Figura 4.15: Gráfico de Arrhenius – Efeito da temperatura na velocidade de reação.....	101
Figura 4.16: Acompanhamento da atividade enzimática de PGA após diferentes períodos de incubação a 60°C.....	102
Figura 4.17: Acompanhamento da atividade enzimática de PGA após diferentes períodos de incubação a pH 11,0.....	102

Nomenclatura

CCT	Coleção de Culturas Tropicais
IAPAR	Instituto Agronômico do Paraná
FAT	Fundação André Tosello
PGA	Penicilina G Acilase
6-APA	Ácido 6-aminopenicilânico
6-ACA	Ácido 6-aminocefalosporânico
AFA ou PAA	Ácido fenilacético
μ	Velocidade específica de crescimento
$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade máxima específica de crescimento
UI	Unidades internacionais
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima
K_m	Constante de Michelis-Menten
AEH	α – aminoácido éster hidrolase
C_x	Concentração celular
C_s	Concentração de substrato
S	Concentração de substrato limitante
K_s	Constante de saturação de Monod
E_a	Energia de ativação
ΔG	Energia livre de Gibbs
K_{eq}	Constante de equilíbrio
P	Concentração de produto
v_0	Velocidade inicial de consumo de substrato
aa	Aminoácidos
Meio NA	Meio Nutriente Ágar
Meio LB	Meio Luria - Bertania
MC	Meio de crescimento
MP	Meio de produção
A.E.	Atividade Enzimática
pH_i	pH inicial
AMM	Água de maceração de milho
O.D.	Oxigênio dissolvido
G.H.	Grau de hidrólise
C_{PenG}	Concentração de penicilina G

1 INTRODUÇÃO

As enzimas têm sido usadas em sua forma nativa há séculos na indústria de alimentos, e mais recentemente, graças a avanços tecnológicos, nas indústrias farmacêutica e química. A grande preocupação ambiental desencadeou uma procura intensa por outras alternativas, as chamadas "tecnologias limpas". As enzimas são uma dessas tecnologias que irão, gradativamente, substituir muitos componentes químicos utilizados nos processos industriais atuais. Isso demonstra o grande poder de minimização de problemas ambientais oferecido pelas enzimas, devido às suas características, que podem ser resumidas em: capacidade de trabalhar em baixas temperaturas e condições amenas; substituição de condições e componentes químicos perigosos resultando em economia de energia e diminuição da poluição; alta especificidade, não produzindo efeitos inesperados no processo de produção; são empregadas no tratamento de resíduos biológicos e; por serem biodegradáveis, as enzimas são facilmente absorvidas pela natureza.

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 assunto é de grande atualidade e vem sendo objeto de intensa pesquisa acadêmica e industrial (Bruggink et al., 1998), em particular o do grupo de pesquisa Engenharia dos Processos Enzimáticos da UFSCar.

A Penicilina G Acilase (PGA) é um eloqüente exemplo de substituição progressiva de processo químico por enzimático, sendo a segunda enzima mais usada industrialmente no mundo na forma imobilizada, abaixo somente da glicose isomerase (Ospina, 1992). A principal aplicação da penicilina G acilase (PGA) é na hidrólise da penicilina G e cefalosporina para a produção dos ácidos 6-aminopenicilânico (6-APA) e 7-aminocefalosporânico (7-ACA), que são compostos chave na produção industrial de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos, tais como ampicilina, amoxicilina e cefalexina. Esses antibióticos têm ampla aplicação como agentes terapêuticos, o que faz com que venha crescendo a produção mundial do 6-APA (Shewale e Sivaraman, 1989). Estima-se que mais de 88% do 6-APA produzido mundialmente é obtido enzimaticamente por PGA. (Rajendhran et al., 2004).

Penicilina G acilase pode ser produzida por diferentes microrganismos, dentre eles destacam-se a *Escherichia coli* e *Bacillus megaterium*, que é um dos poucos que a produz de modo extracelular, simplificando assim os procedimentos de separação e purificação.

A produção de PGA por *Bacillus megaterium* vem sendo estudada há tempos na área de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar em busca do aumento da concentração final da enzima no meio de cultivo. Diversos trabalhos no tema já foram desenvolvidos, enfocando diferentes aspectos da produção e purificação da enzima (Pinotti, 2003; Souza, 2003; Silva, 2003; Nucci, 2003).

Embora nunca tenha sido reportada na literatura como produtora da enzima, a bactéria *Xanthomonas campestris* já foi amplamente estudada como produtora de goma xantana, um polissacarídeo de alto valor comercial. Pinotti, 2003, em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, ao estudar a produção de PGA por *Escherichia coli* recombinante, identificou que a sequência genética que codifica a penicilina acilase também estava presente no DNA de *X. campestris*, fato este que motivou a realização de testes de produção da enzima por este microrganismo.

A busca por altas produtividades aliadas a baixos custos de processo tem incentivado, além do estudo de diferentes linhagens para produção da enzima, a otimização das condições operacionais. Neste contexto, investigou-se também neste trabalho, a produção extracelular de PGA por *Bacillus megaterium*.

Assim, os objetivos deste trabalho foram:

- A) Produção de PGA por *Xanthomonas campestris* em câmara rotativa;
- B) Padronização do tempo de cultivo e concentração celular na etapa de crescimento do *Bacillus megaterium*;
- C) Otimização das condições de cultivo para produção de PGA por *Bacillus megaterium* em câmara rotativa:
 - pH inicial
 - temperatura

- composição de meios de cultivo

D) Produção de PGA por *Bacillus megaterium* em Biorreator:

- Influência da concentração de oxigênio dissolvido
- Influência da adição de nutrientes na forma de pulsos

E) Caracterização da PGA de *Bacillus megaterium* quanto à:

- Temperatura ótima
- pH ótimo
- Estabilidade térmica
- Estabilidade a pH alcalino
- Energia de ativação
- Parâmetros cinéticos ($V_{\text{máx}}$ e K_m)

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Penicilinas

2.1.1 Breve Histórico

Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de microrganismos, que inibem o processo de crescimento de outros microrganismos, inclusive quando utilizados em baixas concentrações. Eles interferem no metabolismo celular e por mecanismos diversos levam a interrupção da atividade das células, inibindo seu crescimento ou eliminando os microrganismos patogênicos.

Em 1929, Alexander Fleming, em seu laboratório no Saint Mary's Hospital de Londres, descobriu um agente antibacteriano produzido por um *Penicillium*. Quando observava algumas colônias de estafilococos que cresciam em placas de ágar que se haviam contaminado com fungos do ar, notou que as colônias nas vizinhanças de um fungo se mostravam translúcidas. Elas estavam sofrendo um processo de lise. Fleming fez crescer o *Penicillium* sobre a superfície de caldo nutriente e verificou que uma substância antimicrobiana era secretada no meio. A essa substância deu o nome de Penicilina.

Essa descoberta representou para a biotecnologia a introdução de um novo produto comercial, de uso terapêutico, além dos tradicionais alimentos e bebidas para o consumo de homens e animais.

Em 1940, Chain *et al.* publicaram trabalho sobre as propriedades químicas, farmacológicas e quimioterápicas da substância produzida pelo fungo e descrita por Fleming. Era um pó castanho, levemente solúvel em água, obtido do meio de cultura, que, mesmo não sendo puro, mostrou atividade antibacteriana muito alta e não parecia relacionar-se com qualquer substância quimioterápica em uso na época.

Foi na Inglaterra, em 1941, que a penicilina foi testada pela primeira vez em ser humano. Em 1942, iniciaram-se os testes clínicos nos Estados Unidos. Devido às péssimas condições impostas pelo estado de guerra, na Inglaterra, verificou-se a impossibilidade de se produzir a penicilina em grande escala naquele país. Em 1941, Howard Walter Florey e N. G. Heatley foram para os Estados Unidos e, nos laboratórios americanos, com a colaboração de Robert D. Coghill aperfeiçoaram as técnicas

britânicas e as aplicaram na manufatura industrial da penicilina naquele país. Em 1945, Fleming, juntamente com Florey e Chain ganharam o prêmio Nobel de medicina.

A descoberta da penicilina, o primeiro antibiótico que encontrou uso prático no homem, marcou o início de uma era que produziu grande número de tais substâncias. As primeiras penicilinas, biossintéticas ou naturais, ainda hoje estão em uso clínico. Outras, semi-sintéticas, com amplo espectro e melhores propriedades farmacocinéticas, foram paulatinamente sendo utilizadas (Ligon, 2004).

2.1.2 Estrutura Química

A estrutura básica das penicilinas é o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), que consiste em um anel tiazolidínico (2) com um anel β -lactâmico (1) condensado. A acilação do grupo amino presente na posição 6 do 6-APA gera as diferentes penicilinas, como mostra a Figura 2.1.

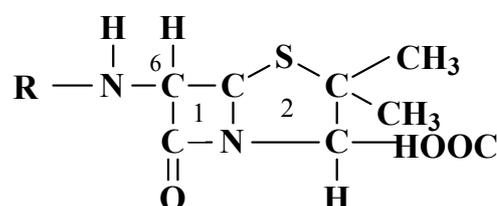


Figura 2.1 - Estrutura química do ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) com a porção variável acilada na posição 6.

O anel β -lactâmico é essencial para atividade antimicrobiana e a cadeia lateral determina o espectro de atividade e as propriedades farmacocinéticas do composto. Modificações estruturais da cadeia lateral da penicilina podem levar de algum modo a um aumento da estabilidade frente às β -lactamases e assim, expandir a atividade antibacteriana das penicilinas (Menezes *et al.*, 2000).

2.1.3 Classificação

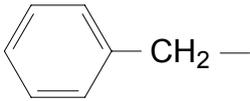
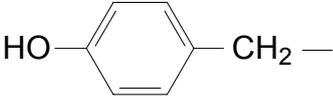
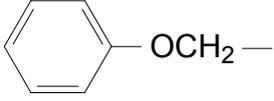
Dependendo da forma de obtenção, as penicilinas podem ser classificadas em biossintéticas ou semi-sintéticas.

2.1.3.1 Penicilinas Biossintéticas

As penicilinas biossintéticas, também chamadas de penicilinas naturais, são produzidas diretamente do cultivo de microrganismos.

A linhagem original usada para a produção de penicilina na ausência de precursor, produzia uma mistura das seis penicilinas listadas na Tabela 2.1. Os estudos sobre a elucidação da estrutura da penicilina, contudo, levaram ao estabelecimento que a produção de uma dada penicilina requeria o fornecimento da cadeia lateral respectiva (Menezes *et al.*, 2000).

Tabela 2.1 - Penicilinas biossintéticas (Menezes *et al.*, 2000)

Radical R	Penicilina Correspondente (Nome usual)
	Benzilpenicilina (Penicilina G)
	p-Hidroximetilpenicilina (Penicilina X)
	Fenoximetilpenicilina (Penicilina V)
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4$ —	n-Amilpenicilina (Dihidropenicilina F)
$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6$ —	n-Heptilpenicilina (Penicilina K)
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2$ —	2 Pentenilpenicilina (Penicilina F)
$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}_2$ —	3 Pentenilpenicilina

As penicilinas de maior interesse nesse grupo, por apresentarem importância terapêutica, são Penicilina V, fenoximetil penicilina, com o radical fenoxi acetila ligado ao 6-APA e a Penicilina G, benzil penicilina, com um radical fenil acetila ligado ao núcleo β -lactâmico.

A penicilina G pode ser obtida naturalmente em cultivos de *Penicillium chrysogenum* ou *Penicillium notatum* na presença do precursor ácido fenilacético ou fenil acetato de potássio. Além de sua atividade intrínseca como antibiótico, é também utilizada como matéria-prima para a produção dos antibióticos semi-sintéticos através da mudança no radical ligado ao grupo amino do 6-APA (Pelkzar *et al.*, 1986).

2.1.3.2 Penicilinas Semi-sintéticas

Em muitos casos as propriedades dos antibióticos naturais não são adequadas para aplicação terapêutica, sendo necessárias algumas melhorias como: maior atividade com igual ou menor toxicidade, menores efeitos colaterais, faixa antimicrobiana mais ampla, maior seletividade contra certos patógenos e melhores propriedades farmacológicas. Além disso, o uso indiscriminado de antibióticos tem sido responsável, em grande parte, pelo aumento da resistência de certos microrganismos aos agentes quimioterápicos (Schmidell, 2001).

Tentando contornar essa situação, foram sintetizados novos antibióticos, inclusive as penicilinas semi-sintéticas, sendo algumas altamente efetivas no combate às populações resistentes à penicilina, dentre elas metilcilina e nafcilina. Esses novos antibióticos apresentavam maior estabilidade, pouca afinidade com β -lactamases, melhor absorção, além de apresentarem menor número de efeitos colaterais e grande espectro de atuação antimicrobiana frente às penicilinas naturais (Cole, 1981).

Segundo Schmidell, 2001, aproximadamente 38% das penicilinas produzidas comercialmente são utilizadas em medicina humana, 12% em medicina veterinária e 43% como matéria-prima para a produção de penicilinas semi-sintéticas.

O desenvolvimento de penicilinas semi-sintéticas requer a produção do intermediário 6-APA obtido a partir da desacilação de penicilinas naturais, principalmente a penicilina G. Partindo do 6-APA é possível produzir uma grande quantidade de penicilinas semi-sintéticas, mediante uma acilação química com os cloretos correspondentes aos ácidos apropriados. Os produtos comerciais mais

conhecidos são ampicilina, propicilina, amoxicilina, cabenicilina, oxacilina entre outros (Vandamme *et al.*, 1984).

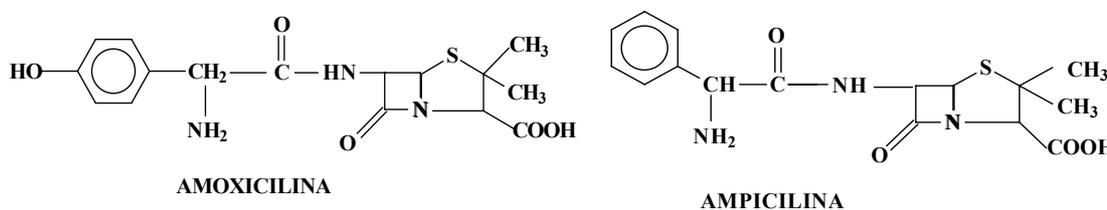


Figura 2.2 - Estrutura química de antibióticos semi-sintéticos.

A desacilação de penicilinas biossintéticas pode ser feita por via química ou enzimática. Os métodos químicos tradicionais são ecologicamente prejudiciais devido a sua alta carga poluente e requerem o uso de substâncias químicas perigosas. Em contrapartida, a conversão enzimática é estereo-específica, possibilitando aumentar o rendimento pela redução de subprodutos; a reação acontece em condições mais amenas e evita o uso de produtos tóxicos e reduz os custos de tratamento de efluentes. (Calleri *et al.*, 2004).

Estudos econômicos que comparam produção de 6-APA por processos químicos e enzimáticos indicam que a via enzimática é pelo menos 9% mais barata, podendo chegar a 20% ou mais se a produção por via enzimática for integrada a produção de penicilina G por fermentação (Parmar *et al.*, 2000).

2.2 Penicilina G Acilase (PGA)

Penicilina acilase foi primeiramente isolada a partir de *Penicillium chrysogenum* (Parmar *et al.*, 2000). As penicilinas mais importantes são as penicilinas G e V acilase. De acordo com a fonte a partir da qual a enzima acilase foi isolada, esta pode ser classificada em dois tipos: as penicilinas acilases provenientes de bactérias têm maior afinidade para hidrolisar a penicilina G, enquanto as penicilinas acilases provenientes de actinomicetos e fungos têm maior afinidade para hidrolisar penicilina V (Vandamme e Voets, 1974; Shewale e Sivaraman, 1989). A penicilina G acilase (PGA) é a mais comumente encontrada em aplicações industriais. Estima-se que mais de 88% do 6-APA produzido mundialmente é obtido enzimaticamente por PGA, e o restante por PVA (Rajendhran *et al.*, 2004).

Aplicações biotecnológicas das penicilinas acilases tem emergido como uma alternativa para processos químicos tradicionais: manufatura de antibióticos β -lactâmicos, pequenos peptídeos isômeros puros de misturas racêmicas (Calleri *et al.*, 2004).

O nome oficial da penicilina G acilase é penicilina amido hidrolase (E.C.3.5.1.11) e sua importância está na utilização como catalisador na hidrólise da penicilina G para obtenção de 6-APA e ácido fenilacético (AFA), em processo com enzimas imobilizadas (Savidge, 1984). A Figura 2.3 ilustra a hidrólise da penicilina G catalisada pela PGA para produção de 6-APA.

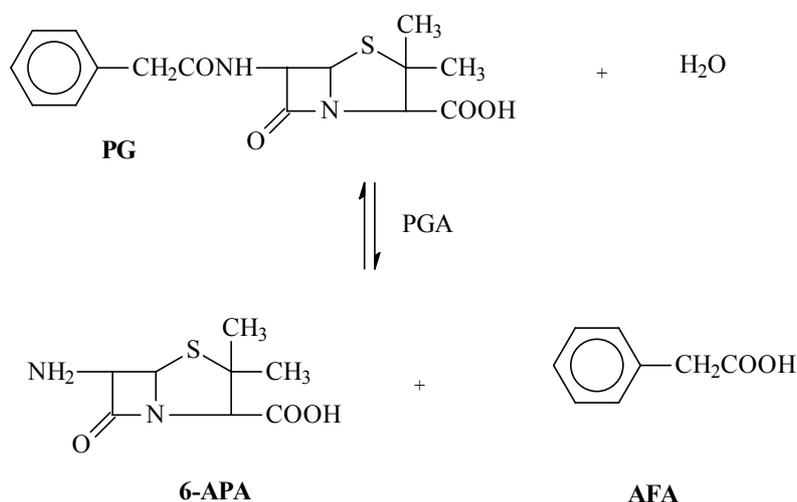


Figura 2.3 - Hidrólise enzimática da penicilina G

Penicilina G acilase é produzida por uma grande variedade de microrganismos, bactérias, fungos filamentosos e leveduras. Shewale *et al.*, 1989, citam 19 deles. As enzimas de bactérias gram-negativas, tais como *Escherichia coli*, *Kluyvera citrophila*, *Providencia rettgeri* e *Alcaligenes faecalis* permanecem acumuladas no espaço periplásmico enquanto que as PGAs de bactérias gram-positivas, *Arthrobacter viscosus* e *Bacillus megaterium* são secretadas para o meio fermentativo (Rajendharan, Gunasekaran, 2004).

Enzimas provenientes de diferentes microrganismos apresentam diferentes características e propriedades como massa molecular e afinidades pelo substrato, e valores de parâmetros cinéticos, tal como pode ser observado na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Comparação dos valores de K_m de penicilinas acilases provenientes de diferentes microrganismos reportados em literatura, utilizando-se penicilina G como substrato.

Microrganismo	Tipo de Enzima	K_m (mM)	Referência Bibliográfica
<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 14945	Extracelular	1,43	Souza <i>et al.</i> , 2005
<i>Mucor gryseocianum</i>	Extracelular	0,00018	José <i>et al.</i> , 2003
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Extracelular	0,00014	
<i>Escherichia coli</i> ATCC 9637	Intracelular	7,7	Savidge e Cole, 1975
<i>Escherichia coli</i> NCIB 8743A	Intracelular	0,62	
<i>E. coli</i> NCIB 8743 ^A imobilizada	Intracelular	30,0	

Pesquisa e desenvolvimento na produção de PGA têm sido realizados principalmente com a enzima obtida de *E.coli*, apesar da produção ser intracelular, originando mais custos para sua recuperação. A purificação da enzima passa pela ruptura das células que pode ser feita por sonicação em escala de laboratório e em larga escala pela passagem das células em um homogeneizador industrial de alta pressão (Savidge e Cole, 1975). Uma alternativa é a utilização de microrganismos que produzam a enzima e a secretem para o meio de cultivo. O modo de produção da enzima extracelular torna particularmente interessante o estudo do processo de produção, pois as etapas de purificação tornam-se simplificadas e conseqüentemente menos caras.

2.2.1 Alternativas para Produção de Penicilina G Acilase

Estudos vêm sendo realizados na produção da PGA extracelular de *B. megaterium*, que é aplicada industrialmente na produção de antibióticos semi-sintéticos. Porém as informações são dispersas e protegidas por segredo industrial (Illanes, 1994).

A produção de PGA por *B. megaterium* foi iniciada há tempos na UFSCar, no Departamento de Engenharia Química. Diversos trabalhos foram desenvolvidos no tema, enfocando diferentes aspectos da produção e purificação da enzima. Os resultados obtidos até o momento permitiram aumento da produção desde

56 UI/L e 8,6 UI/g células, no início do estudo, para 900 UI/L e 257 UI/g células. Estudos de concentração e purificação da enzima permitiram se atingir 3000 UI/L, valores similares aos reportados na literatura (Ilanes *et al.*, 1994).

Contudo, ainda se faz necessário atingir níveis mais altos de concentração da enzima no meio de produção, de modo que na etapa posterior de concentração se consiga chegar a níveis equivalentes aos preparados de *E. coli* que têm sido doados para estudo - em torno de 200 UI/mL. Atingir essa meta requer assim não só continuidade dos estudos de meio e condições operacionais de produção de PGA com o microrganismo que vem sendo estudado até o momento, como também uso de outras abordagens.

Uma alternativa promissora é a produção de PGA recombinante usando linhagens clonadas (Martín *et al.*, 1995, Lin *et al.*, 2002), com o objetivo de aumentar a produção de PGA em microorganismos portadores do gene *pac*.

O microrganismo mais utilizado para a produção de proteínas recombinantes é a *E. coli* uma vez que sua informação genética é bem conhecida. Este tipo de bactéria tem sido utilizado em estudos com diferentes abordagens, tais como: a otimização da produção de PGA recombinante em culturas de alta densidade celular e cultivo em bioreatores (Lin Y-H *et al.*, 2002; Deak *et al.*, 2003), produção de PGA de outros microorganismos (Cai *et al.*, 2004), análise da atividade enzimática e enovelamento das subunidades α e β produzidas separadamente ou não (Burtscher & Schumacher, 1992; Flores *et al.*, 2004), estudo da estabilidade segregacional de plasmídeos recombinantes relacionando a estabilidade do plasmídeo à produção da enzima (Grafkova *et al.*, 2002; Valesová *et al.*, 2004) e análise da atividade enzimática de PGA recombinante permeabilizada com diferentes solventes orgânicos (De Leon *et al.*, 2003). Ainda, De Leon *et al.*, 2003 estudou o efeito da tensão do oxigênio dissolvido na produção de penicilina acilase recombinante em *E. coli* JM101, utilizando vetor de expressão pPA102.

Martín *et al.* (1995) subclonaram e expressaram a PGA de *B. megaterium* ATCC14945 em *E. coli*. Os autores não observaram a secreção da enzima recombinante sugerindo que o peptídeo sinal contido na seqüência do gene *pac* do bacilo não é reconhecido pela maquinaria enzimática de secreção da *E. coli*.

Yang e colaboradores (2001) subclonaram o gene da PGA do *B. megaterium* AC8904 em *Bacillus subtilis* WB600 utilizando um vetor de expressão sob controle do promotor P43. A linhagem recombinante não precisou nem da indução com ácido fenil acético e nem da termoregulação durante o processo de fermentação da PGA a 37° C em pH 7.0. A enzima recombinante produzida no bacilo foi secretada e atingiu um nível de expressão de 40U/ml sob condições otimizadas. A PGA purificada apresentou uma atividade específica de 45U/mg de proteína. Os valores atingidos, segundo os próprios autores ainda são baixos para uma escala de produção industrial.

Outra abordagem é busca de novos microrganismos produtores de PGA. Pinotti, 2003, ao estudar a produção de PGA por *E. coli* recombinante, identificou que a seqüência que codifica a penicilina acilase também está presente no DNA de *Xanthomonas campestris*. Esse fato motivou a realização de um ensaio preliminar em câmara rotativa inoculado com uma linhagem desse microrganismo doada pelo Departamento de Genética e Evolução da UFSCar. Nesse ensaio, uma enzima produzida extracelularmente apresentou atividade catalítica na hidrólise de penicilina G, sugerindo que *X. campestris* seria um microrganismo promissor nos estudos de produção de PGA.

2.2.2 Produção de PGA por *Bacillus megaterium* no DEQ/UFSCar

Dada a importância do processo de produção de PGA e escassez de informações nesse sentido, o DEQ/UFSCar criou uma linha de pesquisa nessa área e há tempos vem desenvolvendo trabalhos que possibilitem o entendimento do processo e formação de pesquisadores qualificados. O primeiro desses trabalhos, realizado por Hojo, 1997, estudou a influência da composição do meio de cultura (glicose, caseína hidrolisada enzimaticamente, ácido fenil acético, AFA, e carbonato de cálcio), utilizando planejamento central composto para correlacionar a atividade enzimática com as variáveis estudadas, o que permitiu otimização do meio através da análise canônica da superfície de resposta. As fermentações em biorreator utilizando o meio otimizado mostraram que a excreção da enzima é dependente das condições operacionais do processo (concentração de oxigênio dissolvido, controle de pH e adição de AFA). A produção de PGA chegou em torno de 250 UI/L, valores semelhantes aos obtidos por Illanes *et al.*, 1994.

No segundo trabalho realizado no departamento, Berazaín, 1997, estudou a aplicação do soro de queijo como fonte de carbono na produção de PGA, visando aliar a redução do custo de produção da enzima à diminuição da carga poluente nos rios, causada por rejeitos de laticínios, já que apenas 60% desses rejeitos são aplicados na fabricação de produtos de consumo humano e animal, sendo o restante descartado, com quantias consideráveis de proteínas, gorduras, lactose e vitaminas. A máxima produção de enzima (180 UI/L) foi atingida para concentrações de 20,0 g/L de soro de queijo.

Visnardi, 1997, ao estudar a influência da concentração de oxigênio dissolvido mostrou haver uma forte correlação entre a concentração de O₂, crescimento celular e produção da enzima, conseguindo melhores resultados de produção da enzima (246 UI/L) em 36 horas de cultivo, com concentração de oxigênio dissolvido em torno de 20% do valor de saturação nas primeiras 12 horas e 10% a partir da 12^a hora de fermentação. O autor ajustou uma correlação do crescimento do microrganismo em função da velocidade de produção de CO₂ durante a fermentação e propôs um modelo matemático para o crescimento celular.

Pinotti, 1999 e 2003, verificou a influência das fontes de nitrogênio e carbono, utilizando diferentes meios de cultivo. Em relação à fonte de carbono, a cepa utilizada apresentou maior sensibilidade à repressão por lactose que a utilizada por Hojo, 1997. Com diferentes fontes de lactose (soro de queijo em pó, “in natura” e lactose PA) a produção da enzima aumentou quando utilizado soro de queijo como fonte de carbono ao invés da lactose, o que mostrou que os micronutrientes presentes no soro de queijo são importantes na produção de PGA. Quanto à fonte de nitrogênio, os melhores resultados (138 UI/L) foram obtidos utilizando caseína hidrolisada com Alcalase[®], onde se obtinha maior disponibilidade de aminoácidos e pequenos peptídeos para o microrganismo.

Souza, 2003, estudou os requerimentos nutricionais do *B. megaterium*. Foram investigados os efeitos da substituição do hidrolisado de caseína pelos aminoácidos. Os resultados dos ensaios realizados em frascos agitados mostraram que nenhum dos 18 aminoácidos que compõem o meio é essencial ao crescimento e à produção da enzima, e que concentrações acima de 10,0 g/L inibem a síntese de PGA. Também foi testada a influência dos diferentes componentes do soro de queijo,

verificando-se que a sua substituição por componentes individuais, embora permita crescimento celular, não favoreceu a expressão da enzima.

Silva, 2003, monitorando em tempo real variáveis do processo em biorreator acoplado a um sistema de aquisição de dados, implementou um algoritmo de inferência baseado em redes neurais, propondo três modelos cinéticos para descrever o crescimento do *B. megaterium*, consumo de substrato e produção da enzima.

Nucci, 2003, estudou a aplicação da lógica “Fuzzy” utilizando variáveis adquiridas em tempo real para determinação do ponto de máxima concentração de enzima.

Souza *et al.*, 2005, caracterizaram a PGA produzida por *B. megaterium* ATCC 14945, confirmando que a enzima é constituída de duas sub-unidades α e β , 245 e 537 aminoácidos respectivamente, com massas moleculares médias de 26950 e 59070 Da, respectivamente, informações estas já estabelecidas por Martín, 1995. A temperatura e pH ótimos foram de 37°C e 8,0, respectivamente. Mostraram que o modelo de Michaelis-Menten representou bem a cinética da reação, com valores de parâmetros estimados de 1,83 mM para K_m e $V_{m\acute{a}x}=0,165.10^{-3}$ mmol/min/UI.

Silva *et al.*, 2006, realizaram ensaios em biorreator com meio de cultivo composto pelos 18 aminoácidos livres, temperatura controlada em 30°C e oxigênio dissolvido em 20%. Concluíram que o uso de batelada alimentada promoveu um aumento na produção da PGA, alcançando valor de atividade enzimática igual a 200 UI/L, com consumo preferencial de alguns aminoácidos.

Pinotti *et al.*, 2006, mostraram que glicerol e glicose reprimem a produção de PGA por *Bacillus megaterium*. Foi concluído que o ácido fenilacético (PAA) realmente atua como indutor na produção da enzima e o soro de queijo aumenta significativamente o crescimento do microrganismo e produção da PGA. Os resultados deste trabalho provaram que a substituição do hidrolisado de caseína por 10,0 g/L da solução de aminoácidos livres aumenta a atividade enzimática no meio em aproximadamente 150%. Além disso, concluíram que nenhum dos 18 aminoácidos é essencial para a produção da enzima e que os 8 aminoácidos consumidos preferencialmente conduzem aos mesmos níveis de enzima obtidos usando-se os 18 aminoácidos. Verificou-se também um efeito inibitório quando a concentração da solução dos 18 aminoácidos é aumentada.

2.3 *Xanthomonas campestris*

Bactérias fitopatogênicas são agentes causais de numerosas doenças de plantas, algumas de grande significado econômico e social. No Brasil, em particular no Estado de São Paulo, verifica-se a ocorrência de bactérias de vários importantes gêneros, como é o caso de *Acidovorax*, *Burkholderia*, *Clavibacter*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Xylella*.

Dentre estes, adquire especial importância algumas espécies e patovares do gênero *Xanthomonas*. Como exemplo, pode-se citar a *X.campestris* pv. *campestris*, que teve seu genoma seqüenciado no Brasil devido a ser o patógeno de plantas causador da podridão negra, que é o escurecimento do tecido vascular, com necrose. Essa doença afeta principalmente as plantas crucíferas como *Brassica* e *Arabidopsis*, e se desenvolve em altas temperaturas e umidade, sendo responsável por grandes perdas de lavoura no verão (Gottwald e Graham, 2000; Meinhardt *et al.*, 2003).

O gênero *Xanthomonas* é um bacilo pertencente ao grupo das γ -Proteobactérias gram-negativas (Vauterin *et al.*, 1995). Suas células são retas e alongadas, normalmente medindo 0,4 – 0,7 μm de largura e 0,7 – 1,8 μm de comprimento. Possui mobilidade através de um único flagelo polar e é obrigatoriamente aeróbio. Suas colônias são abundantes, arredondadas, lisas e translúcidas amareladas e produzem um pigmento característico responsável pela cor amarela, chamado xantomonadina. O crescimento rápido de *Xanthomonas campestris* produz colônias visíveis a partir de uma única célula em 24-36 h a temperatura de 25°C e, em duas ou três semanas, surgem colônias com 1 mm de diâmetro (Bradbury, 1984). Este grupo de bactérias fitopatogênicas de grande importância econômica se caracteriza por apresentar uma surpreendente diversidade patogênica e uma constante uniformidade fenotípica, razão pela qual esse microrganismo tem sido objeto de muitos estudos taxonômicos (Mooter E Swing, 1990; Vauterin *et al.*, 1995). A Figura 2.4 ilustra uma micrografia de *X. campestris*.

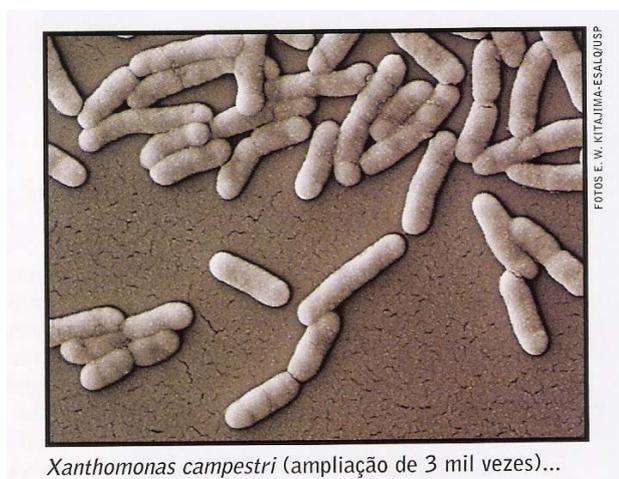


Figura 2.4 - *X. campestris* (Revista “Pesquisa FAPESP”- no. 76, junho 2002- pag.41)

Vários autores têm estudado a influência da temperatura no crescimento do microrganismo, no intervalo de 22-35°C. A temperatura ótima encontrada foi de 28°C (Santos, 1993 apud García-Uchoa *et al.*, 2000).

Esse microrganismo é utilizado industrialmente na fabricação de um polissacarídeo natural de alta massa molecular e importante biopolímero industrial, a goma-xantana. Devido à sua alta viscosidade e pseudoplasticidade única em solução em um grande intervalo de temperatura e pH, a goma-xantana é amplamente utilizada como espessante e estabilizante nas indústrias farmacêutica e alimentícia. É produzida industrialmente por cultivos puros de *X. campestris*, em meios bem aerados contendo carboidratos, fonte de nitrogênio e traços de elementos essenciais (Bradbury, 1984).

Devido à grande importância econômica da goma-xantana, as condições operacionais para sua produção têm sido bastante estudadas e estão definidas. Porém, é necessário definir as condições operacionais ótimas de cultivo para a produção de PGA por *X.campestris*.

X.campestris produz grande variedade de enzimas, incluindo uma faixa de enzimas extracelulares tais como proteases, pectinases e endoglucanases, que são capazes de degradar os componentes da matriz extracelular das plantas (Barreras, et al. 2004).

Blinkovsky e Markaryan, 1993, relatam estudos de purificação e caracterização de uma amidohidrolase isolada de *Xanthomonas* sp, D-Fenilglicil-beta-

lactamide amidohidrolase. Segundo os autores, essa enzima tem alta especificidade pelo substrato contendo grupo amino fenilacético na porção acil, caso de fenilglicina e p-hidroxi-fenilglicina, cadeias laterais para a produção de ampicilina e amoxicilina. Essa característica da enzima a distingue das amidohidrolases de *E.coli* e *B.megaterium*, que somente aceitam as formas ativadas das cadeias laterais (ésteres ou amidas) como substrato.

Barends *et al.*, 2003; 2004, estudaram a estrutura da enzima α -aminoácido éster hidrolase (AEH) de *Xanthomonas citri*, que catalisa a hidrólise e síntese de ésteres e amidas com α -aminoácidos exclusivamente. Esta enzima pode sintetizar antibióticos β -lactâmicos de compostos acil e núcleos β -lactâmicos obtidos de hidrólise de antibióticos naturais e possuem a vantagem de não atacar a ligação amida do β -lactâmico. Como as AEHs requerem um grupo α -amino como substrato, elas não são inibidas pelo ácido fenilacético. A estrutura da AEH de *X. citri* mostra uma peculiar forma tetramérica esférica, que permite somente ação enzimática sobre pequenas moléculas.

2.4 *Bacillus sp*

Os membros do gênero *Bacillus sp* são encontrados em ambientes bastante diversos como em solo, ar, poeira, alimentos desidratados, água marinha, sedimentos de peixes, ou até mesmo em ambientes tóxicos como herbicidas. São bactérias gram positivas, possuem forma cilíndrica ovalada, podendo apresentar diferentes dimensões dependendo do meio de cultura. Em ágar possuem diâmetro em torno de 1,5 μm , e em meio que contenha carboidratos pode assumir dimensões a partir de 3,0 μm . Têm capacidade de produzir esporos de formas ovaladas ou alongadas em condições ambientais pouco adequadas ao crescimento vegetativo (Hong, 2005; Vary, 1994; Bergey, 1974).

Em ágar nutriente, crescem de forma ordenada, podendo algumas vezes apresentar rugosidade. Quando cultivados em meio de cultura por tempo prolongado, sua coloração pode variar desde uma tonalidade marrom até preta. A temperatura ótima de crescimento está entre 28° e 35°C, não ocorrendo crescimento algum a temperaturas acima de 45°C. O pH ótimo está em torno de 7,0 a 8,5, não ocorrendo crescimento a pH 5,0 ou menor (Bergey, 1974).

São microrganismos importantes para pesquisas e aplicações industriais por serem utilizados em vários processos médicos, farmacêuticos e agrícolas que tiram vantagem da sua ampla gama de características fisiológicas e sua habilidade de produzir uma variedade de enzimas - como as amilases, quitinases, celulases, proteases e xilanases - anticorpos e outros metabólitos (Sinchaikul, 2002; Michel, 2002).

A formação de esporos ocorre geralmente durante a fase estacionária em resposta às condições metabólicas. Quando nutrientes como carbono ou nitrogênio tornam-se limitantes, endósporos altamente resistentes são formados dentro da célula-mãe. Embora endósporos não sejam metabolicamente ativos, eles podem sobreviver a longos períodos de escassez nutricional e são resistentes a altas temperaturas, radiação e substâncias tóxicas (Black, 1996). Os esporos de várias espécies de *Bacillus* têm sido utilizados como biopesticidas, ou pesticidas naturais, como uma alternativa segura e ambientalmente correta aos pesticidas tradicionais, em vacinas veterinárias e produtos probióticos (Nicholson, 2002).

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

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 1,5-2,0 μm), origem de seu nome (Vary, 1994). Células vegetativas mostram-se como cilindros com extremidades arredondadas; esporos mostram-se elipsoidais ou centrais; seu crescimento em slant é abundante, liso, com aparências gordurosas, translúcidas para opaco, branco leitoso; crescimento em placas mostra formação de colônias circulares, superfície rugosa, margens levemente onduladas, aspecto macio, não espalhado, branco leitoso para amarelado e levemente aderente. É aeróbio, não apresentando crescimento anaeróbio em glicose. A partir da análise de resultados de germinação de 21 distintas linhagens de *B. megaterium* em diferentes condições Vary, 1994, conclui que há no mínimo dois tipos diferentes desse microrganismo, que são distinguíveis não apenas pela morfologia do esporo, mas também pela resposta aos agentes germinantes.

2.5 Cinética de Processos Fermentativos

Microrganismos são sistemas complexos, que podem adaptar seu metabolismo a um grande número de condições ambientais (físicas, químicas e nutricionais) e conseqüentemente mostram vários comportamentos. Sendo assim, o crescimento microbiano pode ser visto a partir de várias perspectivas e com variado grau de complexidade, dependendo da distinção entre células individuais dentro do reator ou do exame das reações metabólicas individuais ocorrendo dentro da célula (Silva, 2003).

O estudo cinético de um processo fermentativo consiste na análise da evolução dos valores das concentrações de um ou mais componentes do sistema de cultivo, em função do tempo de fermentação. Esses componentes são: o microrganismo, os produtos do metabolismo e os substratos que compõem o meio de cultura.

2.5.1 Fases do Crescimento Microbiano

Quando monitora-se um processo batelada típico, diversas fases de crescimento podem ser observadas. A Figura 2.5 mostra essas etapas.



Figura 2.5 - Curva de crescimento típico para cultivo de células em batelada

Após a inoculação das células no meio de cultura, há um período no qual pouco ou nenhum crescimento ocorre. Este é considerado como uma fase de adaptação (fase “lag”). Nesta fase a biomassa inoculada se adapta às novas condições químicas e físicas, reorganizando seus constituintes moleculares quando é transferida para um novo meio (Shuler e Kargi, 1992). A fase de adaptação pode resultar de diversos fatores. Se o inóculo cresce em um meio contendo uma fonte de carbono diferente da anterior, novas

enzimas podem ser induzidas para o catabolismo do novo substrato, contribuindo assim para uma maior duração da fase “lag”. Baixas concentrações de alguns nutrientes e de fatores de crescimento também contribuem para a ocorrência desta fase. No fim da fase “lag” a população de microrganismos está bem adaptada ao novo ambiente. Depois deste período de adaptação, as células podem se multiplicar rapidamente e a massa celular aumenta exponencialmente com o tempo sem nenhum indício de inibição. Esta etapa é chamada de fase de crescimento exponencial, ou fase “log”. Este é um período de crescimento balanceado, no qual todos os componentes de uma célula simples permanecem com a mesma taxa, ou seja, a composição média de uma célula simples permanece constante. Assim permite-se concluir que a velocidade de crescimento é proporcional à concentração celular C_x . A velocidade de crescimento do microrganismo (eq. 2.1) é função de C_x e de μ , onde μ é a velocidade específica de crescimento das células.

$$\frac{dC_x}{dt} = \mu \cdot C_x \quad (2.1)$$

A velocidade específica de crescimento depende da concentração de substrato, C_s . O modelo de Monod propõe uma relação entre a velocidade específica de crescimento celular, μ , e a concentração de substrato limitante, S , que é expressa pela equação:

$$\mu = \frac{\mu_{m\acute{a}x} \cdot S}{K_s + S} \quad (2.2)$$

onde $\mu_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima específica de crescimento celular e K_s é a constante de saturação de Monod.

Na fase exponencial, a velocidade de crescimento só depende de C_x , pois C_s é alto. Assim, para altas concentrações de substrato $S \gg K_s \rightarrow \mu = \mu_{m\acute{a}x} = \text{cte}$

Integrando a equação (2.1), tem-se:

$$\ln C_x = \ln C_{x0} + \mu_{m\acute{a}x} \cdot t \quad (2.3)$$

que projetando-se num gráfico $\ln C_x$ versus t , obtém-se uma reta, característica do crescimento exponencial.

Valores de $\mu_{\text{máx}}$ variam com o tipo de microrganismo e os valores de K_s dependem da natureza do substrato.

Seguindo a fase de crescimento exponencial tem-se a fase estacionária, que é aquela onde a taxa de crescimento é zero (sem divisão celular) ou a velocidade de crescimento é igual á velocidade de morte.

Finalmente a fase de morte, onde não há mais crescimento e ocorre a lise celular com uma redução significativa das células viáveis (Lehninger, 2000).

A literatura reporta valores de $\mu_{\text{máx}}$ para *Escherichia coli* crescendo a 37°C em diferentes substratos limitantes tais como glicose, glicerol e lactose que variam de 0,8 a 1,4 h⁻¹ (Blanch e Clark, 1997). Já para *Bacillus megaterium*, os valores de $\mu_{\text{máx}}$ alcançam 0,60 h⁻¹ quando crescem em meio composto por aminoácidos e soro de queijo e 0,35 h⁻¹ para meios compostos por caseína hidrolisada enzimaticamente (Silva, 2003).

2.5.2 Influência das Condições do Meio no Crescimento Microbiano

O crescimento microbiano e a formação de produtos são resultantes da atividade fisiológica dos microrganismos e são fortemente influenciados pelas condições do meio, tais como, temperatura e pH (Shuler e Kargi, 1992). Assim, é de fundamental importância a otimização dessas variáveis.

A temperatura é uma importante condição, que pode afetar o desempenho das células. De acordo com sua temperatura ótima os microrganismos podem ser classificados em três grupos: psicrófilos ($T_{\text{ótima}} < 20^\circ\text{C}$), mesófilos ($T_{\text{ótima}}$ entre 20°C e 50°C) e termófilos ($T_{\text{ótima}} > 50^\circ\text{C}$). Conforme a temperatura vai aumentando em direção à temperatura ótima, a velocidade de crescimento dobra aproximadamente para cada 10°C. Porém, acima da temperatura ótima, a velocidade de crescimento diminui e morte térmica pode ocorrer. A temperatura pode afetar também a formação de produtos e o coeficiente de rendimento.

O pH, ou seja, a concentração de íons hidrogênio, pode afetar o crescimento microbiano, a formação do produto de interesse, o metabolismo de vários nutrientes e algumas atividades fisiológicas celulares. O pH ótimo para crescimento do

microrganismo não é necessariamente o mesmo de formação de produtos. Diferentes microrganismos apresentam diferentes pHs ótimos de crescimento, por exemplo, para maioria das bactérias a faixa de pH ótima é de 3,0 a 8,0. Muitos microrganismos têm mecanismos para manter o pH intracelular relativamente constante na presença de alterações no meio. O pH do meio de fermentação, durante o desenvolvimento do microrganismo, depende dos constituintes do meio de cultura e do próprio microrganismo. Pode variar por causa da produção ou consumo de ácidos ou bases orgânicas. O aumento do CO₂ dissolvido pode alterar significativamente o pH de alguns sistemas, por isso seu controle por meio de tampão ou de um sistema de controle ativo é de extrema importância (Silva, 2003).

Microrganismos aeróbios são dependentes do mecanismo da respiração para a geração de energia, por isso necessitam de oxigênio molecular como receptor de hidrogênio e elétrons. Devido à baixa solubilidade do oxigênio na água, é essencial a transferência contínua deste para o meio líquido de crescimento. Essa transferência se dá pela aeração do meio de cultura. Oxigênio dissolvido é um importante substrato em fermentações aeróbias e pode também ser um substrato limitante. O estudo desta variável é de extrema importância para que se tenha uma boa produtividade e deve ser considerada como um reagente indispensável, semelhante a outros presentes no meio reacional. Em altas concentrações celulares, a velocidade de consumo de oxigênio pode exceder a velocidade de fornecimento, levando a limitações deste. Quando o oxigênio é variável limitante, a velocidade de crescimento específico varia com sua concentração. (Stanbury *et al*, 1999).

2.6 Efeito da Composição dos Meios de Cultivo

Segundo Schmidell, 2001, a formulação adequada de meios de crescimento e meios de produção é pré-requisito para sucesso de fermentações. Os meios são desenvolvidos principalmente para maximizar o rendimento dos produtos e minimizar os custos. A escolha do meio interfere nos procedimentos de purificação e pré-tratamento, afetando o processo global.

O meio de cultivo deve prover quantidades suficientes de carbono, nitrogênio, minerais e outros nutrientes requeridos para render massa de célula e produtos.

Requerimentos nutricionais mínimos são estimados pela estequiometria de crescimento e formação de produtos. Em geral:

Fonte de C + Fonte de N + minerais + nutrientes específicos (hormônios, vitaminas) + O₂ → massa de célula + produto + CO₂ + H₂O.

A maioria dos nutrientes é fornecida a níveis acima das necessidades mínimas, no entanto, alguns nutrientes são requeridos em quantidades ínfimas, portanto, não sendo necessária sua adição ao meio de cultura, pois estão presentes como “contaminantes” da água ou em outros componentes do meio, são os elementos traços. Além desses, outros componentes orgânicos são requeridos também em pequenas quantidades por alguns microrganismos, considerados substâncias essenciais, já que não são sintetizados dos nutrientes disponíveis, são os chamados fatores de crescimento e a necessidade para tais nutrientes é resultante de uma via metabólica estar bloqueada ou ausente na célula. Os fatores de crescimento são divididos em purinas e pirimidinas, aminoácidos e vitaminas, sendo que eles são metabolizados diretamente como fontes de carbono ou energia, mas são assimilados para cumprir um papel específico no metabolismo da célula. Os aminoácidos são requeridos para síntese de proteínas e as purinas e pirimidinas para a síntese de ácidos nucleicos: DNA e RNA (Moo-Young e Chisti, 1994).

Devido à variedade de microrganismo, é difícil encontrar um meio universal que atenda às necessidades de todos os microrganismos, muitas vezes o que é requerido por um, inibe totalmente o crescimento de outros. Assim, para compor um meio adequado, é necessário conhecer algo a respeito do microrganismo. O desenvolvimento de meios sintéticos, com o intuito de verificar as verdadeiras exigências nutricionais dos microrganismos, vem sendo amplamente estudado, pois os meios complexos fornecem numerosos e desconhecidos nutrientes, suportando um bom crescimento, porém não elucidando as exatas necessidades nutricionais (Schmidell, 2001).

Illanes *et al.*, 1994, apresentaram resultados para a produção em fermentadores de PGA por *B. megaterium* em meios complexos e definidos. As melhores condições para indução por ácido fenilacético foram determinadas e a

excreção da enzima mostrou-se fortemente dependente da composição do meio. Os melhores resultados de atividade enzimática, 220 UI/L, foram atingidos utilizando-se meio complexo sem adição de glicose e concentração de 1,5 g/L do indutor ácido fenilacético.

Pinotti *et al.*, 2000, alcançaram maior produtividade de PGA por *B. megaterium* em câmara rotativa, 138 UI/L, utilizando caseína hidrolisada enzimaticamente e soro de queijo. Já Rajendran *et al.*, 2002, obtiveram máxima produtividade, 9,5 UI/mL, com meio otimizado composto por ácido fenilacético, triptona, extrato de levedura e sucrose.

2.7 Metabolismo celular

Segundo Lehninger, 1991, o metabolismo é uma atividade celular altamente coordenada, com propósitos determinados, e na qual cooperam muitos sistemas multienzimáticos. O metabolismo tem quatro funções específicas: (1) obter energia química pela degradação de nutrientes ricos em energia; (2) converter as moléculas dos nutrientes em unidades fundamentais precursoras das macromoléculas celulares; (3) reunir e organizar essas unidades fundamentais em proteínas, ácidos nucléicos e outros componentes celulares; (4) sintetizar e degradar biomoléculas necessárias às funções especializadas das células.

Cada tipo de célula tem necessidades características quanto às suas fontes de carbono, oxigênio e nitrogênio e quanto à sua fonte de energia. Assim, o metabolismo celular leva em conta as transformações enzimáticas da matéria e da energia, partindo de substâncias simples e chegando à biossíntese da matéria viva.

Os organismos podem ser classificados em dois grupos de acordo com a forma química do carbono que eles requerem do meio ambiente. As células autotróficas podem usar o dióxido de carbono da atmosfera como única fonte de carbono e construir todas as suas biomoléculas a partir dele. As células heterotróficas necessitam obter os átomos de carbono do meio ambiente na forma de moléculas orgânicas relativamente complexas, tais como a glicose.

Existem duas grandes classes de organismos heterotróficos: os aeróbicos e os anaeróbicos. Os anaeróbicos vivem expostos ao ar e usam o oxigênio molecular

para oxidar os nutrientes orgânicos, já os anaeróbicos vivem na ausência de oxigênio e degradam seus nutrientes sem o emprego deste (Lehninger, 1991).

O metabolismo pode ser dividido em catabolismo, a degradação das moléculas nutrientes ricas em energia, e anabolismo, a biossíntese de novos componentes celulares.

2.7.1 Vias Catabólicas e Anabólicas

O metabolismo é composto por duas fases: catabolismo e anabolismo. O catabolismo é a fase degradativa, em que as moléculas orgânicas nutrientes, carboidratos, lipídios e proteínas provenientes do meio ambiente ou dos reservatórios de nutrientes da própria célula são degradados por reações consecutivas em produtos finais menores e mais simples, como, por exemplo, ácido láctico, CO₂ e amônia. O catabolismo é acompanhado pela liberação da energia livre inerente à estrutura complexa das grandes moléculas orgânicas. Em certos passos de uma dada via catabólica a maior parte de energia livre é conservada na forma da molécula transportadora de energia adenosina trifosfato (ATP).

O anabolismo é também chamado de biossíntese, fase sintetizante ou construtiva do metabolismo. Nele, as pequenas moléculas precursoras, ou unidades fundamentais, são reunidas para formar as grandes macromoléculas componentes das células, como as proteínas e os ácidos nucléicos, requerendo fornecimento de energia através da quebra de ATP em ADP e fosfato.

O catabolismo e o anabolismo ocorrem simultaneamente nas células e a velocidade de cada um é regulada independentemente (Lehninger, 1991).

2.7.1.1 Degradação Oxidativa dos Aminoácidos

Durante o primeiro estágio do catabolismo, as proteínas são degradadas a apenas 20 aminoácidos, que na fase seguinte são convertidos principalmente em acetil-CoA e amônia (NH₃) (Lehninger, 1991).

Embora os aminoácidos funcionem principalmente como unidades fundamentais para a biossíntese das proteínas, eles podem sofrer degradação oxidativa em determinadas circunstâncias:

i) durante a dinâmica normal da degradação das proteínas do organismo, se os aminoácidos liberados não forem necessários para a síntese de novas proteínas;

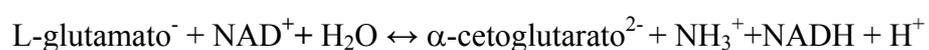
ii) quando há um excesso de aminoácidos com relação às necessidades de síntese de proteínas do organismo, o excedente pode ser catabolizado, pois estes não conseguem ser armazenados;

iii) quando os carboidratos não são disponíveis nem adequadamente utilizados, as proteínas do organismo são usadas como combustíveis.

Os grupos α -amino (NH_2) dos 20 aminoácidos comumente encontrados nas proteínas são removidos em algum estágio da sua degradação oxidativa. Se não utilizados para a síntese de novos aminoácidos ou outro produtos nitrogenados, estes grupos amino são coletados e convertidos em produtos finais de excreção. A remoção dos grupos α -amino da maioria dos L-aminoácidos é promovida pelas enzimas chamadas de transaminases ou aminotransferases. Nessas reações chamadas de transaminações, o grupo α -amino é enzimaticamente transferido do aminoácido ao carbono do α -cetoglutarato, formando o correspondente α -cetoácido, análogo ao aminoácido participante da reação, e provocando a aminação do α -cetoglutarato para formar o L-glutamato. O ponto central das reações de transaminação é coletar grupos amino provenientes de muitos aminoácidos diferentes na forma de apenas um, isto é, o L-glutamato. Desta forma, o catabolismo do grupo amino converge num único produto (Lehninger, 1991).



O glutamato sofre, então, deaminação oxidativa pela ação da L-glutamato desidrogenase, que requer NAD^+ como acceptor dos equivalentes redutores. Esta enzima é responsável pela maioria da amônia formada, pois o glutamato é o único aminoácido cujo grupo α -amino pode ser diretamente removido desta maneira e em altas velocidades.



Os esqueletos carbônicos dos diferentes aminoácidos são no fim convertidos em acetil-CoA, α -cetogluturato, succinil CoA, oxaloacetato ou fumarato, que entram em pontos específicos no ciclo do ácido cítrico, para formação de CO_2 e H_2O .

A alanina, cisteína, glicina, serina e treonina são degradados a acetil-CoA via piruvato. A treonina é degradada em glicina, que por sua vez, possui duas vias de transformação. Ela pode ser convertida em serina ou realizar clivagem oxidativa em CO_2 , NH_4^+ e um grupo metileno.

Parte dos esqueletos carbônicos dos aminoácidos fenilalanina, tirosina, lisina, triptofano e leucina produzem acetoacetil-CoA, que é então convertida em acetil-CoA. A via catabólica do triptofano possui várias ramificações que tornam possível, a partir de um único precursor, a formação de vários produtos, como a serotonina, um neuro-hormônio e o ácido nicotínico, uma vitamina. Já a fenilalanina e o seu produto de oxidação, a tirosina, são degradadas em dois fragmentos, ambos podendo entrar no ciclo do ácido cítrico, em pontos diferentes. Os aminoácidos arginina, histidina, ácido glutâmico, glutamina e prolina entram no ciclo via α -cetogluturato. Os esqueletos carbônicos da metionina, isoleucina e valina são, no fim, transformados por vias que produzem succinil-CoA (Lehninger, 1991).

2.7.1.2 Biossíntese dos Aminoácidos

Ainda segundo Lehninger, 1991, as vias biossintetizantes que levam aos 20 aminoácidos não são apenas numerosas, mas também complexas, e devem estar perfeitamente reguladas e coordenadas entre si, pois os diferentes aminoácidos devem ser sintetizados em proporções corretas e no tempo certo para as sínteses das proteínas.

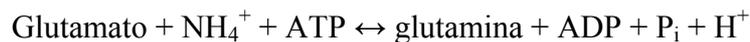
Os organismos vivos diferem consideravelmente com respeito à sua habilidade em sintetizar os 20 diferentes aminoácidos e também quanto às formas de nitrogênio utilizadas como seus precursores. Por exemplo, os seres humanos podem sintetizar apenas 10 dos 20 aminoácidos necessários como unidades fundamentais na biossíntese das proteínas, os chamados aminoácidos não-essenciais. Os outros 10 devem ser obtidos a partir da dieta e são denominados aminoácidos essenciais. Os microrganismos podem sintetizar todos os aminoácidos necessários para a síntese de proteínas, a partir de precursores simples.

O ácido glutâmico (glutamato) é formado a partir da amônia e do α -cetoglutarato, pela ação da L-glutamato desidrogenase.



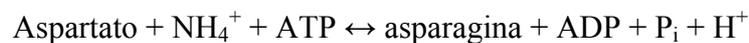
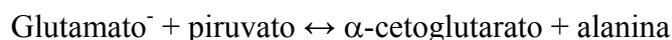
Esta reação é de importância fundamental na biossíntese de todos os aminoácidos, pois o glutamato é o grupo amino doador na síntese de outros aminoácidos através de transaminações.

A prolina é um derivado ciclizado do glutamato, enquanto a glutamina é também formada a partir deste pela ação da glutamina sintetase.



Esta é também uma reação central importante no metabolismo dos aminoácidos, pois é a principal via para a conversão da amônia livre, que é tóxica, em glutamina.

A alanina e o ácido aspártico (aspartato) originam a partir do piruvato e do oxaloacetato, respectivamente, por transaminações a partir do glutamato. Em muitas bactérias o ácido aspártico é o precursor direto da asparagina numa reação catalisada pela asparagina sintetase.



A tirosina é formada via hidroxilação da fenilalanina pela fenilalanina oxigenase. Já a cisteína é sintetizada a partir de dois outros aminoácidos, a metionina e a serina, sendo este também precursor da glicina.

As vias que levam à síntese dos aminoácidos essenciais são geralmente longas e mais complexas do que aquelas que levam aos aminoácidos não essenciais. As mais elaboradas das vias dos aminoácidos são aquelas que levam à fenilalanina, ao triptofano e à histidina, que possuem benzeno ou anéis heterocíclicos.

Cinco dos aminoácidos essenciais para os animais são sintetizados pelas plantas e microrganismos, a partir dos não essenciais: a treonina, a metionina e a lisina são formadas a partir do ácido aspártico, e a arginina e a histidina, são formadas a partir do ácido glutâmico. A isoleucina é sintetizada por bactérias a partir do aminoácido não-essencial, treonina (Lehninger, 1991).

2.7.1.3 Aminoácidos como Nutrientes na Produção de PGA por *Bacillus megaterium*

Segundo Fisher, 1999, três proteínas regulatórias controlam a ação dos genes envolvidos no metabolismo do nitrogênio em *Bacillus subtilis*, em resposta a mudanças na disponibilidade de nutrientes. Cada um desses sistemas é ativo sob diferentes condições nutricionais. Uma delas reprime a expressão de genes necessários para metabolizar compostos nitrogenados quando as células estão crescendo com excesso de nitrogênio a outra, ativa ou reprime a transcrição somente durante o crescimento limitado por nitrogênio. Ou seja, se o metabolismo de *B. megaterium* for semelhante ao do *B. subtilis*, existe uma forte correlação entre a máxima produção de PGA e a concentração de aminoácidos no meio de cultivo, como foi reportado por Pinotti *et al.*, 2006, que concluíram que a substituição do hidrolisado de caseína por solução de aminoácidos 10,0 g/L aumentou a produção enzima em 150% e que expressão da PGA é mais fortemente afetada por altas concentrações de aminoácidos do que o crescimento celular.

Chaloupka *et al.*, 1965 e Votruba *et al.*, 1987, estudaram os fatores externos envolvidos na regulação da síntese de proteases em *B. megaterium* e concluíram que os aminoácidos reprimem a produção de proteases durante o crescimento do microrganismo em processos de batelada.

2.8 Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos, formados por longas cadeias de pequenas moléculas, os aminoácidos. São, portanto, um tipo de proteína com atividade catalítica, sendo encontradas na natureza em todos os seres vivos. Sua função é viabilizar a atividade das células, quebrando moléculas ou juntando-as para formar

novos compostos. A singularidade desses compostos decorre do elevado grau de especificidade ao substrato em condições moderadas, sob as quais atuam. Por exemplo, algumas enzimas são específicas para determinado tipo de ligação química, outras, para um tipo particular de isômero ótico (Furiga, 2001). As enzimas são proteínas biodegradáveis que tornam os processos de produção mais eficientes e menos dispendiosos e resultam em produtos de qualidade superior. Elas ajudam a proteger o meio ambiente, reduzindo a presença de produtos residuais e a necessidade do uso de químicos fortes (www.novozymes.com.br). A Tabela 2.3 apresenta uma comparação das enzimas com catalisadores químicos e a Figura 2.6 mostra as vantagens da utilização do processo enzimático na hidrólise da penicilina G.

Tabela 2.3 - Comparação das enzimas com catalisadores químicos

Característica	Enzimas	Catalisadores Químicos
Especificidade ao substrato	alta	baixa
Sensibilidade à T e pH	alta	baixa
Condições de reação (T,P e pH)	suaves	drástica (geralmente)
Custo de obtenção (isolamento e purificação)	alto	moderado
Consumo de energia	baixo	alto
Formação de subprodutos	baixa	alta
Separação catalisador/produtos	difícil/cara	simples
Atividade catalítica (T_{amb})	alta	baixa
Presença de cofatores	sim	não
Estabilidade do preparado	baixa	alta
Energia de ativação	baixa	alta
Velocidade de reação	alta	baixa

Em geral têm eficiência catalítica muito maior que a dos catalisadores sintéticos e funcionam em soluções aquosas e em condições muito suaves de temperatura e pH (Bailey, 1986). Algumas características importantes das enzimas podem ser citadas, tais como:

- São produtos naturais biológicos;
- Apresentam um alto grau de especificidade;
- Reações baratas e seguras;
- Possuem mecanismo de turnover, desempenhando, consecutivamente, a mesma função sem serem consumidas no processo;
- São altamente eficientes, acelerando a velocidade das reações catalisada;
- São econômicas, reduzindo a energia de ativação necessária para a reação catalisada;
- São biodegradáveis, sendo o lodo residual reciclado como biofertilizante;
- Não são tóxicas;
- Altamente eficientes: aumentam a velocidade de reação de 10^8 a 10^{11} vezes mais rápida;
- Condições brandas.

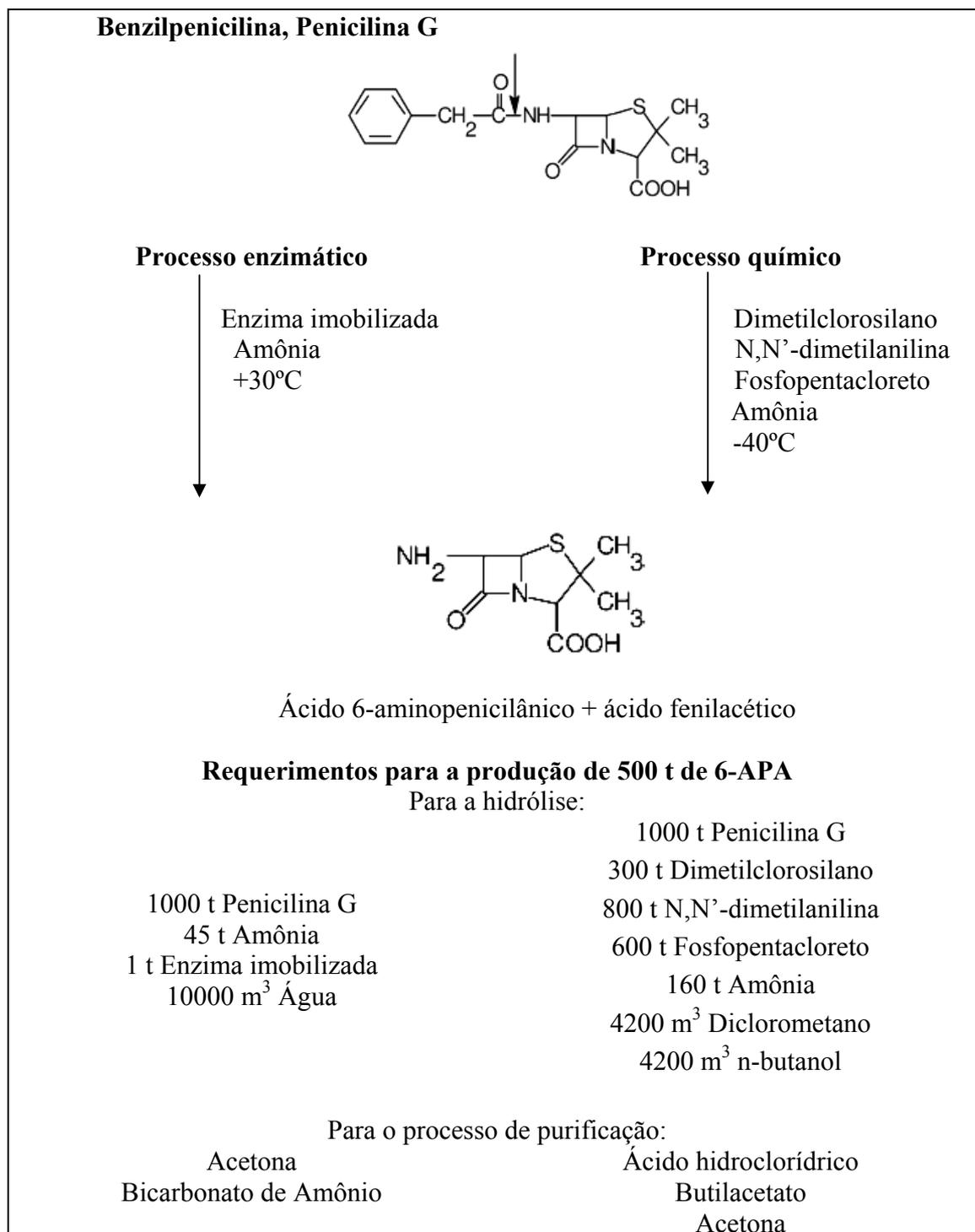


Figura 2.6 - Comparação de processo químico com processo enzimático na hidrólise da penicilina G mostrando as vantagens de sua utilização para este fim (Buchholz, *et al*, 2005).

2.8.1 Regulação da Produção de Enzimas

Segundo Illanes, 1994, as enzimas comerciais, primordialmente degradativas, estão sujeitas a dois tipos de controle:

Indução: Mecanismo característico da fase metabólica que opera a nível de síntese enzimática. Consiste em que certas enzimas, denominadas induzíveis, só são sintetizadas em resposta a um estímulo ambiental (indutor). O mecanismo genético de indução, postulado por Jacob e Monod tem sido comprovado nas enterobactérias, presumindo-se que não difere radicalmente em outros microrganismos onde o fenômeno de indução tem sido comprovado. Neste modelo se considera a existência de um gene controlador que produz uma enzima repressora que, na ausência de indutor, se encontrará em um lugar genético denominado gene operador, impedindo o acoplamento da enzima RNA polimerase desde seu sítio de união no DNA (gene promotor) até os genes estruturais, impedindo portanto a transcrição e tradução destes genes. Na presença de indutor, a proteína repressora será inativada, impedindo sua união ao gene operador, permitindo o acoplamento da enzima RNA polimerase até os genes estruturais e a transcrição e tradução subsequente destes genes.

Repressão catabólica: Mecanismo próprio da fase catabólica que também opera a nível de síntese enzimática. Permite à célula diferenciar entre os distintos substratos, reprimindo a síntese daquelas enzimas envolvidas no catabolismo de substratos mais dificilmente assimiláveis. Este mecanismo é de grande relevância na produção comercial de enzimas, pois os meios comerciais de cultivo usualmente possuem substâncias, como açúcares, capazes de exercer uma repressão catabólica sobre sua síntese. O mecanismo genético postulado propõe que a assimilação de um substrato rapidamente metabolizável (ex: glicose) provocaria a diminuição do conteúdo de AMP cíclico (regulando a atividade da enzima adenilato ciclase: $ATP \longrightarrow AMP \text{ cíclico} + PPi$), o qual é requerido no processo de transcrição dos genes estruturais que codificam a síntese das enzimas. O AMP cíclico atuaria como facilitador ou modulador positivo a nível de gene promotor, acoplando-se a uma proteína receptora específica.

A literatura reporta que a síntese de várias enzimas em muitas espécies do gênero *Bacillus* está sujeita a repressão catabólica por substratos facilmente

metabolizáveis tais como glicose e frutose (Szentirmai, 1963). Utilização de fontes de carbono tais como glicose e frutose auxiliam no crescimento com concomitante redução na produção de PGA.

A síntese de PGA por *B. megaterium* é induzida por ácido fenil acético (PAA) e reprimida por glicose (Savidge e Cole, 1975, Pinotti *et al.*, 2000 e 2006). Kim *et al.*, 2004, mostraram que o PAA é convertido ao complexo PAA – CoA (Coenzima A) e que este complexo inibe o PaaX, o repressor do operon do gene *pac*. Entretanto, o aumento na concentração do PAA no meio de cultivo, inibe a produção da enzima, como mostra a Figura 2.7.

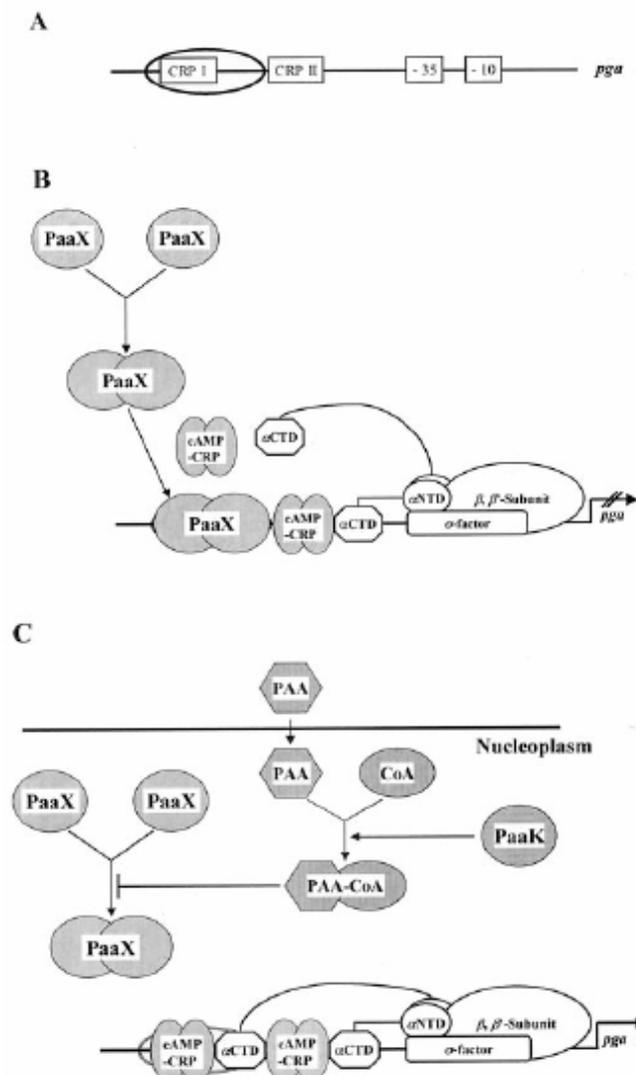


Figura 2.7 - Mecanismo de regulação da expressão gênica da PGA

Assim, a produção de PGA por microrganismos está sujeita a diferentes controles, envolvendo a síntese de várias enzimas reguladoras, cada qual com seu pH e temperatura ótima característica. Há assim valores ótimos para pH e temperatura de cultivo de um microrganismo que conduzam o conjunto das enzimas envolvidas na expressão da proteína de interesse ao seu melhor desempenho, sendo importante pois o estudo dessas variáveis para a produção da enzima.

2.8.2 Cinética Enzimática

2.8.2.1 Energia de Ativação

Segundo Bailey, 1986, energia de ativação é a energia mínima necessária para que uma molécula de reagente ou de substrato S alcance o estado de transição $S\cdots P^\ddagger$ para se tornar uma molécula de produto P.

Termodinamicamente falando, as enzimas são catalisadores biológicos que abaixam seletivamente essa energia de ativação das reações químicas vitais.

A velocidade da reação $S \rightarrow P$ depende do número de moléculas de S que alcançam o estado de transição por unidade de tempo. Na presença de uma enzima apropriada, a temperatura ambiente fornece uma quantidade suficiente de moléculas reagentes com a necessária energia de ativação. Uma reação catalisada por enzima pode processar a 25°C , 10^8 a 10^{11} vezes mais rapidamente que a mesma reação não catalisada.

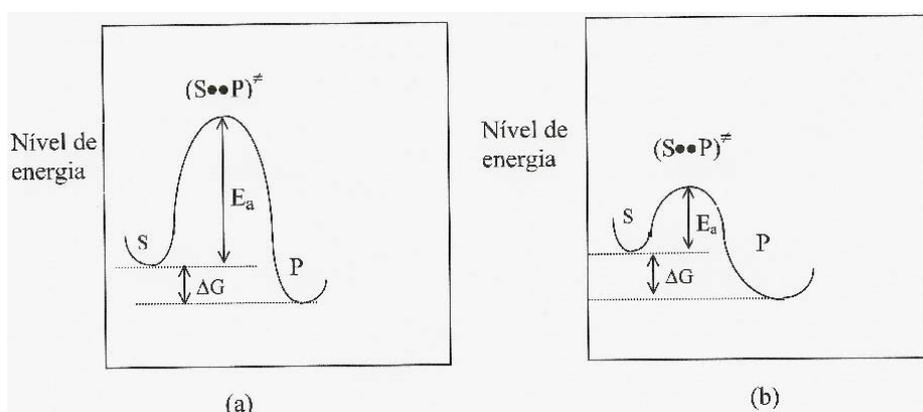


Figura 2.8 - ΔG e E_a de (a) uma reação não enzimática; (b) uma reação enzimática.

As enzimas não afetam o ΔG (energia livre de Gibbs) ou a K_{eq} (constante de equilíbrio) de uma reação. Elas simplesmente aceleram a velocidade com a qual a reação alcança o equilíbrio. A Figura 2.8 ilustra a ação de uma enzima na energia de ativação de uma reação.

Experimentalmente, sabe-se que diferentes reações apresentam energias de ativação diferentes e que as que exigem menor energia de ativação ocorrem mais facilmente, ou seja, com maior velocidade (Lehninger, 2000).

A literatura reporta os seguintes valores para energia de ativação na hidrólise de penicilina G por penicilina G acilase: 30,24 kJ/mol⁻¹ para enzima proveniente de *E. coli* (Kazan *et al.*, 1997) e 33,6 kJ/mol⁻¹ para a de *Micrococcus luteus* (Nam e Ryu, 1979)

2.8.2.2 Efeito da Concentração de Substrato

As reações químicas catalisadas por enzimas mostram um aspecto distinto que não se observa usualmente em reações não-enzimáticas, a saturação com o substrato. Na Figura 2.9 pode-se verificar o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade da reação catalisada por enzima $A \rightarrow P$

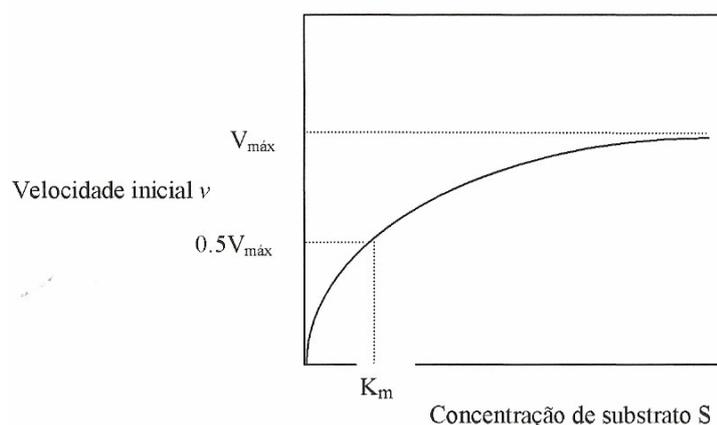


Figura 2.9 - Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima.

Em uma concentração baixa de substrato, a velocidade inicial da reação é aproximadamente proporcional à concentração do substrato [S]. Entretanto, à medida que a concentração de substrato aumenta, a velocidade inicial da reação se reduz, não sendo mais proporcional à [S]. Com um aumento posterior na concentração do

substrato, a velocidade da reação torna-se independente de [S], tornando-se praticamente constante. Nessa faixa de concentrações, considera-se a enzima como saturada pelo substrato.

A teoria de Michaelis Menten, fundamental para análise quantitativa de todos os aspectos da cinética enzimática, considera que a enzima E se combina primeiramente com o substrato S para formar o complexo enzima-substrato ES; este se rompe então, em uma segunda etapa para formar a enzima livre e o produto P.

A equação que traduz o comportamento da curva de velocidade inicial (v_0) em função da concentração de substrato [S], Figura 2.9, é a equação de Michaelis-Menten:

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (2.4)$$

onde:

v_0 = velocidade inicial de consumo de substrato;

$V_{m\acute{a}x}$ = velocidade máxima de consumo de substrato;

S = concentração de substrato;

K_m = constante de Michaelis-Menten.

O valor de K_m é característico e fornece um parâmetro da especificidade de uma determinada enzima em relação a um substrato específico. O parâmetro $V_{m\acute{a}x}$ indica a velocidade limitante de uma reação catalisada por uma enzima nas condições de saturação.

Uma forma precisa de se caracterizar uma reação enzimática quanto a seus parâmetros cinéticos é através do método das velocidades iniciais. Nesta abordagem, as velocidades são medidas para tempos reacionais curtos, ou seja, neste período apenas a concentração inicial de substrato estará influenciando a medida da velocidade, pois mesmo que haja inibição pelos produtos da reação ou que esta seja reversível, no curto tempo de reação considerado as concentrações de produtos serão muito pequenas podendo ser desprezadas, assim como a velocidade da reação reversa, considerando que o modelo clássico de Michaelis-Menten representa adequadamente a influência da concentração de substrato na velocidade da reação. O aumento da

concentração dos produtos em função do tempo, determinado para curto intervalo, permite a determinação da velocidade inicial da reação para cada concentração inicial de substrato, obtida a partir do coeficiente angular da reta ajustada aos pontos de concentração de produto em função do tempo. Conhecido o modelo cinético da reação, os parâmetros cinéticos podem ser obtidos ajustando-se o modelo aos pontos experimentais de velocidade inicial em função da concentração de substrato. Os valores dos parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$ que conduzirem ao melhor ajuste do modelo aos pontos experimentais serão aceitos como as melhores estimativas.

Cada sistema enzima-substrato apresenta valores característicos de velocidade de reação, expressa em termos dos parâmetros cinéticos K_m e $V_{m\acute{a}x}$ para condições específicas de pH e temperatura (Lehninger, 2000).

Savidge e Cole, 1975, estudaram a hidrólise da penicilina G e obtiveram valores de K_m iguais a 7,7 e 4,5 mM para PGA de *E. coli* e *B. megaterium*, respectivamente, a 37°C e pH 8,7.

Modesto, 2002, encontrou valor de K_m de PGA de *E. coli* igual a 1,48 mM a 37°C e pH 8,0. Já Souza *et al.*, 2005, ao caracterizarem a PGA de *B. megaterium* concluíram que o modelo de Michaelis-Menten representou bem a cinética da reação, com valores de parâmetros estimados de 1,83 mM para K_m e $0,165 \cdot 10^{-3}$ mmol/min/UI para $V_{m\acute{a}x}$, a 37°C e pH 8,0.

2.8.2.3 Efeito do pH

A maioria das enzimas apresenta um valor de pH característico onde sua atividade é máxima. Valores acima ou baixo desse pH, exercem sobre a enzima um efeito duplo: (i) afetam o estado iônico dos aminoácidos do sítio catalítico, relevante na catálise e na união com o substrato e (ii) modificam a estabilidade da proteína, reduzindo a atividade, podendo até causar desnaturação da enzima caso sejam atingidos valores extremos.

A estrutura tri-dimensional da enzima, responsável pela sua atividade catalítica, é estabilizada por pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e pontes dissulfeto. Mudanças no pH alteram a concentração de hidrogênio, distorcendo o equilíbrio dessas forças, podendo inclusive desativar irreversivelmente a enzima.

Outra inter-relação da atividade enzimática com o pH depende do comportamento ácido e básico da enzima e do substrato. Geralmente, apenas uma das formas iônicas do substrato é aceita pela enzima e a concentração (forma neutra ou carregada) depende do pH. Ainda, se um resíduo de aminoácido está envolvido diretamente na catálise, a forma neutra ou carregada desse resíduo é que está atuando (VOET, 1995).

Os vários efeitos mencionados fazem com que cada enzima tenha um pH ótimo, sendo a curva da atividade em função do pH normalmente em forma de sino, como a da Figura 2.10.

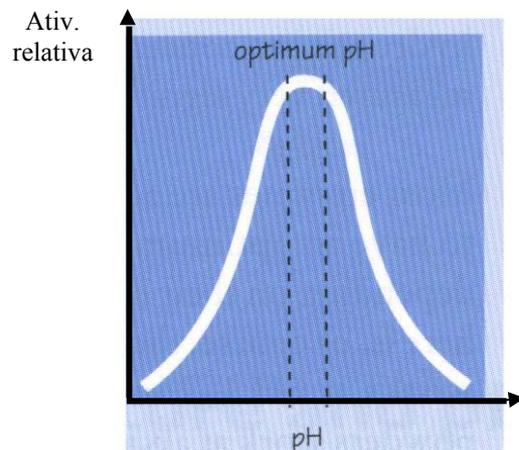


Figura 2.10 - Efeito do pH na atividade relativa de uma enzima.

Os valores de pH mais próximos do pH ótimo podem levar a decréscimos de atividade maiores ou menores, mas estes efeitos são normalmente reversíveis. Valores de pH extremos levam a um desenrolamento irreversível da proteína (desnaturação), com perda permanente da atividade.

Souza *et al.*, 2005, ao estudar a influência do pH na velocidade de hidrólise da penicilina G por PGA de *B. megaterium*, encontrou valor ótimo igual a 8,0, enquanto que para enzima proveniente de *E. coli*, o pH ótimo é 7,0.

2.8.2.4 Efeito da Temperatura

As reações catalisadas por enzimas acontecem mais rapidamente a temperaturas mais elevadas, uma vez que, as moléculas envolvidas têm uma energia cinética mais elevada. Isto faz com que (i) aumente a probabilidade de colisão entre as

moléculas e (ii) uma maior proporção de moléculas tenham a energia de ativação necessária para que a reação ocorra (Figura 2.11, curva A).

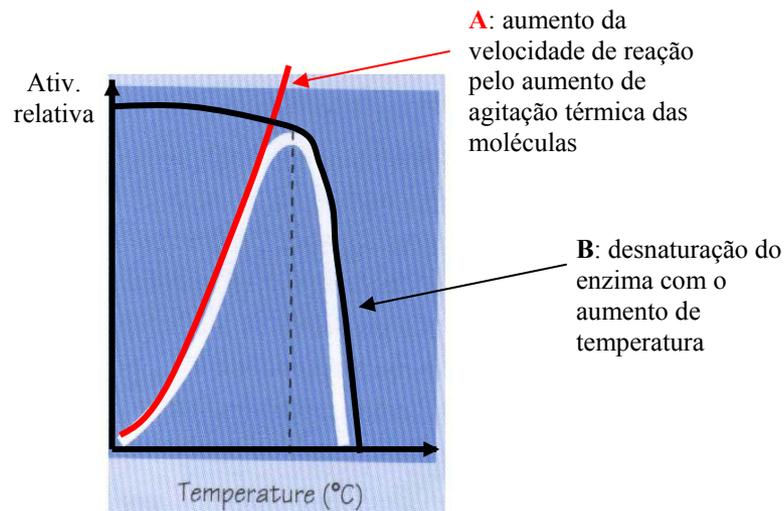


Figura 2.11 - Efeito da temperatura na atividade enzimática. O ótimo de temperatura resulta da interação entre dois fatores com efeitos contrários, o aumento da velocidade de reação pela temperatura (A) e a inativação das moléculas de enzima (B).

O efeito positivo do aumento de temperatura na energia das moléculas é contrariado pela desnaturação das moléculas de enzima. O aumento de temperatura acima de um dado valor provoca a destruição das interações mais ou menos fracas que mantêm a estrutura tridimensional da proteína, podendo levar a uma destruição irreversível da atividade catalítica (Figura 2.11, curva B). A temperatura ótima para cada enzima será uma consequência da interação entre estes dois fatores. Obviamente, diferentes enzimas terão diferentes temperaturas ótimas.

Segundo Souza *et al.*, 2005, a atividade da PGA, tanto proveniente de *B. megaterium* como de *E. coli*, é máxima na temperatura de 37°C.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Microrganismos

- linhagem de *Xanthomonas campestris* NRRL B – 1459 doada pela “Coleção de Culturas Tropicais” – CCT.
- linhagem de *Xanthomonas campestris* ATCC 33913 doada pelo “Laboratório de Bacteriologia/ Virologia do Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR”
- linhagem de *Bacillus megaterium* de Bary 1884^{AL} ATCC 35985 identificada e caracterizada pela Fundação André Tosello (Relatório Técnico de Identificação anexo).

3.2 Métodos

3.2.1 Nutrientes

Utilizaram-se diferentes nutrientes para a produção de PGA em câmara rotativa e biorreator: soro de queijo em pó (SIGMA), indutor fenilacetato de potássio (doado pela Prodotti-São Paulo), aminoácidos livres (cedidos pela Ajinomoto), água de maceração de milho, extrato de levedura, bacto-triptona, cloreto de sódio, uréia e sulfato de amônio de diferentes marcas comerciais. Sais minerais utilizados em pequenas quantidades complementavam a composição dos meios de cultura. Alguns ensaios foram acrescidos de carbonato de cálcio para controle do pH.

Nas etapas de manutenção e preservação do microrganismo foram utilizados os seguintes nutrientes: bacto-triptona, extrato de levedura, cloreto de sódio, peptona e extrato de carne, e ágar, de diferentes marcas comerciais, além de fenilacetato de potássio doado pela Prodotti.

3.2.2 Reagentes para Análise de Acompanhamento da Produção da Enzima

Reagentes de diferentes marcas comerciais foram utilizados nas análises para acompanhamento da produção da enzima, a saber: Penicilina G potássica (doado pela Prodotti), p-dimetil aminobenzaldeído - PDAB (Mallinckrodt), caseína (Riedel), ácido acético, hidróxido de sódio, álcool metílico, fosfatos de potássio mono e dibásico e cloreto de sódio de diversas marcas comerciais.

3.2.3 Equipamentos

3.2.3.1 Câmara Asséptica

Nas etapas de manipulação dos microrganismos e do material em contato direto com os mesmos, utilizou-se a câmara asséptica de fluxo laminar da marca VECO, contendo bico de Bunsen e lâmpada germicida UV.

3.2.3.2 Autoclaves

Empregada para esterilização dos meios de cultura, soluções e todo material em contato com os microrganismos. Foram utilizadas autoclaves da marca FABBE modelo 103, 4000 W e 2000 W.

3.2.3.3 Câmara rotativa de temperatura controlada – “shaker”

As etapas de crescimento do microrganismo e produção da enzima foram realizadas em frascos agitados (erlenmeyers) em mesa rotativa com controle de temperatura e velocidade de agitação, da marca New Brunswick Scientific.

3.2.3.4 Reator tipo tanque agitado Applikon



(A)



(B)

Figura 3.1 – (A) Reator Applikon com capacidade de 2 L; (B) Reator acoplado ao sistema de aquisição de dados.

Os ensaios para estudo da influência de oxigênio dissolvido e adição de pulsos na produção da enzima por *B. megaterium* foram realizados em reator Applikon com capacidade para 2 L, acoplado a um sistema de aquisição de dados, apresentado na Figura 3.1.

3.2.3.5 Centrifuga Refrigerada

Para separar as células do sobrenadante nas amostras coletadas durante os ensaios, utilizou-se centrífuga refrigerada da marca EPPENDORF, modelo 5403, com capacidade para seis tubos.

3.2.3.6 Outros Equipamentos

- Estufa de secagem e esterilização FANEM modelo 320 – SE
- Estufa de secagem e esterilização FANEM modelo 315/9
- Balança analítica METTLER modelo PB 3002
- Balança de precisão KERN modelo 410
- pHmetro ORION modelo 420 A
- Espectrofotômetro PHARMACIA BIOTECH modelo Ultrospec 2000
- Banho termostático BROOKFIELD modelo EX – 200
- Reator de vidro com camisa de água capacidade para 50 mL
- Equipamentos e vidrarias comuns a laboratório

3.2.4 Armazenamento dos Microrganismos em Meio Sólido

A composição do meio sólido – meio LB – que vinha sendo utilizada para manutenção e preservação da *Xanthomonas campestris* utilizada nos ensaios, em tubos inclinados – “slants” – é descrita na Tabela 3.1. O microrganismo foi repicado em condições assépticas para “slants”, sendo transferido para meios sólidos através da raspagem com auxílio de alça de platina e posteriormente deixados em incubadora com temperatura controlada em 30°C por sete dias.

Tabela 3.1 - Composição do meio sólido LB para preservação de *Xanthomonas campestris*

Nutriente	Concentração (g/L)
Bacto-triptona	10,0
Extrato de Levedura	5,0
Cloreto de Sodio	5,0
Ágar	15,0

As linhagens de *X. campestris* doadas pela “Coleção de Culturas Tropicais” (CCT) e Instituto Biológico do Paraná, além de serem mantidas no meio LB, descrito na Tabela 3.1, foram também preservadas no meio NA, recomendado pela CCT, cuja composição é descrita na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 - Composição do meio sólido NA para preservação de *Xanthomonas campestris*

Nutriente	Concentração (g/L)
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0
Ágar	15,0

Foram realizadas, ainda, tentativas de adaptação das novas linhagens de *X.campestris*, através de repiques sucessivos em meio similar ao que vinha sendo utilizado para *B.megaterium*, descrito a seguir na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 - Composição do meio sólido para adaptação de *X. campestris*

Nutriente	Concentração (g/L)
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0
Fenilacetato de potássio	1,0
Ágar	20,0

3.2.5 Composições das Diferentes Soluções Utilizadas na Preparação dos Meios de Crescimento e Produção

As composições das soluções salina, de aminoácidos totais e preferenciais utilizadas na preparação dos meios de crescimento e produção são apresentadas nas Tabelas 3.4, 3.5 e 3.6, respectivamente.

Tabela 3.4 - Composição da solução de sais (10 vezes concentrada) utilizada nos meio de cultivo para produção de penicilina G acilase por *X. campestris* e *B.megaterium*

Nutriente	Concentração (mg/L)
Cloreto de magnésio hexahidratado	75,3
Cloreto de cálcio hexahidratado	55,1
Sulfato de sódio	53,3
Cloreto de ferro hexahidratado	14,5
Cloreto de cobalto hexahidratado	1,21
Cloreto de manganês tetrahidratado	1,07
Cloreto de cobre dihidratado	0,8
Molibdato de sódio dihidratado	0,68
Cloreto de zinco	0,063

Tabela 3.5 - Composição da solução de aminoácidos preferenciais (Souza, 2003, Pinotti *et al*, 2006).

Aminoácidos		Concentração (g/L)
Alanina	Ala	0,72
Arginina	Arg	0,96
Ácido Aspártico	Asp	2,31
Ácido Glutâmico	Glu	3,98
Lisina	Lys	0,96
Serina	Ser	0,84
Treonina	Thr	0,28

Tabela 3.6 - Composição da solução de aminoácidos totais para produção de PGA por *B. megaterium*.

Aminoácidos		Concentração (g/L)
Alanina	Ala	1,16
Arginina	Arg	1,64
Ácido Aspártico	Asp	2,53
Cisteína	Cys	0,13
Ácido Glutâmico	Glu	4,47
Glicina	Gly	0,44
Histidina	His	0,98
Leucina	Leu	4,18
Isoleucina	Ile	2,10
Lisina	Lys	3,02
Metionina	Met	2,49
Fenilalanina	Phe	2,44
Prolina	Pro	4,30
Serina	Ser	2,49
Treonina	Thr	1,91
Tirosina	Tyr	1,96
Triptofano	Trp	0,53
Valina	Val	2,76

3.2.6 Obtenção do Inóculo

A obtenção do inóculo, ou seja, meio de crescimento mais o microrganismo, foi feita em erlenmeyers de 500 mL contendo 75 mL do meio de crescimento, cujas composições estão descritas na Tabela 3.7. Após a adição do microrganismo, provenientes da raspagem dos “slants” com o auxílio de uma solução salina NaCl 0,9% p/v, o meio de crescimento era incubado por 24 horas a 300 rpm e 30°C.

Tabela 3.7 - Composição para os meios de crescimento (MC).

Nutriente	Concentração (g/L)	
	MC A	MC B
Extrato de levedura	5,0	-
Bacto-triptona	10,0	-
NaCl	5,0	-
Aminoácidos preferenciais	-	10,0
Solução salina	-	0,5
Soro de queijo em pó	-	7,0

3.2.7 Produção da Enzima em Câmara Rotativa

A produção da enzima obtida pelos cultivos de *X. campestris* e *B. megaterium* foi realizada em frascos de 500 mL contendo 50 mL dos meios de produção incubados em câmara rotativa a 30°C e 300 rpm, sendo que nos ensaios de otimização da temperatura, alterava-se essa variável. A adição de 5 mL de inóculo (10% do volume total do meio de produção) dava início ao cultivo. As composições dos meios de produção estão descritas na Tabela 3.8.

As amostras retiradas após 0, 12, 24, 36 e 48 horas foram utilizadas para determinação da concentração celular. Alíquotas de 20mL do caldo de fermentação foram centrifugadas por 20 minutos a 11000 rpm e 4°C, e o sobrenadante utilizado para a análise da atividade enzimática.

Tabela 3.8 - Composição dos meios de cultivo para produção de PGA

Nutriente	Concentração (g/L)						
	MP 1	MP 2	MP 3	MP 4	MP 5	MP 6	MP 7
Extrato de levedura	5,0	-	-	-	-	-	-
Bacto-triptona	10,0	-	-	-	-	-	-
NaCl	5,0	-	-	-	-	-	-
Aminoácidos totais	-	10,0	20,0	-	-	-	-
Aminoácidos preferenciais	-	-	-	10,0	20,0	-	-
Solução salina ³	-	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22	0,22
Soro de queijo	-	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0	20,0
Fenilacetato de potássio	-	3,5	3,5	3,5	3,5	10,0	3,5
Uréia	-	-	-	-	-	3,60	-
Água de maceração de milho	-	-	-	-	-	-	47,0
Carbonato de cálcio	-	-	-	-	-	4,10	-

3.2.8 Produção da Enzima em Biorreator

A enzima foi obtida pelo crescimento de *B. megaterium* em biorreator com capacidade para 2 L seguindo as mesmas etapas que a enzima produzida em frascos agitados em câmara rotativa. Após esterilização do biorreator, o meio de produção, igualmente estéril, foi transferido por gravidade ao fermentador. Um volume de inóculo equivalente a 10% do volume total foi adicionado, dando início ao processo fermentativo. As condições de processo fixadas para todos os ensaios em biorreator foram: aeração 2,0 L/min, temperatura 30°C e ausência de controle de pH. A concentração de oxigênio dissolvido e a agitação variaram entre um ensaio e outro, assim como o tempo de cultivo. O meio de produção era composto por aminoácidos preferenciais 10,0 g/L, soro de queijo 20,0 g/L, solução de sais 0,22 g/L e indutor fenilacetato de potássio 3,5 g/L.

Os pulsos tinham as seguintes composições e concentrações: i) aminoácidos preferenciais 10,0 g/L, soro de queijo 20,0 g/L, solução de sais 0,22 g/L e

indutor fenilacetato de potássio 3,5 g/L e ii) sulfato de amônio 2,0 g/L e fenilacetato de potássio 3,5 g/L.

3.2.9 Acompanhamento da Concentração Celular

A concentração de células foi acompanhada através de medidas de densidade ótica a 600 nm, das amostras de caldos fermentativos, convenientemente diluídas (FD) em uma solução salina NaCl 0,8 % p/v, de modo que o valor da absorvância fosse inferior a 0,6. A concentração celular expressa em grama de célula seca por litro, foi determinada pela reta de calibração, que por sua vez foi obtida através da relação entre a massa de células secas em função da densidade ótica, representada pela equação:

$$C_x \text{ (g}_{\text{cel seca}}/\text{L)} = (0,385 * \text{D.O.}_{600\text{nm}} * \text{FD}) + 0,066 \quad (3.1)$$

Onde:

C_x = Concentração celular;

D.O. = Densidade ótica;

FD = Fator de diluição.

3.2.10 Determinação da Atividade Enzimática – Método PDAB

Este método consiste em determinar atividade amidase da PGA utilizando o reagente p-dimetilaminobenzaldeído (PDAB) de acordo com o protocolo proposto por Balashingan et al., 1972. O grupo amino presente no ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) produzido na reação de hidrólise da penicilina G catalisada pela PGA, reage com o grupo aldeído presente no PDAB, gerando um produto colorido que é acompanhado espectrofotometricamente num comprimento de onda de 415 nm. A leitura foi relacionada à concentração de 6-APA por meio de uma curva de calibração obtida com soluções padrões de 6-APA com concentrações na faixa de 200-1000 µg/mL.

Uma unidade internacional (UI) é definida como a quantidade de enzima que catalisa a formação de 1 μmol de 6-APA por minuto, na hidrólise de penicilina G potássica a 37°C e pH 8,0.

Em um reator de vidro encamisado com capacidade para 50mL aquecido por meio de um banho termostaticado ajustado para 37°C, colocaram-se 4mL de PenG 4% p/v, diluída em tampão fosfato 0,1 mM e pH 8,0. Ao estabilizar a temperatura, adicionaram-se, sob agitação, 2,0 mL da amostra contendo a solução de enzimas. Tomaram-se alíquotas de 0,5 mL em diferentes tempos de reação, as quais eram adicionadas em cubetas previamente preparadas com reagente PDAB (0,5 mL de PDAB 0,5% p/v em metanol, 2,0 mL de ácido acético 20% v/v e 1,0mL de solução de hidróxido de sódio 0,05M), após reagir por 2,5 minutos, tomava-se a medida da absorbância.

3.2.11 Rompimento das Células de *X. campestris* para Análise de Produção Intracelular de PGA

Alíquotas de 30,0 mL foram colocadas em tubos para centrifugação por 20 minutos, a 11.000 rpm e 4°C. O sobrenadante foi utilizado para análise de produção de PGA extracelular. 30,0 mL de uma solução contendo NaOH 2,0 M e SDS 1% era utilizada para resuspensão e lise celular, utilizando-se um agitador de tubos para homogeneização. O caldo foi centrifugado novamente, separando-se o sobrenadante para análise de produção intracelular de PGA.

3.2.12 Análise da Atividade Proteolítica no Caldo de Fermentação

A existência de atividade proteolítica no caldo de fermentação foi investigada utilizando-se pHstato, que permite medir a atividade de proteases em termos de consumo de NaOH para manutenção do pH, que diminui em função da liberação de terminais carboxílicos, durante a hidrólise de um substrato protéico, ao se adicionar uma alíquota do meio de produção contendo possíveis proteases excretadas.

A hidrólise foi realizada com 40,0 mL de solução de caseína 40,0 g/L e 4,0 mL do caldo, por 15 minutos à 50°C e pH 8,0. A base adicionada foi NaOH 0,03M.

3.2.13 Caracterização da PGA de *Bacillus megaterium*

3.2.13.1 Determinação da Temperatura e pH Ótimos

Para determinação da temperatura ótima, a atividade da PGA foi analisada utilizando-se PenG potássica 4% p/v diluída em tampão fosfato pH 8,0 como substrato em diferentes temperaturas de hidrólise (25-70°).

Já para determinação do valor ótimo de pH foram utilizadas soluções de PenG potássica preparadas em diferentes tampões 200 mM: tampão citrato (pHs 5,0 e 6,0), tampão fosfato (pHs 7,0 e 8,0) e tampão borato (pHs 9,0 e 10,0). Todas as reações foram processadas à 37°C.

A quantificação da atividade enzimática em ambos os casos foi determinada pelo método do PDAB, descrito no tópico 3.2.5.

3.2.13.2 Estabilidades Térmica e Alcalina

A estabilidade térmica foi investigada incubando-se o caldo de fermentação em temperatura de 60°C em banho seco, equipamento que possibilita a incubação de amostras em altas temperaturas por períodos prolongados de tempo. Em tempos determinados, alíquotas foram retiradas e resfriadas a 25°C. O decaimento da atividade enzimática até total inativação pela temperatura foi investigado pelo método do PDAB.

Quanto à estabilidade em pH alcalino, alíquotas do caldo de fermentação contendo a enzima, foram expostas a pH 11,0, adicionando-se NaOH 5,0M, sempre acompanhando os valores de pH em pHmetro. Em tempos determinados eram retiradas amostras e adicionava-se então, uma gota de HCl para que o pH atingisse valor próximo a 8,0. Essas amostras eram, assim, utilizadas para realização da atividade enzimática pelo método do PDAB, determinando-se, então, o decaimento da atividade até total inativação da enzima.

3.2.13.3 Determinação dos Parâmetros Cinéticos – $V_{máx}$ e K_m

A influência da concentração de substrato na atividade de PGA de *B. megaterium* foi investigada tomando-se as velocidades iniciais da hidrólise da PenG potássica a diferentes concentrações, entre 0,5 e 10 mM, diluídas em tampão fosfato 100

mM pH 8,0 e 37°C. A tangente da curva da concentração de produto liberado em função do tempo de reação, determinada para o trecho linear, foi tomada como a velocidade inicial para cada concentração de substrato. O ajuste do modelo de Michaelis-Menten aos pontos experimentais obtidos do gráfico de velocidades iniciais versus concentração de penicilina G forneceu os parâmetros $V_{máx}$ e K_m , sendo o ajuste iniciado utilizando as estimativas dos parâmetros cinéticos fornecidos por ajuste linear dos pontos $1/V$ em função de $1/S$ (gráfico de Lineweaver-Burk), onde V é a velocidade inicial e S , a concentração do substrato.

3.2.13.4 Determinação da Energia de Ativação - E_a

A energia de ativação pode ser estimada pela equação de Arrhenius (Equação 3.2).

$$k = k_0 \cdot e^{\frac{E_a}{RT}} \quad (3.2)$$

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

$$E_0 \cdot k = E_0 \cdot k_0 \cdot e^{\frac{E_a}{RT}} \quad (3.3)$$

Aplicando-se logaritmo neperiano:

$$\ln E_0 \cdot k = \ln E_0 \cdot k_0 - \frac{E_a}{R \cdot T} \quad (3.4)$$

Sabendo-se que: $V_{máx} = E_0 \cdot k$ (3.5)

Tem-se:

$$\ln(V_{máx}) = \ln(V_0) - \left(\frac{E_a}{R}\right) \left(\frac{1}{T}\right) \quad (3.6)$$

Foi estimado o valor de $V_{máx}$ apenas a 37°C. Como:

$$V = \frac{V_{máx} \cdot S}{K_m + S} \quad (3.7)$$

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

$$V = V_{máx} \quad (3.8)$$

Assim, utilizaram-se os valores de velocidade da reação no trecho ascendente linear, obtidos nas temperaturas de 25-65°C e construiu-se o gráfico $\ln(V)$ vs $(1/T)$, sendo feito em seguida o ajuste linear para o cálculo da energia de ativação da PGA, através do coeficiente angular α :

$$\alpha = -\frac{E_a}{R} \quad (3.9)$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O início da utilização de *Xanthomonas campestris* na produção de penicilina G acilase (PGA) deve-se ao fato de se ter detectado no DNA desse microrganismo a seqüência genética que codifica a enzima. Esta informação foi obtida através do trabalho realizado por Pinotti (2003), em parceria com o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar, em projeto para sub-clonar o gene da amidohidrolase de *Bacillus megaterium* em *Escherichia coli*. Assim, uma linhagem de *X. campestris* foi doada pelo Departamento de Genética e Evolução da UFSCar para o grupo de Engenharia de Processos Enzimáticos - Departamento de Engenharia Química da UFSCar, para que fossem realizados testes, os quais mostraram produção da enzima pelo microrganismo.

Realizados esses testes, uma placa com ágar contendo *X. campestris* foi armazenada em geladeira. Com o início de uma nova frente de trabalho, que visava obter PGA de diferentes microrganismos, essa linhagem foi reativada, sendo transferida para tubos inclinados - “slants” - contendo o meio sólido de armazenamento (extrato de levedura, bacto triptona, cloreto de sódio e ágar) com o auxílio de uma alça de platina e solução salina.

Assim, inicialmente, este trabalho tinha como objetivo otimizar as condições de cultivo, determinando-se o melhor pH inicial, temperatura, meios de crescimento do microrganismo e produção da enzima, através de ensaios realizados em câmara rotativa com temperatura controlada, bem como caracterizar a PGA de *X. campestris*. Em paralelo, solicitou-se e se obteve linhagem de *X. campestris* doada pela Coleção de Culturas Tropicais (CCT). Verificou-se, então, que o microrganismo que se vinha cultivando era morfologicamente diferente do microrganismo doado pela CCT.

Houve assim, a necessidade de testes para que fosse confirmada a verdadeira identidade do microrganismo utilizado em nossas pesquisas. Dessa forma, um slant do microrganismo reativado foi enviado para a Fundação André Tosello (FAT), de Campinas, para que fossem feitas análises de identificação. O resultado mostrou que o microrganismo era uma linhagem de *Bacillus megaterium* de Bary 1884^{AL} (ATCC 35985), talvez uma decorrência de contaminação do *B. megaterium* utilizado há tempos pelo grupo de pesquisa.

Testes de produção de PGA com as linhagens de *X.campestris* procedentes da Coleção de Culturas Tropical (CCT) e Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR), mostraram que o crescimento celular foi pequeno e medidas de atividade enzimática não acusaram produção da enzima.

As linhagens de *X. campestris* de origens conhecidas talvez necessitem de um período de adaptação para que produzam a PGA. Assim, ao mesmo tempo em que foram realizadas tentativas de adaptação das novas linhagens de *X.campestris*, através de repiques sucessivos em meio similar ao que vem sendo utilizado para *B.megaterium*, foram feitos estudos das condições operacionais de produção de PGA pela nova linhagem de *Bacillus megaterium*, tanto em câmara rotativa como em biorreator.

4.1 Produção de Penicilina G Acilase no DEQ/ UFSCar

A produção de PGA por *Bacillus megaterium* vem sendo estudada há anos no grupo de pesquisa em que se insere este trabalho. Foi realizado um estudo que comprovou que o uso de uma solução de aminoácidos por *B. megaterium* como fonte de nitrogênio aumentava a produção da enzima quando comparado com a caseína, que até então era considerado o melhor substrato para a produção da PGA (Pinotti *et al.*, 2006). A solução de aminoácidos seguia composição baseada na encontrada no hidrolisado enzimático de caseína, e foi denominada neste trabalho como solução de aminoácidos totais – aa totais (Silva, 2006). A lista de aminoácidos e suas respectivas concentrações encontram-se no Capítulo 3, Tabela 3.5.

Já que para a formulação de um meio de cultivo otimizado não se deve levar em consideração somente a alta produtividade da enzima, mas também procurar reduzir os custos de sua produção foram realizados ensaios no grupo com *B. megaterium*, a fim de estudar quais eram os aminoácidos consumidos preferencialmente por este microrganismo. Com isso, conseguiu-se eliminar 11 dos 18 aminoácidos totais inicialmente utilizados, reduzindo, assim, consideravelmente, o custo de produção, sem alterar significativamente os valores de crescimento celular e atividade enzimática (Souza, 2003, Pinotti *et al.*, 2006). Esta solução de aminoácidos consumidos preferencialmente é atualmente definida como padrão na produção de PGA por *B. megaterium* e foi denominada neste trabalho como solução de aminoácidos

preferenciais - aa preferenciais. A Tabela 3.4, no Capítulo 3 apresenta a lista dos 7 aminoácidos consumidos preferencialmente com suas respectivas concentrações. Além dos aminoácidos, os meios de produção eram compostos também por soro de queijo (20,0 g/L), sais (0,22 g/L) e indutor fenilacetato de potássio (3,5 g/L).

4.2 Produção de Penicilina G Acilase por *Xanthomonas campestris* em Câmara Rotativa ‘Shaker’

4.2.1 Produção de PGA por linhagem de *X. campestris* doada pela “Coleção de Culturas Tropicais (CCT)”

Visando-se trabalhar com uma linhagem procedente de um centro de referência solicitou-se uma amostra de *X.campestris* à Coleção de Culturas Tropicais, que foi a seguir cultivada visando produção de penicilina G acilase.

Repiques foram realizados em dois diferentes meios de crescimento e manutenção: o meio nutriente ágar (NA), composto por peptona e extrato de carne, indicado pela CCT e o meio LB, composto por bacto-triptona, extrato de levedura e NaCl, utilizado atualmente pelo grupo de pesquisa para conservação do microrganismo.

Observou-se um crescimento mais acentuado nos slants contendo meio LB, talvez por este ser composto por nutrientes mais assimiláveis pelo microrganismo. A linhagem continuou sendo mantida nesses dois meios, para que se pudesse estudar a influência destes ao longo do tempo no crescimento do microrganismo.

Um ensaio utilizando-se o meio com aminoácidos preferenciais 10,0 g/L foi realizado em câmara rotativa a 300 rpm e 30°C, com a finalidade de verificar a produção de PGA por esta nova linhagem de *X. campestris*. Foram feitos dois inóculos, um com o slant contendo meio NA e o outro, com meio LB. Os resultados deste cultivo estão apresentados na Tabela 4.1.

O crescimento celular foi pequeno e só ocorreu em 36 horas de cultivo. Foram realizadas medidas de atividade enzimática diretamente no caldo de cultivo e após lise celular, para averiguação de produção extra e intracelular, respectivamente, mas ambas não acusaram produção da enzima. Acreditava-se que talvez a nova linhagem de *X. campestris* necessitasse de uma fase de adaptação. Assim, foram

realizadas tentativas de adaptação da nova linhagem de *X.campestris*, através de repiques sucessivos em meio similar ao que vinha sendo utilizado para *B.megaterium*, composto por extrato de carne, peptona e fenilacetato de potássio, cujas composições estão descritas na Seção 3.2.1, Tabela 3.3. Mas ensaios posteriores apresentaram resultados semelhantes ao primeiro, com pequeno crescimento celular e nenhuma produção de PGA. Talvez o microrganismo necessite de um tempo maior de adaptação para que comece a produzir a enzima.

Tabela 4.1 - Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por linhagem de *X. campestris* doada pela CCT.

Meio de crescimento	Meio de produção	Ensaio	Tempo (h)	pH	C_x (g/L)	A.E. (UI/L)
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L)	aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (20,0g/L) Solução salina (0,22g/L)	Slant meio NA	0	6,80	0	0
			12	6,87	0	0
			24	6,90	0	0
			36	6,98	0,80	0
	Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	Slant meio LB	0	6,82	0	0
			12	6,89	0	0
			24	6,86	0	0
			36	6,93	1,25	0

4.2.2 Produção de PGA por linhagem de *X. campestris* doada pelo “Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR)”

Ainda na tentativa de produzir PGA por *X. campestris*, foi realizado um ensaio com uma linhagem do microrganismo proveniente do “Laboratório de Bacteriologia/ Virologia do Instituto Agrônômico do Paraná – IAPAR” - *X. campestris* ATCC 33913 – armazenados em solução de glicerol 80%, em ultrafreezer à -60°C. O meio de produção utilizado era composto pelos aminoácidos preferenciais 10,0 g/L, soro de queijo, sais e indutor fenilacetato de potássio. Os resultados do ensaio realizado em câmara rotativa a 300 rpm e 30°C podem ser observados na Tabela 4.2.

Observa-se um crescimento celular mais acentuado, comparando-se com o ensaio com o microrganismo proveniente da CCT, atingindo o máximo de 1,89 g/L em 24 horas de cultivo. Contudo, medidas de atividade enzimática intra e extracelular mostraram não haver produção de PGA pela linhagem de *X. campestris* doada pelo IAPAR.

Tabela 4.2 - Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por linhagem de *X. campestris* doada pelo Instituto Agronômico do Paraná.

Meio de crescimento	Meio de produção	Tempo (h)	pH	C_x (g/L)	A.E. (UI/L)
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L)	aa preferenciais (10,0g/L)	0	6,80	0	0
	Soro de queijo (20,0g/L)	24	6,90	1,89	0
	Solução salina (0,22g/L)	36	6,98	1,42	0
	Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	48	6,82	1,40	0

Quando os primeiros ensaios com as linhagens de *X. campestris* de procedências conhecidas apresentaram resultados inexpressivos na produção da enzima, optou-se por realizar um trabalho em paralelo com o microrganismo reativado, identificado como uma linhagem de *Bacillus megaterium*, pela Fundação André Tosello. Assim, foi realizado um estudo das condições operacionais de produção de PGA - tempo de inóculo, determinação da temperatura e pH inicial ótimos, composição dos meios de cultivo e influência da concentração de oxigênio dissolvido - bem como a caracterização da enzima produzida quanto à temperatura e pH ótimos, estabilidades térmica e alcalina e parâmetros cinéticos ($V_{máx}$ e K_m).

4.3 Produção de PGA por *Bacillus megaterium* em Câmara Rotativa ‘Shaker’

4.3.1 Determinação do Erro Experimental e da Variabilidade de Diferentes Inóculos.

Antes de se proceder a estudos das diferentes variáveis foi determinado o erro experimental na realização do ensaio e também a variabilidade dos resultados de

concentração celular e atividade enzimática em função de diferentes inóculos. Como estudos de otimização da composição dos meios de cultivo ainda não haviam sido realizados, optou-se por utilizar o meio padrão, compostos por aminoácidos preferenciais 10,0 g/L, soro de queijo 20,0 g/L, solução de sais 0,22 g/L e indutor fenilacetato de potássio 3,5 g/L, e condições utilizadas pelo grupo para produção de PGA por *B. megaterium* - câmara rotativa a 300 rpm, 30°C e pH inicial ótimo 8,0 para meio de crescimento e produção. Foram feitos três meios de crescimento, inoculados com “slants” diferentes e de cada meio de crescimento inocularam-se três meios de produção. Os resultados são apresentados na Tabela 4.3, sendo que as medidas foram realizadas em 24 horas de cultivo.

Tabela 4.3 - Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* em cultivos com meio padrão para determinação do erro experimental e variabilidade de inóculos.

Meio de crescimento	Meio de produção	Slant	pH	C_x (g/L)	A.E. (UI/L)
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L)	aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo(20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	1	8,87	3,89	401
			8,85	3,97	448
			8,89	3,86	435
		2	8,81	5,09	454
			8,78	5,05	426
			8,83	5,11	383
		3	8,80	4,73	499
			8,83	4,36	489
			8,83	4,27	498

A média geral dos níveis de atividades enzimáticas, em 24 horas, foi 448 UI/L e o desvio padrão correspondente foi de 22 UI/L (cerca de 5%). Para concentração celular a média calculada foi 4,48 g/L e o desvio, 0,11 g/L (cerca de 2,5%).

4.3.2 Padronização do Tempo de Inóculo e Concentração Celular na Etapa de Crescimento do Microrganismo

O tempo que o microrganismo leva para atingir crescimento celular considerável na etapa do inóculo é uma variável importante, pois assim, pode-se investigar se são realmente necessárias 24 horas, ou se um tempo menor seria suficiente na fase de crescimento, o que levaria a uma diminuição considerável no tempo total de ensaio.

O estudo do tempo de cultivo do inóculo de *Bacillus megaterium* foi realizado utilizando-se o meio de crescimento padrão, composto por aa preferenciais 10,0 g/L, soro de queijo e sais, em câmara rotativa a 300 rpm e 30°C. O resultado deste estudo pode ser observado na Tabela 4.4 e na Figura 4.1.

Tabela 4.4 - Crescimento celular em função do tempo do inóculo de *Bacillus megaterium*, a 30°C e pH 8,0.

Tempo (h)	C _x (g/L)
2	0
4	0
6	0,03
8	0,01
10	0,01
12	0,06
14	0,20
16	0,59
18	1,35
20	2,23
22	2,58
24	2,65

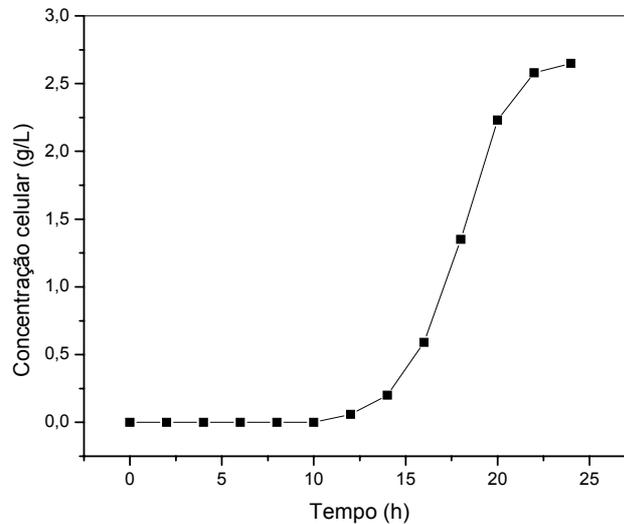


Figura 4.1 - Crescimento celular em função do tempo do inóculo de *Bacillus megaterium*, a 30°C e pH 8,0.

Pelos dados mostrados na Tabela 4.4, percebe-se que a fase exponencial ocorre entre 14 e 22 horas de cultivo, período no qual a concentração celular (C_x) passa de 0,20 para 2,58 g/L, ou seja, ocorre um aumento de aproximadamente 90% nesse intervalo de tempo. Após as 22 horas de cultivo, já se nota declínio da velocidade de crescimento celular, conforme pode ser visto na Figura 4.1, provavelmente em consequência do esgotamento de nutrientes. Portanto, em 24 horas a concentração celular já está próxima do valor máximo. A velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo (μ_{\max}) foi calculada através dos logaritmos de C_x para cada tempo, entre 14 e 22 horas (duração aproximada da fase exponencial), colocados em um gráfico. A tangente da reta obtida nesse intervalo é igual a

$$\mu_{\max} = \frac{\ln C_x - \ln C_{x0}}{t_f - t_i},$$

de crescimento, $\mu_{\max} = 0,33 \text{ h}^{-1}$.

A literatura reporta estudo do crescimento de *B. megaterium* em meio contendo glicose, encontrando velocidade máxima específica de crescimento, $\mu_{\max} = 0,68 \text{ h}^{-1}$ (Nekolny e Chaloupka, 2000).

Foi realizado também um estudo da concentração celular máxima alcançada na fase de crescimento do microrganismo, para que se pudesse padronizar o

volume de inóculo, e conseqüentemente, a concentração celular, utilizada no início da fase de produção da enzima.

A produção do inóculo para crescimento do *Bacillus megaterium* foi feita em erlenmeyers de 500 mL contendo 75 mL do meio de crescimento (aa preferenciais 10,0 g/L, soro de queijo e solução salina). Após a adição do microrganismo, provenientes da raspagem dos “slants” com o auxílio de uma solução salina NaCl 0,9% p/v, o meio de crescimento era incubado em câmara rotativa por 24 horas a 300 rpm e 30°C. Os valores de concentrações celulares obtidos a partir de diferentes inóculos provenientes de slants distintos podem ser observados na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Valores de concentração celular após 24 horas de cultivo sob iguais condições de *Bacillus megaterium* obtidos de diferentes “slants”

Inóculo	C _x (g/L)
1	2,65
2	2,51
3	2,81
4	2,87
5	2,54
6	2,63
7	2,73

Observando-se a Tabela 4.5, pode-se concluir que as concentrações celulares atingidas após 24 horas são bastante semelhantes. Portanto, a metodologia que vem sendo utilizada, adição de 5 mL de inóculo (10% do volume total do meio de produção) obtido após 24 horas de cultivo (ou seja, aproximadamente 0,013 g de células) resulta em uma adequada padronização do inóculo, sempre que este tenha sido cultivado sob as mesmas condições.

Por outro lado, no estudo efetuado na primeira etapa deste trabalho, de fato, houve variação das condições de cultivo na fase de crescimento, pois se estudou a influência do pH no crescimento do microrganismo (produção do inóculo). Contudo, os valores das concentrações celulares atingidas em 24 horas não variaram significativamente, de modo que a metodologia utilizada (5 mL do inóculo após 24 horas de cultivo) também implicava se iniciar a fase de produção com concentrações

celulares padronizadas. Assim, o efeito do pH de cultivo da fase do inóculo na produção da enzima na fase seguinte (produção) deve ser atribuído a variações no estado fisiológico do microrganismo e não à variação na concentração inicial do microrganismo na fase de produção.

4.3.3 Otimização das Condições de Cultivo para Produção da Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium*: pH Inicial e Temperatura.

Como o meio padrão mostrou-se efetivo no crescimento de *Bacillus megaterium* e produção da enzima, optou-se por utilizá-lo nos ensaios para definição do melhor pH inicial e temperatura ótima, uma vez que o estudo da composição dos meios de cultivo foi realizado na etapa seguinte deste trabalho. Assim, será nomeado como padrão neste trabalho o meio composto por aminoácidos preferenciais 10,0 g/L, soro de queijo 20,0 g/L, sais 22,0 g/L e indutor fenilacetato de potássio 3,5 g/L. Todos os experimentos desta fase do trabalho foram realizados em câmara rotativa a 300 rpm e 30°C, a não ser no estudo de temperatura, em que esta variável era alterada.

4.3.3.1 Influência do pH Inicial no Cultivo de *Bacillus megaterium*

A primeira variável estudada na produção de PGA por *Bacillus megaterium* foi o pH inicial. Foram testados os pHs iniciais 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5, em diferentes combinações nas duas fases de cultivo, crescimento e produção da enzima (presença de indutor).

Neste primeiro ensaio dois diferentes pHs iniciais foram testados, 7,0 e 8,0, tanto para o meio de crescimento quanto para o de produção. Os resultados são apresentados na Tabela 4.7.

Após 36 horas de cultivo, ambos os ensaios, a pH inicial 7,0 e 8,0, atingiram máxima concentração de enzimas não associada à máxima concentração celular. Observa-se também que no ensaio a pH inicial 7,0 houve uma maior produção da PGA, 400 UI/L, quando comparada com o ensaio a pH inicial 8,0, 316 UI/L. Esse ensaio mostrou, portanto, que o microrganismo tem preferência pela condição pH inicial igual a 7,0 para meio de crescimento e meio de produção, pois nos ensaios em pH inicial 8,0 a produção foi menor.

Tabela 4.6 - Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* em cultivos com meio padrão – pHs iniciais 7,0 e 8,0 para meio de crescimento e produção.

Meio de Crescimento	Meio de Produção	Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L) pH_i=7,0	aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo(20,0g/L)	12	7,84	3,09	240
	Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	24	8,42	3,36	357
		36	8,95	2,39	400
	pH_i=7,0	48	9,06	2,15	277
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L) pH_i=8,0	aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (20,0g/L)	12	7,87	3,12	224
	Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	24	8,50	3,28	216
		36	8,85	2,83	316
	pH_i=8,0	48	8,86	2,67	291

Verifica-se no decorrer deste, e de todos os cultivos, uma tendência a um pH alcalino, fato este que será discutido no Capítulo 4.6.

Observa-se também, que após um pico na atividade enzimática, ocorre uma queda nesses valores. Suspeitava-se que o microrganismo estaria produzindo proteases, que estariam hidrolisando a enzima. Essa suspeita foi eliminada após uma análise em pHstato, o qual será discutido no Capítulo 4.5.

Nesta próxima etapa estudou-se, então, a influência dos pHs iniciais intermediários, 7,5 e 8,5, para o meio de produção a fim de observar a ocorrência de picos de atividade enzimática nesses valores. Como através do ensaio anterior pH inicial igual a 7,0 apresentou um maior crescimento em relação ao pH inicial igual a 8,0, adotou-se como pH inicial padrão o valor igual a 7,0 para o meio de crescimento neste ensaio. Os resultados dessa bateria de ensaios estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* em cultivos com meio padrão – pH inicial 7,0 para meio de crescimento e pHs iniciais 7,0, 7,5, 8,0 e 8,5 para os meios de produção.

Meio de crescimento	Meio de produção	Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	pH_i=7,0	12	7,96	4,59	140
		24	8,38	5,03	342
		36	8,82	3,64	174
		48	9,06	3,53	253
	pH_i=7,5	12	7,98	4,07	332
		24	8,36	4,15	354
		36	8,85	3,87	328
		48	9,13	3,48	300
	pH_i=8,0	12	7,94	4,34	400
		24	8,35	4,75	420
		36	8,82	4,00	313
		48	9,07	3,72	348
	pH_i=8,5	12	7,89	4,10	329
		24	8,36	5,04	358
		36	8,80	4,15	338
		48	9,08	4,02	219

Observando-se os dados da Tabela 4.7, verifica-se que os valores intermediários de pH inicial de meio de produção, 7,5 e 8,5, não conduziram a níveis de atividade enzimática superiores aos obtidos com os pHs até então estudados, podendo assim, serem descartados nos próximos experimentos. Para todos os ensaios verificou-se uma tendência a pHs alcalinos, com produção máxima de PGA em 24 horas de cultivo.

Pode-se notar que a combinação que favoreceu máxima produção de enzima, 420 UI/L, consistia em meio de crescimento a pH inicial 7,0 e meio de produção a pH inicial 8,0, não mais seguindo um padrão de pHs iniciais iguais para crescimento e produção, sugerindo que combinações alternadas dessas variáveis devem ser testadas.

Com isso, tornou-se necessária a realização de ensaios alternados, a fim de determinar o pH ótimo para o meio de crescimento, bem como para o meio de produção, fazendo-se diferentes combinações entre eles.

Tabela 4.8 - Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* em cultivos com meio padrão – pHs alternados para meios de crescimento e produção.

Meio de Crescimento	Meio de Produção	Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L)	aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	12	7,92	0,08	0
	pH_i=7,0	24	8,55	3,97	234
		36	9,08	3,58	257
		48	9,41	2,94	262
		aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	12	8,19	3,64
	pH_i=8,0	24	8,84	4,04	296
		36	9,06	3,24	232
		48	9,42	2,87	269
		aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	12	8,11	3,68
	aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L)	pH_i=7,0	24	8,84	4,21
36			9,04	3,98	211
48			9,28	2,83	290
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)			12	8,20	3,89
pH_i= 8,0		24	8,80	4,20	320
		36	9,10	3,51	331
		48	9,44	2,95	314

Na Tabela 4.8 são mostrados os resultados obtidos para ensaios realizados em meio de crescimento com pH inicial 7,0 e meios de produção 7,0 e 8,0, e meio de crescimento com pH inicial 8,0 e meios de produção 7,0 e 8,0, respectivamente.

Diferentemente dos resultados obtidos anteriormente quando se realizaram ensaios apenas com meio de crescimento a pH inicial 7,0, obteve-se máxima produção enzimática, 400 UI/L, ao se combinar meio de crescimento a pH inicial 8,0 e meio de produção a pH inicial 7,0. Para confirmação desses resultados, uma nova bateria de ensaios foi realizada nas mesmas condições, sendo que os dados são apresentados na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 - Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* em cultivos com meio padrão – pHs alternados para meios de crescimento e produção.

Meio de Crescimento	Meio de Produção	Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)	
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L)	pH_i=7,0	aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	12	8,03	2,77	53
			24	8,71	3,90	327
			36	9,05	3,77	312
			48	9,29	3,49	299
	pH_i=8,0	aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	12	8,15	2,93	77
			24	8,62	4,22	400
			36	9,00	4,03	375
			48	9,36	3,65	352
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L)	pH_i=7,0	aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	12	8,05	1,51	32
			24	8,58	4,17	450
			36	8,84	3,17	409
			48	9,30	2,82	338
	pH_i= 8,0	aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo(20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	12	8,12	1,83	27
			24	8,60	4,19	405
			36	9,09	3,40	281
			48	9,29	3,11	285

Observa-se novamente que o pH que conduziu à maior produção da enzima, 450 UI/L em 24 horas de cultivo foi meio de crescimento e produção com pHs iniciais iguais a 8,0 e 7,0 respectivamente, comprovando, tal como no ensaio anterior, que a combinação desses pHs é a mais favorável para a produção de PGA. Verificou-se também, como em todos os ensaios realizados, uma tendência a um pH alcalino no decorrer dos cultivos.

Adotaram-se então estas condições ótimas como sendo padrões para a realização dos próximos experimentos.

Dado que em todos os ensaios realizados, o pH inicial sempre tendia a um pH alcalino ao longo do cultivo, verificou-se a possibilidade da utilização de soluções tampão no intuito de manter o pH constante durante todo o processo fermentativo e estudar a influência dessa condição na produção da enzima. Para tanto, foram utilizados tampões fosfato nos cultivos a pHs 7,0; 7,5 e 8,0, e tampão ácido bórico-borax no cultivo a pH 8,5. Todos na concentração de 0,2 mol/L. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.10. As soluções tampão foram utilizadas no lugar da água destilada nos meios de produção e pH inicial dos meios de crescimento foi ajustado para 8,0. Simultaneamente, realizou-se um ensaio controle nas condições padrões (MC-pH 8,0 e MP-pH 7,0) a fim de se verificar a viabilidade do microrganismo e comparar o patamar de concentração de enzimas.

A utilização de tampão fosfato e tampão ácido bórico-borax, de concentração 0,2 M, na força iônica utilizada não foi uma estratégia eficiente para manutenção do pH, continuando, todos os ensaios a apresentarem a tendência em convergir para valores de pH próximos de 9,0, provavelmente ocasionados pela liberação de amônia, fato este que será comentado mais adiante. Contudo, conforme pode ser observado pelos resultados da Tabela 4.10, embora tenha ocorrido crescimento celular, os níveis de enzima foram bem inferiores aos obtidos no ensaio padrão, indicando que a presença de íons fosfato e borato interferem no metabolismo celular e conseqüentemente na síntese e expressão da enzima, mesmo na baixa força iônica utilizada.

Tabela 4.10 - Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* em cultivos contendo solução tampão.

Meio de crescimento	Meio de produção	Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L) pH_i=8,0	aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo(20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenil acetato de potássio (3,5g/L) pH_i=7,0 tampão fosfato 0,2 M	12	7,96	2,87	24
		24	8,51	3,37	24
		36	8,99	3,21	43
		48	9,05	2,97	39
		12	7,95	2,93	28
		24	8,21	3,40	29
		36	7,90	0,41	36
		48	9,23	3,09	36
		12	8,04	3,49	16
		24	8,49	3,82	27
		36	9,23	2,84	16
		48	8,82	3,60	24
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo(20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenil acetato de potássio (3,5g/L) pH_i=8,5 tampão ác. bórico 0,2 M		12	8,01	1,60	47
		24	8,25	2,63	22
		36	8,84	2,37	51
		48	8,51	2,55	50
	pH_i=7,0 Padrão	24	8,51	3,61	400

4.3.3.2 Influência da Temperatura no Cultivo de *Bacillus megaterium*

Para que fosse estudada a influência da temperatura na produção e expressão de PGA por *Bacillus megaterium*, foram realizados ensaios em frascos agitados, no intervalo de 25 a 40°C, com amostras retiradas em 24 horas de cultivo. Utilizaram-se meio composto pelos aminoácidos preferenciais 10,0 g/L e soro de queijo na presença do indutor fenilacetato de potássio e a combinação de pHs que conduziu à maior produção da enzima, determinada nos estudos anteriores - meio de crescimento e produção com pHs iniciais iguais a 8,0 e 7,0, respectivamente. Os resultados destes ensaios podem ser observados na Tabela 4.11 e Figura 4.2

Tabela 4.11 - Valores de concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* em cultivos a diferentes temperaturas

Meio de crescimento	Meio de produção	Temp. (°C)	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Sais (0,5g/L) pH _i =8,0	aa preferenciais (10,0 g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Sais (0,5g/L) Fenil acetato de potássio (3,5g/L) pH _i =7,0	25	3,00	135
		28	3,77	159
		30	4,50	355
		31	4,01	227
		32	4,10	213
		35	3,8	206
		40	1,30	11

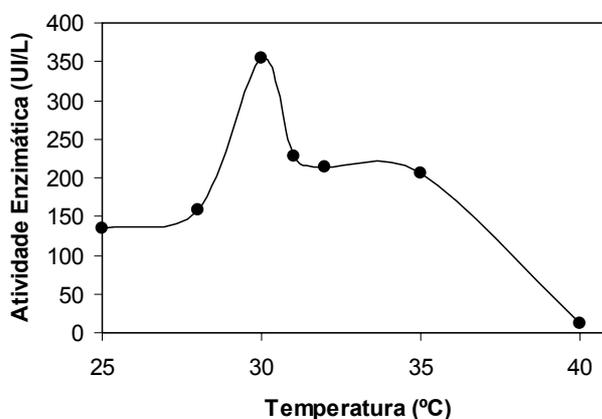


Figura 4.2: Influência da temperatura na produção de PGA por *Bacillus megaterium*

Os resultados mostram que 30°C é a temperatura ótima para o crescimento do microrganismo e para máxima produção de enzimas atingindo 355 UI/L na presença de 4,50 g/L de células. Cultivo realizado a 35°C alcançou valor de atividade enzimática 42% menor que o padrão utilizado até o momento (30°C). Temperatura controlada a 40°C não permitiu crescimento do microrganismo nem tampouco expressão da enzima. Esses resultados evidenciam ser 30°C a melhor temperatura para produção da enzima e a necessidade de um controle rigoroso de temperatura para cultivos em frascos agitados.

Rajendhran *et al.*, 2002, investigaram as melhores condições de produção de PGA por linhagem de *Bacillus megaterium*, realizando experimentos no intervalo de temperaturas de 26 – 34°C e concluíram que 28°C foi a temperatura ótima para a produção da enzima por essa linhagem.

4.3.4 Estudo da Composição de Meios de Cultivo na Produção da PGA por *Bacillus megaterium*

De modo a atingir crescimento pleno do microrganismo, bem como conseguir uma máxima produção de enzima, faz-se necessário um estudo visando determinar as condições adequadas de composição do meio. A grande diversidade de microrganismos dificulta estabelecer um meio universal que atenda às necessidades de todos eles. Muitas vezes, o que é exigido por um, inibe totalmente o crescimento e produção em outros. Assim, esta parte do trabalho visa determinar a influência da composição do meio de cultivo na produção de PGA por *Bacillus megaterium*.

Assim, cultivos foram realizados com meios de produção compostos por fontes sintéticas de carbono e nitrogênio, com solução de aminoácidos totais, ou seja todos os 18 aminoácidos, com concentrações de 10,0 e 20,0 g/L, soro de queijo, solução de sais e indutor fenilacetato de potássio. Os resultados desses ensaios estão apresentados na Tabela 4.12.

Ressaltando que foi utilizada a combinação de pHs que conduziu à maior produção da enzima, determinada nos estudos anteriores - meio de crescimento e produção com pHs iniciais iguais a 8,0 e 7,0, respectivamente.

O meio padrão (aminoácidos preferenciais 10,0 g/L, soro de queijo 7,0 g/L e sais 0,5 g/L) foi utilizado na fase de crescimento, a fim de garantir a presença de

algum elemento essencial já que as exatas exigências nutricionais do microrganismo não estão ainda bem definidas.

Tabela 4.12 - Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* em cultivos contendo aminoácidos totais a 10,0 e 20,0 g/L, a 30°C

Meio de crescimento	Meio de produção	Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L) pH_i = 8,0	aa totais (10,0g/L)	12	7,94	3,61	194
	Soro de queijo (20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	24	8,10	3,76	216
		36	8,68	2,68	257
	pH_i = 7,0	48	8,70	2,69	215
	aa totais (20,0g/L)	12	7,93	3,22	53
	Soro de queijo(20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	24	8,22	4,07	129
		36	8,66	3,45	91
	pH_i = 7,0	48	8,60	3,37	120

Pode-se verificar que a concentração da solução de aminoácidos tem bastante influência nos níveis de produção da PGA. Nos ensaios com concentração de aa totais de 10,0 g/L, em 36 horas de cultivo, a atividade enzimática chegou a um nível máximo de 257 UI/L, enquanto 129 UI/L foram atingidos como máximo na concentração de 20,0 g/L. Observa-se, então, que ocorre um efeito inibidor/repressor quando se aumenta a concentração inicial de aminoácidos de 10,0 para 20,0 g/L, gerando uma redução na expressão da enzima. Além disso, constatou-se que nem sempre um crescimento celular mais pronunciado leva a uma maior produção de enzima. Observa-se que no ensaio com concentração 10,0 g/L ocorreu o pico da atividade enzimática (257 UI/L) e o crescimento celular foi de 3,76 g/L, enquanto no ensaio com 20,0 g/L, a concentração de células foi de 4,07 g/L e a atividade enzimática atingiu somente 129 UI/L.

Além da possível repressão por excesso de nitrogênio na produção da enzima, é possível também que concentrações residuais maiores de alguns aminoácidos

no meio com 20,0 g/L estejam inibindo a ação da enzima produzida e não a sua produção.

Com o intuito de otimizar o meio de cultivo, isto é, aumento da produção aliado a uma redução dos custos, foram realizados novos ensaios com fontes sintéticas de carbono e nitrogênio, com o meio utilizado pelo grupo, composto pelos sete aminoácidos consumidos preferencialmente por este microrganismo, em concentrações de 10,0 e 20,0 g/L. Os resultados destes ensaios são apresentados na Tabela 4.13.

Os resultados obtidos estão de acordo com a teoria. Não é necessário um meio que forneça todos os aminoácidos, pois existem vias biossintetizantes que levam aos 20 aminoácidos. Por exemplo, a *Escherichia coli* pode sintetizar todos os aminoácidos necessários para a síntese de proteínas, a partir de precursores simples (Lehninger, 1993).

Em tese, na presença dos ácidos aspártico e glutâmico, não seriam necessários nem os outros cinco aminoácidos.

Tabela 4.13 - Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* em cultivos contendo aminoácidos preferenciais a 10,0 e 20,0 g/L.

Meio de crescimento	Meio de produção	Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L) pH_i= 8,0	aa preferenciais (10,0g/L)	12	8,05	1,93	25
	Soro de queijo (20,0g/L)	24	8,69	5,49	335
	Solução salina (0,22g/L)	36	9,14	3,93	394
	Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	48	9,34	3,79	301
	pH_i=7,0				
	aa preferenciais (20,0g/L)	12	8,11	3,83	193
	Soro de queijo (20,0g/L)	24	8,60	3,12	361
	Solução salina (0,22g/L)	36	9,04	4,59	592
Fenilacetato de potássio (3,5g/L)	48	9,20	3,67	580	
pH_i=7,0					

Observando-se os ensaios com meios contendo aa preferenciais, verifica-se que em 36 horas no cultivo com 20,0 g/L, a atividade enzimática atingiu o máximo

de 592 UI/L, enquanto o máximo atingido com a concentração de 10,0 g/L foi 394 UI/L. Esses resultados indicam que o efeito inibidor/repressor ocorrido no ensaio com aa totais a 20,0 g/L pode ter sido causado por algum aminoácido individual omitido entre os preferencialmente consumidos, pois nos ensaios com aa preferenciais, observou-se uma maior produção quando a concentração foi aumentada de 10,0 para 20,0 g/L. Neste caso verificou-se também que a concentração máxima de enzimas não estava associada ao crescimento celular, pois os picos de crescimento celular ocorreram em 24 horas, enquanto as máximas atividades enzimáticas foram obtidas em 36 horas de cultivo, possivelmente após esgotamento total dos aminoácidos.

O meio contendo soro de queijo, fenilacetato de potássio e os aminoácidos preferenciais em concentração 20,0 g/L foi mais eficiente que o meio composto por aminoácidos totais, gerando aumento significativo nos níveis de expressão de PGA. Contudo, o aumento no tempo de produção e o custo adicional de aminoácidos requerem estudo econômico para decidir se é viável o uso de 20,0 g/L.

Como foi observada nos ensaios anteriores, a utilização de aminoácidos, cuja composição elementar divide-se entre carbono e nitrogênio, torna difícil o estabelecimento de uma composição ótima para esse nutriente, pois concentrações que favorecem sua aplicação como fonte de nitrogênio, podem inibir a sua utilização por excesso de carbono, e vice-versa. Levando isso em consideração, foi realizado teste com fontes individuais de carbono (fenilacetato de potássio) e nitrogênio (uréia), em substituição aos aminoácidos livres que atuavam como fonte conjunta desses dois nutrientes. Suas concentrações foram baseadas na composição da solução de 10,0 g/L de aminoácidos preferenciais, onde carbono e nitrogênio contribuíam com 41% e 17%, respectivamente. Nesse ensaio, além do fenilacetato de potássio como fonte de carbono, foram adicionados 3,5 g/L utilizados como indutor na produção da enzima. Os resultados do ensaio com meio sintético de nitrogênio pode ser observado na Tabela 4.14.

Neste ensaio o meio padrão (aminoácidos preferenciais 10,0 g/L, soro de queijo e sais) foi utilizado novamente na fase de crescimento do microrganismo, já que este vem garantindo bons níveis de crescimento celular.

Observando-se a Tabela 4.14, verifica-se que a utilização de uréia e fenilacetato de potássio, embora tenham permitido um ótimo crescimento do

microrganismo, 7,69 g/L em 48 horas de cultivo, não promoveram produção significativa da enzima, 96 g/L, em 48 horas de cultivo.

Tabela 4.14 - Concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* em cultivo contendo uréia.

Meio de crescimento	Meio de produção	Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L) pH_i= 8,0	Uréia (3,60g/L)	12	8,05	2,32	0
	Soro de queijo(20,0g/L)	24	8,52	4,60	38
	Solução salina (0,22g/L)				
	CaCO ₃ (4,10g/L)	36	8,68	7,38	85
	Fenilacetato de potássio (10,0g/L)	48	9,26	7,69	96
	pH_i=7,0				

Cultivos compostos por fontes complexas de nitrogênio e carbono foram também testados, sendo que o primeiro lote de ensaios reproduzia o meio sólido de armazenamento e conservação do microrganismo (meio LB). A outra fonte complexa utilizada foi a água de maceração de milho (AMM), que tem sido amplamente reportada na literatura como substrato na produção de PGA (Shewale et al, 1989; Parmar et al, 2000), fato este que nos motivou a realizar este ensaio. A concentração deste nutriente foi baseada na contribuição de nitrogênio (17%) na solução de aminoácidos 10,0 g/L, sabendo-se que AMM contém 3,5% de nitrogênio em sua composição. Os resultados de ambos os cultivos são apresentados na Tabela 4.15.

Pode-se observar que a máxima concentração celular no meio de cultivo LB, 3,12 g/L, foi atingida após 48 horas de cultivo, porém, medidas de atividade enzimática só acusaram produção pouco expressiva de PGA (51 UI/L) em 36 horas de cultivo, indicando que extrato de levedura e triptona, apesar de promoverem crescimento do microrganismo, não compõem um meio adequado para a produção da enzima.

A água de maceração de milho, embora tenha promovido crescimento do microrganismo, 4,56 g/L em 36 horas de cultivo, também não conduziu a valores de atividades enzimáticas significativos, 23 UI/L em 48 horas, provavelmente por conter carboidratos que por serem de fácil assimilação reprimam a síntese da enzima.

Tabela 4.15 - Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* em meio LB –bactotripton/extrato de levedura e meio contendo água de maceração de milho (AMM).

Meio de crescimento	Meio de produção	Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
Extrato de levedura (5,0g/L) Bacto tripton (10,0g/L) NaCl (5,0g/L) pH_i= 8,0	Extrato de levedura (5,0g/L) Bacto tripton (10,0g/L) NaCl (5,0g/L) pH_i=7,0	12	8,97	2,39	0
		24	8,89	2,78	0
		36	9,41	2,77	51
		48	9,78	3,12	0
aa preferenciais (10,0g/L) Soro de queijo (7,0g/L) Solução salina (0,5g/L) pH_i= 8,0	AMM (47,0g/L) Soro de queijo(20,0g/L) Solução salina (0,22g/L) Fenilacetato de potássio (3,5g/L) pH_i=7,0	12	8,15	3,23	0
		24	8,43	4,25	0
		36	8,38	5,46	0
		48	9,26	3,91	23

Os resultados mostraram-se inexpressivos com a utilização de fontes complexas de carbono e nitrogênio, sendo que o meio de cultivo composto por aminoácidos consumidos preferencialmente pelo microrganismo 20 g/L, fenilacetato de potássio 3,5 g/L, solução com diferentes sais 0,22 g/L, e soro de queijo 20,0 g/L mostrou-se ser o mais eficiente na produção da PGA, atingindo máxima concentração celular e atividade enzimática, 4,59 g/L e 592 UI/L, respectivamente, em 36 horas de cultivo, com pHs para os meios de crescimento e produção iguais a 8,0 e 7,0, respectivamente, e temperatura controlada em 30°C

4.4 Produção de PGA por *Bacillus megaterium* em Biorreator

A concentração de oxigênio dissolvido na produção da PGA é uma variável comumente estudada em cultivos de microrganismos, pois tanto seu excesso como sua falta pode prejudicar a produção da enzima. Esta foi a principal motivação na realização dos cultivos em biorreator. Esses ensaios foram também aproveitados para se observar o efeito de pulsos de nutrientes, os quais eram adicionados após se verificar que havia se atingido o pico de produção da enzima.

Estudos mostraram que o meio composto por aminoácidos consumidos preferencialmente 20 g/L, fenilacetato de potássio 3,5 g/L, solução com diferentes sais 0,22 g/L, e soro de queijo 20,0 g/L foi o mais efetivo na produção da enzima. Entretanto, os ensaios em biorreator foram realizados com meio de cultivo composto por aminoácidos preferenciais 10,0 g/L, soro de queijo 20,0 g/L, solução de sais 0,22 g/L e indutor fenilacetato de potássio 3,5 g/L, para que pudessem ser comparados com alguns estudos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa em que se insere este trabalho.

As condições de processo fixadas para todos os ensaios em biorreator foram: aeração 2,0 L/min, temperatura 30°C e ausência de controle de pH. A Tabela 4.16 apresenta as estratégias utilizadas para o estudo da influência da concentração de oxigênio dissolvido bem como as composições dos pulsos adicionados no decorrer das fermentações.

Tabela 4.16 – Ensaios de produção de PGA por *Bacillus megaterium* realizados em biorreator – variáveis para o estudo da influência de oxigênio dissolvido e composições dos pulsos.

Ensaios	Oxigênio Dissolvido	Pulsos
1	20% de oxigênio dissolvido durante todo o cultivo	-
2	20% de oxigênio dissolvido durante todo o cultivo	-
3	20% de oxigênio dissolvido até 9 horas e limitação em 5% até o final do cultivo	-
4	Agitação constante em 300 rpm durante todo o cultivo	1 pulso composto por soro de queijo, sais, aminoácidos e fenilacetato de potássio
5	10% de oxigênio dissolvido durante todo o cultivo	-
6	10% de oxigênio dissolvido durante todo o cultivo	3 pulsos compostos por soro de queijo, sais, aminoácidos e fenilacetato de potássio
7	5% de oxigênio dissolvido até 17 horas e 10% até o final do cultivo	4 pulsos compostos por soro de queijo, sais, aminoácidos e fenilacetato de potássio e 1 pulso composto por sulfato de amônio e fenilacetato de potássio

Paralelamente a cada cultivo realizado em biorreator foi feito um ensaio em shaker – com temperatura controlada em 30°C e agitação de 300 rpm - para verificar se haveria diferença na produção de PGA entre esses dois modos e também, para se ter um controle do nível máximo de atividade enzimática e da variabilidade do inóculo. Ressaltando que as concentrações celulares atingidas na etapa de inóculo de todos os experimentos realizados em biorreator atingiram $2,80 \pm 0,05$ g/L de células.

4.4.1 1º Ensaio em Biorreator: 20% de Oxigênio Dissolvido Durante Todo o Cultivo

O objetivo dos ensaios em biorreator foi encontrar uma concentração ótima de oxigênio dissolvido que possibilite máxima produção de PGA. O primeiro ensaio foi realizado com controle de oxigênio dissolvido (O.D.) em 20% de saturação e os resultados são apresentados na Tabela 4.17 e Figura 4.3.

Tabela 4.17 – Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* : 1º Ensaio em biorreator, 20% O.D.

Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
0	7,24	0,21	-
2	7,87	0,44	0
4	8,02	0,55	0
6	8,16	0,97	0
8	8,47	2,26	58
10	8,58	3,53	94
12	8,66	4,99	179
14	8,78	5,27	199
16	8,86	4,94	195
18	8,89	4,92	212
20	8,90	4,79	190
22	8,93	4,73	168
25	8,96	4,60	165
Shaker – 24h		4,07	427

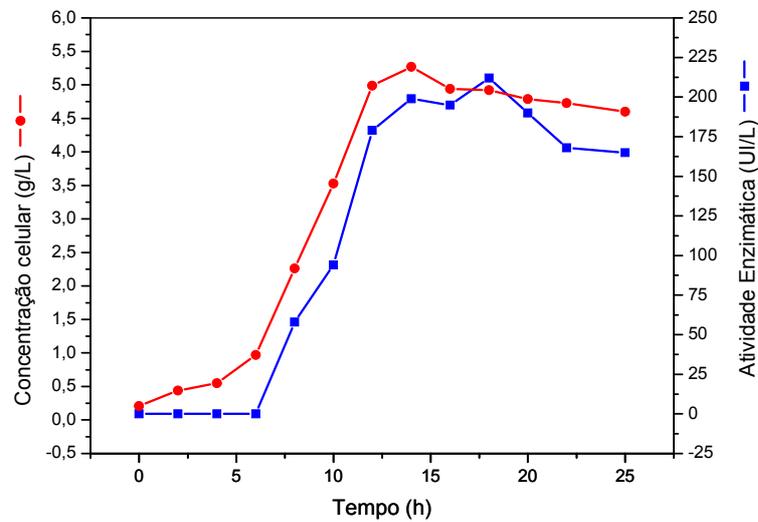


Figura 4.3 – Valores de concentração celular e atividade enzimática na produção de PGA por *Bacillus megaterium*: 1º Ensaio em biorreator, 20% O.D.

A observação dos resultados mostra que a produção da enzima está associada ao crescimento do microrganismo. A concentração celular máxima atingida no biorreator foi 5,27 g/L em 14 horas de cultivo e os níveis de atividade enzimática alcançaram 212 UI/L em 18 horas, valor este, inferior ao atingido pelo ensaio em shaker, 427 UI/L em 24 horas de cultivo. A atividade específica máxima para este ensaio foi de 43,1 UI/g_{célula}.

Um experimento foi reproduzido nas mesmas condições deste primeiro cultivo para que esses resultados fossem confirmados.

4.4.2 2º Ensaio em Biorreator: 20% de Oxigênio Dissolvido Durante Todo o Cultivo

Os resultados do 2º ensaio em biorreator, com condições idênticas ao 1º, podem ser analisados na Tabela 4.18 e Figura 4.4.

Tabela 4.18 – Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium*: 2º Ensaio em biorreator, 20% O.D.

Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
0	7,07	0,21	-
2	7,62	0,35	0
4	7,86	0,62	0
6	8,05	1,35	0
8	8,01	2,78	32
10	8,10	3,49	80
12	8,26	4,00	142
14	8,42	4,58	188
16	8,67	3,98	202
18	8,61	4,08	194
20	8,73	3,68	182
22	8,73	3,60	200
25	8,73	3,58	189
Shaker – 24h		3,36	385

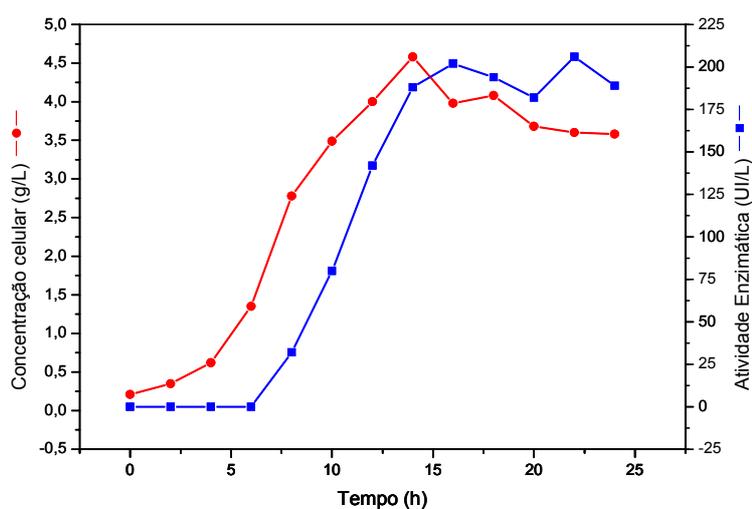


Figura 4.4 – Valores concentração celular e atividade enzimática na produção de PGA por *Bacillus megaterium*: 2º Ensaio em biorreator, 20% O.D.

Os resultados obtidos no 1º ensaio foram confirmados. Novamente observa-se que a atividade enzimática atingiu valor mais elevado no ensaio em frascos agitados (385 UI/L). Pode-se notar também que os níveis de atividade da enzima permanecem praticamente constantes após 14 horas de cultivo, já que o desvio é de ± 22 UI/L. A máxima atividade específica para este ensaio foi de 55,6 UI/g_{célula}.

4.4.3 3º Ensaio em Biorreator: 20% de Oxigênio Dissolvido até 9 Horas e Limitação em 5% até o Final do Cultivo

Tabela 4.19 – Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* : 3º Ensaio em biorreator, 20% O.D. no início e 5% O.D. após 9 hs de cultivo

Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
0	7,00	0,10	-
2	7,40	0,24	0
4	7,73	0,47	0
6	8,09	0,92	0
8	8,28	1,53	32
10	8,30	3,21	93
12	8,33	3,68	172
14	8,49	4,07	211
16	8,62	4,29	217
18	8,74	3,85	205
20	8,80	3,90	195
22	8,87	3,56	185
25	8,92	3,34	180
Shaker – 24h		3,98	331

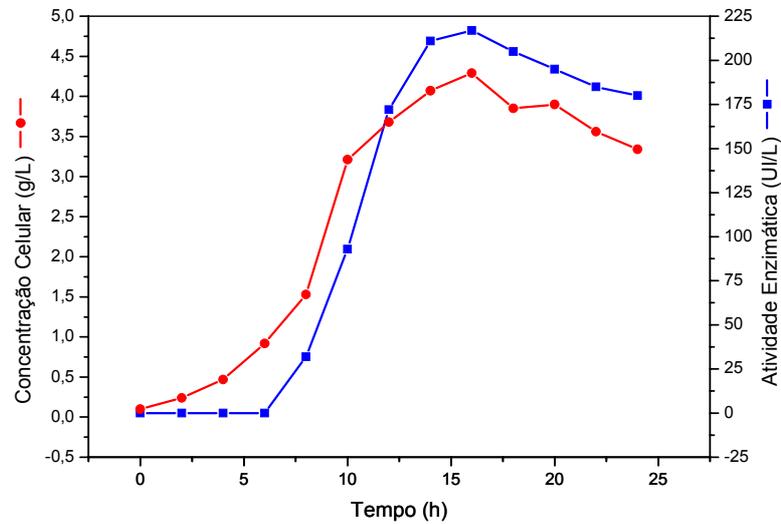


Figura 4.5 – Valores de concentração celular e atividade enzimática na produção de PGA por *Bacillus megaterium* : 3º Ensaio em biorreator, 20% O.D. no início e 5% O.D. após 9 hs de cultivo

Os resultados do ensaio com limitação na concentração do oxigênio dissolvido de 20 para 5% após 9 horas de cultivo, apresentados na Tabela 4.19 e Figura 4.5, não parece ter influenciado no crescimento do microrganismo e produção da PGA, atingindo concentração celular máxima (4,29 g/L) e pico de atividade enzimática (217 UI/L) em 16 horas de fermentação. Estes valores não apresentam diferença significativa em relação aos ensaios com 20 % O.D. A atividade específica máxima para este ensaio foi de 54,0 UI/g_{célula}.

Dessa forma, uma nova estratégia foi empregada no estudo da influência da concentração de oxigênio dissolvido, fixando-se a agitação em 300 rpm.

Após esses primeiros ensaios, verificou-se que após um pico de atividade enzimática, esta permanecia constante por um período e depois decaía, assim como acontecia nos ensaios em shaker. As análises proteolíticas nos caldos de fermentação provaram que não havia presença de proteases no meio de produção. Assim, este fato poderia estar sendo causado pela ausência de algum componente do meio totalmente consumido, portanto, optou-se por utilizar uma estratégia de adição de pulsos contendo nutrientes.

4.4.4 4º Ensaio em Biorreator: Agitação Fixa em 300 rpm no Decorrer de todo o Cultivo e Adição de 1 Pulso

Os resultados dos ensaios anteriores mostraram que a produção da enzima era sempre maior em câmara rotativa controlada numa agitação de 300 rpm do que no biorreator. Assim, realizou-se um ensaio em biorreator mantendo-se a agitação constante em 300 rpm durante todo cultivo, com o objetivo de reproduzir as condições do shaker.

O meio de cultivo do fermentador, que foi o mesmo para todos os ensaios, era composto por aminoácidos preferenciais 10,0 g/L, soro de queijo 20,0 g/L, solução de sais 0,22 g/L e indutor fenilacetato de potássio 3,5 g/L. O pulso adicionado em 24 horas de cultivo tinha a mesma composição e concentração do meio de produção. Os resultados podem ser analisados na Tabela 4.20 e Figura 4.6.

Os resultados mostram maior produção da enzima em câmara rotativa do que em biorreator, diferente do que se esperava com a utilização desta estratégia, em que foi empregada a mesma agitação, de 300 rpm, em ambos. Analisando-se os resultados até 24 horas (momento em que foi adicionado o pulso de nutrientes), verifica-se uma concentração celular máxima igual a 4,20 g/L em 24 horas de cultivo e um pico de atividade enzimática, 223 UI/L, em 22 horas. A atividade específica máxima foi igual a do ensaio anterior (54,0 UI/g_{célula}).

Este fato indica que mesmo que se estabeleça um controle igual para a variável agitação, as condições de aeração não são reproduzidas no biorreator, pois se deve levar em consideração o aumento de escala e as diferenças na transferência de oxigênio.

Tabela 4.20 – Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* : 4º Ensaio em biorreator, agitação fixa em 300 rpm e adição de 1 pulso

Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
0	7,24	0,17	0
2	7,87	0,26	0
4	8,02	0,41	0
6	8,16	0,67	0
8	8,47	1,09	45
10	8,58	1,94	64
12	8,66	2,54	68
14	8,78	3,10	88
16	8,86	3,25	107
18	8,89	3,96	137
20	8,90	3,90	164
22	8,93	4,11	223
24	8,96	4,20	209
26	8,09	3,82	247
28	8,18	3,75	243
30	8,26	4,09	220
32	8,32	3,92	212
Shaker – 24h	8,55	3,88	407

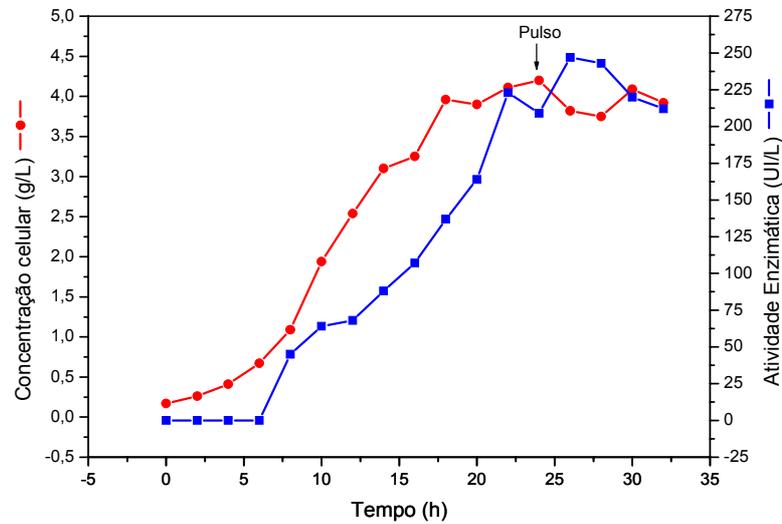


Figura 4.6 – Valores concentração celular e atividade enzimática na produção de PGA por *Bacillus megaterium* : 4º Ensaio em biorreator, agitação fixa em 300 rpm e adição de 1 pulso

Em 24 horas de cultivo, observou-se uma pequena queda nos níveis de atividade enzimática, o que poderia estar sendo causada pelo esgotamento de algum nutriente no meio. Optou-se então, por adicionar 300 mL de um meio suplementar na forma de pulso. A Figura 4.6 mostra que após o pulso houve um pico na atividade da enzima, que chegou a 247 UI/L, mas ainda não atingindo os níveis alcançados pelo ensaio em shaker, 407 UI/L.

4.4.5 5º Ensaio em Biorreator: 10% de Oxigênio Dissolvido Durante Todo o Cultivo

A busca por uma condição de limitação de oxigênio que promova altas concentrações de enzimas nos motivou a realizar um ensaio mantendo a concentração de oxigênio dissolvida em 10% do valor de saturação em todo o cultivo. A Tabela 4.21 e Figura 4.7 apresentam os resultados deste ensaio.

Tabela 4.21 – Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium* : 5° Ensaio em biorreator, 10% O.D.

Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
0	6,97	0,16	-
2	7,85	0,24	0
4	7,92	0,43	0
6	8,10	0,81	0
8	8,22	1,31	0
10	8,26	1,84	43
12	8,40	2,80	96
14	8,47	3,57	186
16	8,53	4,29	294
18	8,60	5,31	356
20	8,74	4,76	316
22	8,85	4,30	344
24	8,93	4,29	276
26	8,97	4,19	259
Shaker – 24h		4,19	380

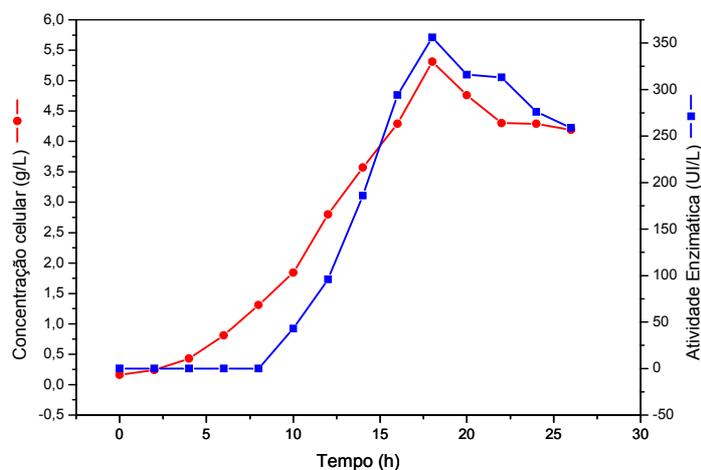


Figura 4.7 – Valores de concentração celular e atividade enzimática na produção de PGA por *Bacillus megaterium* : 5° Ensaio em biorreator, 10% O.D.

Neste 5º ensaio em biorreator, observa-se a máxima produção da enzima associada ao crescimento celular. Em 18 horas de cultivo, foi alcançada a concentração máxima de células, 5,31 g/L, bem como o pico de atividade enzimática, 356 UI/L.

Conforme pode ser analisado na Tabela 4.21, este foi o cultivo realizado em biorreator que conduziu a níveis de atividade da enzima mais próximos do ensaio em câmara rotativa até o presente momento. Além disso, a concentração de 10% de oxigênio dissolvido foi a mais favorável por enquanto, alcançando valores de atividade enzimática superiores a todos os ensaios anteriores.

Para confirmar esses resultados, reproduziu-se um ensaio nas mesmas condições. Os resultados deste cultivo estão apresentados na Tabela 4.22 e Figura 4.8.

4.4.6 6º Ensaio em Biorreator: 10% de Oxigênio Dissolvido Durante Todo o Cultivo e Adição de 3 Pulsos

Para analisar a influência da concentração de oxigênio dissolvido neste ensaio, devem-se considerar os dados até 24 horas da Tabela 4.22, tempo no qual começaram a ser adicionados os pulsos.

Observa-se que a máxima concentração de células (5,00 g/L) foi atingida em 20 horas e o pico da atividade enzimática (451 UI/L), em 24 horas. Esses resultados foram bastante satisfatórios, pois foi o ensaio que conduziu aos melhores níveis de produção da PGA, em biorreator, no grupo em que se insere este trabalho. Além disso, de forma inédita, a máxima produção de enzima foi observada no biorreator, e não em shaker, como em todos os ensaios anteriores.

Esses resultados confirmam os obtidos no ensaio anterior, que mostraram ser a concentração de 10% de oxigênio dissolvido a mais favorável à produção da enzima até o momento.

Tabela 4.22 – Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium*: 6° Ensaio em biorreator, 10% O.D. e adição de 3 pulsos

Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
0	7,24	0,16	0
2	7,77	0,23	0
4	7,82	0,37	0
6	7,86	0,68	0
8	8,00	1,04	0
10	8,13	1,89	58
12	8,26	2,74	141
14	8,35	3,55	237
16	8,39	3,93	346
18	8,49	4,80	397
20	8,57	5,00	446
22	8,73	4,60	428
24	8,80	4,56	451
26	8,67	5,23	456
28	8,77	5,79	497
30	8,87	5,48	468
32	8,67	5,71	457
34	8,72	6,35	450
36	8,79	6,52	458
38	8,86	6,10	484
40	8,93	6,05	494
42	8,77	6,46	503
44	8,79	6,50	480
46	8,79	6,58	488
48	8,84	6,45	496
Shaker – 24h	8,56	4,24	373

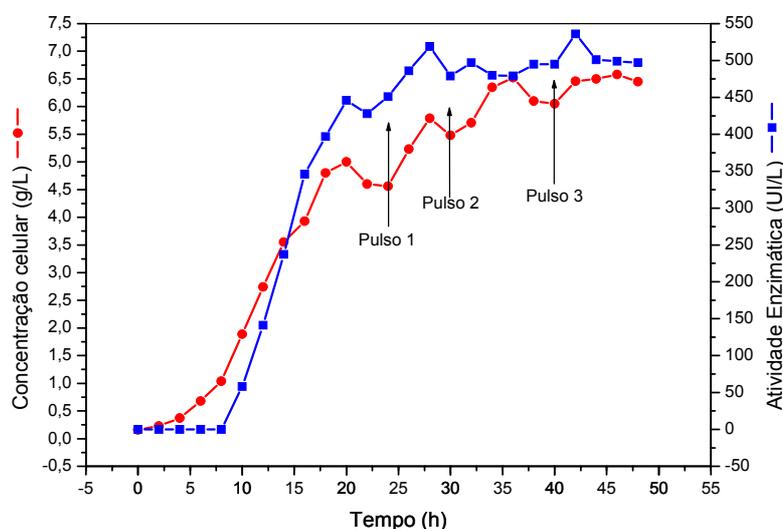


Figura 4.8 – Valores de concentração celular e atividade enzimática na produção de PGA por *Bacillus megaterium*: 6º Ensaio em biorreator, 10% O.D. e adição de 3 pulsos

Neste mesmo ensaio, foi investigado o efeito da adição de pulsos ao meio de cultivo, de forma a acrescentar possíveis nutrientes esgotados no meio. Esses pulsos tinham composição e concentração igual ao meio inicial de produção e diferente do 4º ensaio, em que foi adicionado um pulso de 300 mL, nesta fermentação, adicionaram-se 3 pulsos de 100 mL, em 24, 30 e 40 horas de cultivo. A adição era feita quando se observava uma queda na concentração celular, sinal que algum nutriente importante para o crescimento do microrganismo havia se exaurido.

Esta estratégia mostrou-se bastante eficiente, pois como se pode notar na Figura 4.8, houve uma elevação nos níveis de atividade enzimática após os pulsos, que permaneceram praticamente constantes, em torno de 490 UI/L, a não ser por um pico (503 UI/L), em 42 horas de cultivo.

Ressaltando que os valores de concentração celular após os pulsos não denotam a real massa celular, indicam somente um parâmetro para comparação, pois como a medida é realizada através da densidade ótica, a adição dos pulsos com uma coloração característica devido ao soro de queijo, distorce a leitura da mesma. Por este motivo, não será comentada a atividade específica (UI/g_{célula}) nestes casos.

4.4.7 7º Ensaio em Biorreator: 5% de Oxigênio Dissolvido até 17 Horas e 10% até o Final do Cultivo e Adição de 5 Pulsos

Ainda buscando confirmar o favorecimento de condições limitadas de oxigênio na produção da enzima, foi realizado um ensaio com limitação de 5% do valor de saturação.

Inicialmente, programou-se um experimento com concentração de 5% de oxigênio dissolvido durante todo o cultivo. Mas a partir das 16 horas, observou-se que a concentração celular estava sofrendo uma queda, possivelmente causada pela insuficiência de oxigênio. Para evitar o decaimento celular, aumentou-se a concentração de oxigênio dissolvido para 10%, em 17 horas de cultivo.

A estratégia dos pulsos também foi utilizada. Foram adicionados cinco pulsos, sendo que os quatro primeiros, de 100 mL, tinham composição e concentração iguais ao meio de produção inicial e foram adicionados em 30, 42, 50 e 54 horas de cultivo. O último, de 300 mL, era composto por sulfato de amônio 2,0 g/L e fenilacetato de potássio 3,5 g/L e foi inserido em 56 horas de fermentação.

Os resultados deste experimento estão apresentados na Tabela 4.23 e Figura 4.9.

Limitando-se o oxigênio dissolvido em 5% de saturação, provocou-se uma restrição na respiração do microrganismo, gerando ligeira queda na massa celular a partir de 14 horas de cultivo, tempo em que a atividade enzimática atingiu 118 UI/L. Ou seja, a utilização de 5% de oxigênio dissolvido não é uma estratégia adequada para produção de PGA.

Em 17 horas de cultivo, alterou-se o controle de oxigênio para 10 % e em 19 horas o microrganismo já mostrou uma recuperação no crescimento, chegando a 4,34 g/L de células e 202 UI/L de enzimas em 26 horas de cultivo. Essa menor produção quando comparada com o uso de 10% O.D. desde o início do cultivo, mostra que houve uma perda irrecuperável com o uso de 5% O.D.

Tabela 4.23 – Valores de pH, concentração celular (C_x) e atividade enzimática (A.E.) na produção de PGA por *Bacillus megaterium*: 7º Ensaio em biorreator, 5% O.D. até 17 horas e 10% até o final do cultivo.

Tempo (h)	pH	$C_x \pm 0,11$ (g/L)	A.E. ± 22 (UI/L)
0	7,10	0,15	0
2	7,79	0,27	0
4	7,86	0,45	0
6	8,01	0,68	0
8	8,22	1,42	50
10	8,32	2,37	112
12	8,52	2,42	102
16	8,61	2,11	118
19	8,63	2,22	125
22	8,60	3,35	143
24	8,62	3,90	162
26	8,72	4,34	202
28	8,76	4,07	180
30	8,94	3,70	181
32	8,98	3,63	188
34	8,84	4,06	197
36	8,86	4,12	208
38	8,80	4,54	190
40	8,88	4,66	219
42	8,95	4,59	205
46	8,96	4,98	232
48	8,90	5,32	214
50	8,92	5,28	188
52	8,73	5,72	217
54	8,75	6,49	236
56	8,82	6,87	252
58	8,59	4,73	203
60	8,65	5,21	221
62	8,71	5,69	250
64	8,76	5,81	236
70	9,00	5,52	222
72	9,02	5,56	215
Shaker – 24h	8,30	3,90	342

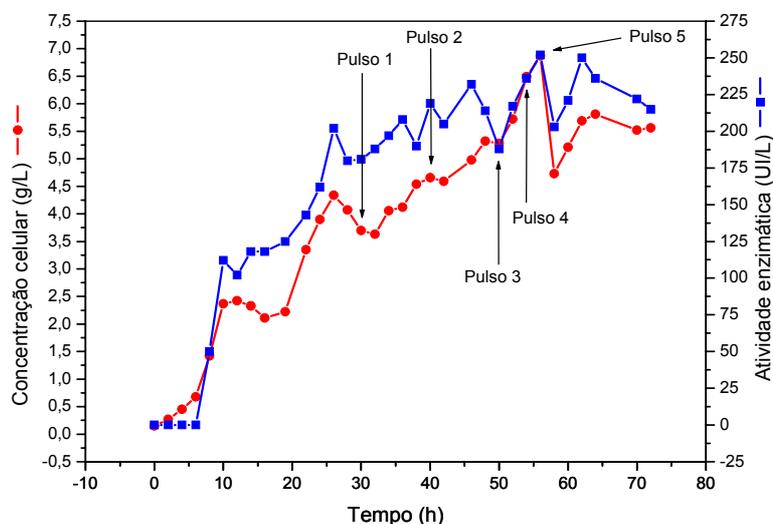


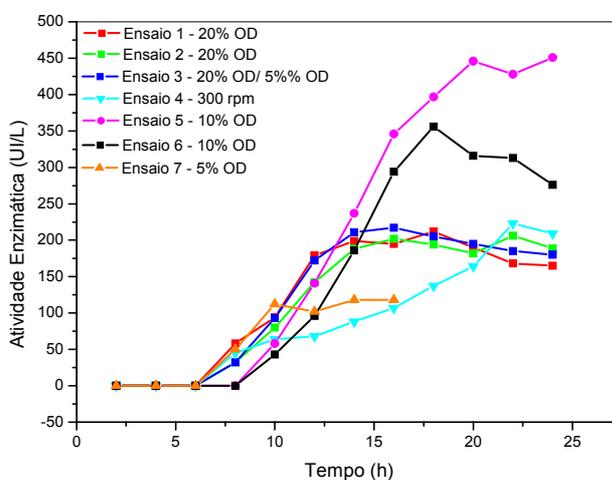
Figura 4.9 – Valores de concentração celular e atividade enzimática na produção de PGA por *Bacillus megaterium* : 7 ° Ensaio em biorreator, 5% O.D. até 17 horas e 10% O.D. até o final do cultivo

A adição dos 4 pulsos (30, 42, 50 e 54 horas), compostos por aminoácidos preferenciais 10,0 g/L, soro de queijo 20,0 g/L, sais 0,22 g/L e fenilacetato de potássio 3,5 g/L, permitiram a manutenção do crescimento celular e aumento na produção da enzima, que alcançou o pico (252 UI/L) em 56 horas.

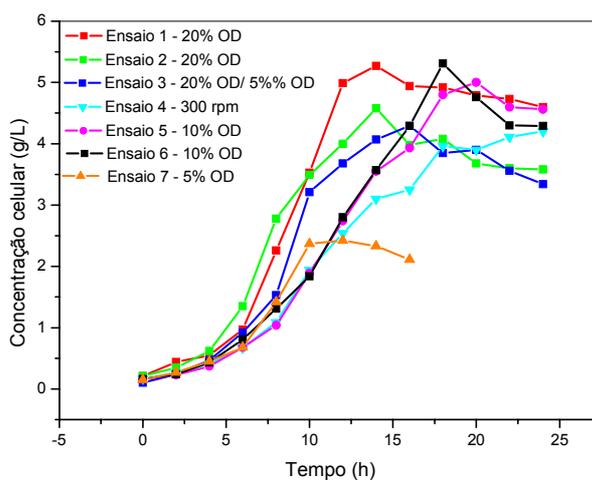
Uma última tentativa de favorecimento da produção da PGA foi realizada adicionando-se, em 56 horas de cultivo, um pulso de 300 mL composto por sulfato de amônio 2,0 g/L e fenilacetato de potássio 3,5 g/L ao meio de produção. Comparando-se as concentrações celulares após o último pulso, verifica-se que há um aumento até 64 horas. A atividade enzimática atinge o máximo, 250 UI/L, em 62 horas de cultivo, valor este praticamente igual ao alcançado com os primeiros pulsos. Isto mostra que a adição do pulso composto por sulfato de amônio não parece ser uma estratégia adequada para aumento da produção de PGA.

4.4.8 Análise Comparativa dos Ensaio de Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de PGA por *Bacillus megaterium* em Biorreator

Este tópico tem como objetivo estabelecer uma comparação da influência das diferentes concentrações de oxigênio dissolvido nos ensaios realizados em biorreator, sabendo-se que as condições de processo fixadas para todos foram: aeração 2,0 L/min, temperatura 30°C e ausência de controle de pH. São apresentados a seguir os gráficos comparativos desses ensaios.



(A)



(B)

Figura 4.10 – Ensaio de influência da concentração de oxigênio dissolvido, realizados em biorreator, a 30°C: (A) Valores de atividade enzimática, em UI/L; (B) Valores de concentração celular, em g/L

A observação da Figura 4.10 (A) mostra que nos cultivos com concentração de oxigênio dissolvido em 10%, ensaios 5 e 6, a produção da PGA foi mais elevada, atingindo valores em torno de 450 e 360 UI/L, respectivamente. É interessante notar, comparando-se as Figuras 4.10 (A) e 4.10 (B), que nem sempre um crescimento celular mais pronunciado leva a uma maior produção de enzima, ou seja, a concentração de oxigênio dissolvido ótima para o crescimento celular é diferente da concentração ótima para a produção da PGA. Apesar dos ensaios 5 e 6 apresentarem maior produção da enzima, os ensaios 1, 2 e 3, com oxigênio dissolvido em 20% no período exponencial, mostrou crescimento celular mais acentuado nesta fase. Observa-se, também, um comportamento similar quanto a atividade enzimática nestes três ensaios, com pico em torno de 200 UI/L entre 16 e 18 horas de cultivo, sofrendo uma leve queda nesses valores após esse período.

No ensaio 4, em que foi mantida a agitação constante em 300 rpm, nota-se um atraso, tanto no crescimento celular, que atingiu o máximo, 4,20 g/L, em 24 horas de cultivo, quanto na produção da enzima, alcançando 223 UI/L em 22 horas, fornecendo uma atividade específica de 54 UI/g_{célula}.

Para o ensaio 7, a observação da Figura 4.10 (B) mostra que após 12 horas de cultivo, os níveis de crescimento celular diminuem, devido ao emprego de condições limitadas de oxigênio dissolvido em 5%. A produção da enzima também é afetada pela baixa concentração de oxigênio dissolvido. Conforme pode ser visto na Figura 4.10 (A) a atividade enzimática chega a 118 UI/L em 14 horas de cultivo, permanecendo constante após 2 horas. O cultivo com a condição de 5% de oxigênio dissolvido não teve continuidade, pois o crescimento celular começou a cessar após o pico em 12 horas e conseqüentemente, ocorreria morte dos microrganismos. Assim, a condição de limitação em 5% não foi uma estratégia adequada para a produção da PGA.

Comparando-se, então, todos os ensaios com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido, pode-se concluir que a condição de 10% é a mais favorável na produção de PGA por *Bacillus megaterium*. Resultado este que pode ser analisado também se comparando as atividades específicas, em UI/g_{célula}, expostas na Figura 4.11.

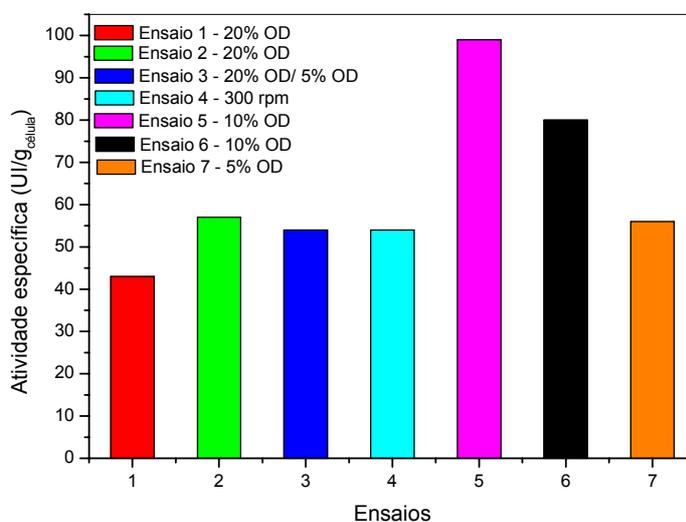


Figura 4.11 – Valores máximos de atividade específica em cada ensaio, em UI/g_{célula}, no estudo de influência da concentração de oxigênio dissolvido.

Vojtisek e Slezak, 1974, ao estudarem o efeito do oxigênio dissolvido na produção de PGA por *Escherichia coli*, concluíram que a síntese da enzima é fortemente reprimida quando este é mantido em altas concentrações.

León et al, 2003, em seu trabalho sobre os efeitos da tensão de oxigênio dissolvido na produção de PGA por *E.coli* recombinante, discutem que ocorre uma relação inversa entre a concentração de oxigênio dissolvido e a máxima atividade específica em alguns recombinantes, enquanto o contrário é observado em outros.

4.5 Análise da Atividade Proteolítica nos Caldos de Fermentação

Analisando-se os resultados dos ensaios com *Xanthomonas campestris*, pode-se observar que apesar do crescimento celular não houve produção da enzima. Nos cultivos de *Bacillus megaterium* nota-se que após o pico de atividade enzimática ocorre uma queda, ainda que pouco significativa, nos níveis dessa variável, principalmente nos cultivos em câmara rotativa ‘shaker’. Uma explicação para este fato pode ser que os microrganismos estejam secretando proteases, com a finalidade de hidrolisar proteínas presentes no meio, produzindo nutrientes de mais fácil assimilação, como peptídeos menores e aminoácidos. Se essas proteases estivessem mesmo sendo produzidas, elas poderiam hidrolisar também a PGA, resultando numa atividade enzimática menor do

que a realmente alcançada, explicando, assim, a queda observada nos valores de atividade da enzima de interesse ou até mesmo a não detecção da produção, como ocorreu nos caldos de fermentação de *X. campestris*.

A fim de detectar a presença de proteases nos meios de produção, foi utilizada a técnica do pHstato, o qual permite manter o pH da reação constante pela adição de uma base. Uma vez que a hidrólise de proteínas é acompanhada pela liberação de prótons (terminais carboxílicos), ao se adicionar uma alíquota do caldo de cultivo na presença de um substrato protéico (no caso, caseína), foi possível medir a atividade de uma protease em termos de consumo de NaOH para manutenção do pH.

Foram analisados os caldos de fermentação de *X. campestris*, antes e após lise celular, para averiguar a presença de proteases tanto extra, como intracelular. Realizaram-se, também, análises para todas as amostras de *Bacillus megaterium* – diferentes pHs, temperaturas, meios de produção, concentrações de oxigênio dissolvido – uma vez que qualquer mudança de variável poderia favorecer a produção de proteases.

Os resultados obtidos mostraram que o grau de hidrólise (G.H.) registrado foi da ordem de grandeza do branco (caldo de fermentação submetido a 80°C por 20 minutos para inativação da enzima), podendo-se concluir, então, que não há presença de proteases no meio de produção, dentro da precisão deste método.

4.6 Justificativa para o Aumento do pH no Decorrer dos Cultivos

Um fato que pode ser destacado em todos os ensaios, seja em câmara rotativa ‘shaker’ ou em biorreator, foi a tendência dos pHs a valores alcalinos no decorrer dos cultivos, o que pode ser justificado analisando-se o metabolismo celular dos microrganismos.

Os aminoácidos presentes nos meios de produção, quando não utilizados na biossíntese de proteínas, sofrem degradação oxidativa, assim, seus grupos α -amino (NH_2) são removidos em algum estágio, e se não utilizados para a síntese de novos aminoácidos ou outros produtos nitrogenados, são coletados, gerando, entre outros produtos, amônia.

A amônia excretada, sendo uma base fraca, promove uma elevação no pH dos meios de produção, que convergem para valores alcalinos no decorrer dos cultivos.

4.7. Caracterização de Penicilina G Acilase de *Bacillus megaterium*

Esta parte do trabalho tem como objetivo caracterizar a PGA de *Bacillus megaterium* quanto à:

- Estabilidade térmica
- Estabilidade alcalina
- Temperatura e pH ótimos
- Parâmetros cinéticos: Velocidade máxima ($V_{\text{máx}}$)
Constante de Michaelis-Menten (K_m)
- Energia de ativação

A cinética química procura analisar e caracterizar os fatores que influenciam a velocidade de uma reação química, tais como pH, temperatura e concentração de substrato. A determinação do pH e temperatura ótimos, bem como do modelo cinético que represente a influência da concentração de substrato é importante para utilização industrial da enzima e podem variar conforme o substrato utilizado e a origem da enzima.

Portanto, a caracterização da enzima faz-se necessária para comparação de suas propriedades com as produzidas por outros microrganismos.

4.7.1. pH e Temperatura Ótimos

Na determinação do pH ótimo da PGA de *Bacillus megaterium*, a atividade da enzima foi determinada utilizando-se como substrato soluções de Penicilina G potássica (PenG) 4% p/v a diferentes pHs, mantendo-se constante a temperatura em 37°C. Os resultados podem ser analisados na Tabela 4.24 e na Figura 4.12.

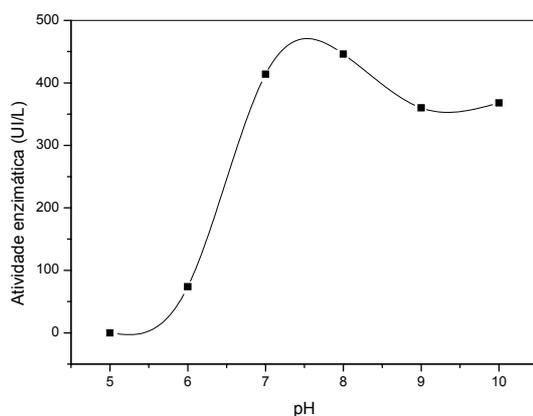
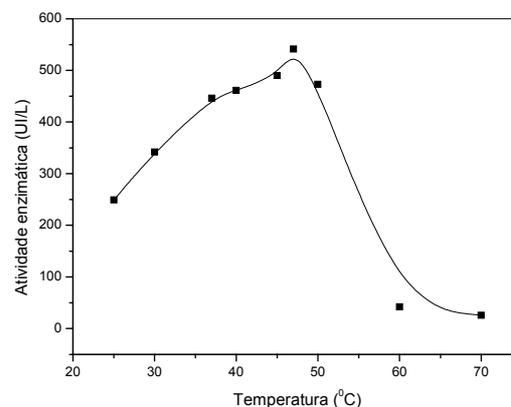
Já para temperatura ótima, a atividade da enzima foi medida realizando-se a hidrólise de PenG potássica 4% p/v em tampão fosfato, pH 8,0, variando-se a temperatura de reação na faixa de 25-70°C, como pode ser observado na Tabela 4.25 e Figura 4.13.

Tabela 4.24 - Atividade enzimática de PGA de *B. megaterium* em diferentes pHs

pH	Atividade Enzimática \pm 22 (UI/L)
5,0	0
6,0	74
7,0	414
8,0	446
9,0	360
10,0	368

Tabela 4.25 - Atividade enzimática de PGA de *B. megaterium* em diferentes temperaturas

Temp. (°C)	Atividade Enzimática \pm 22 (UI/L)
25	249
30	342
37	446
40	461
45	490
47	541
50	473
60	42
70	26

**Figura 4.12** – Determinação do pH ótimo**Figura 4.13** – Determinação da temperatura ótima.

Os resultados obtidos mostram que a máxima atividade enzimática ocorre a pH 8,0. Esse valor está de acordo com os dados obtidos em literatura, que reportam uma faixa de 7,8 - 8,0 para enzimas procedentes de diferentes microrganismos (Savidge e Cole, 1975).

Analisando os resultados em relação à temperatura ótima, estes indicam que a atividade máxima da PGA de *B. megaterium* na hidrólise da PenG ocorre à 47°C. Segundo Souza, 2004, PGA proveniente de linhagem de *B. megaterium* apresenta máxima atividade enzimática a 37°C.

4.7.2. Influência da Concentração de Substrato

A influência da concentração de substrato na atividade da PGA foi investigada tomando-se as velocidades iniciais da reação de penicilina G potássica 4% p/v a diferentes concentrações (0,5 – 10,0 mM), mantendo-se constante a temperatura a 37°C e pH 8,0 (tampão fosfato 100 mM). A Tabela 4.26 mostra as velocidades iniciais para as diferentes concentrações do substrato.

Tabela 4.26 - Velocidades iniciais de hidrólise de PenG catalisada por PGA de *B. megaterium*, para diferentes concentrações do substrato

C_{PenG} (mM)	Veloc. (mM/min)
0,5	0,0037
2	0,0174
5	0,0203
7,5	0,0213
10	0,0221

Uma vez que a cinética da maioria das reações enzimáticas costuma ser bem representada pelo modelo de Michaelis-Menten, este foi ajustado aos pontos experimentais, com o auxílio do software Origin 6.0, visando conseguir uma estimativa dos parâmetros cinéticos do modelo, conforme mostra Figura 4.14 e Tabela 4.27.

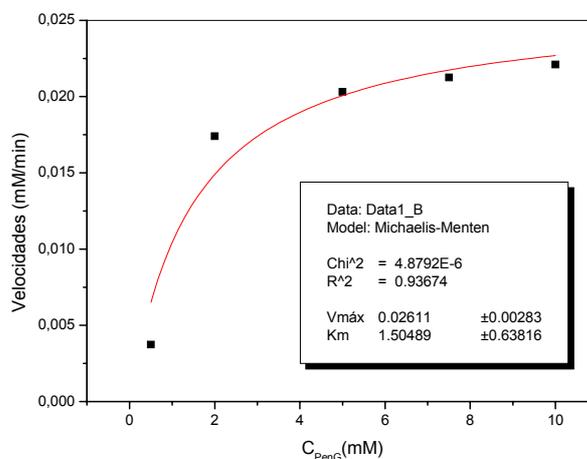


Figura 4.14 - Ajuste do Modelo de Michaelis-Menten a velocidades iniciais de hidrólise de Penicilina G, determinadas para várias concentrações de substrato, a pH 8,0 e 37°C.

Tabela 4.27 - Valores dos parâmetros cinéticos e respectivos erros, obtidos pelo ajuste dos pontos experimentais da reação de hidrólise de PenG catalisada por PGA de *Bacillus* ao modelo de Michaelis-Menten.

Parâmetros Cinéticos	Valores estimados	Erros
$V_{\text{máx}}$ (mmol/L.min)	$2,61 \cdot 10^{-2}$	$\pm 0,003$
K_m (mM)	1,505	$\pm 0,638$

Savidge e Cole, 1975 ao estudar a hidrólise de penicilina G obtiveram valores de K_m de 7,7 e 4,5 mM para PGAs de *E. coli* e *B. megaterium*, respectivamente, a 37 °C e pH 8,7. Estimativa de K_m para PGA de *B. megaterium* forneceu valor de 1,83 mM a 37°C e pH 8,0 (Souza, 2004). A constante de Michaelis-Menten é uma medida da afinidade da enzima pelo substrato, ou seja, quanto menor o valor de K_m maior a afinidade da enzima pelo substrato. O valor aqui estimado para PGA de *Bacillus megaterium*, 1,505 mM, pode ser considerado razoavelmente próximo do reportado na literatura pois é uma grandeza obtida por ajuste e os valores são da mesma ordem de grandeza.

4.7.3. Energia de Ativação (E_a)

Sabe-se que:

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

No tópico anterior foi obtido valor de K_m igual a 1,505 mM. Como a $MM_{penG}=372,5$ g, tem-se que $K_m=0,56$ g/L.

Uma vez que o valor de S (concentraao de penicilina G) utilizada nas medidas de atividade enzimática é igual a 40,0 g/L, ou seja, aproximadamente 10 vezes o valor de K_m , pode-se considerar que $V \approx V_{m\acute{a}x}$.

Assim, com os valores de velocidade da reaao no trecho ascendente linear, obtidos nas temperaturas de 25-65C, construiu-se o gráfico de Arrhenius, para a estimativa da energia de ativaao da PGA como mostrado na Figura 4.14.

Os valores da regressão linear (Origin 6.0) obtidos através do gráfico de $\ln(V_{m\acute{a}x})$ por $1/T$ (K) estão na Tabela 4.28. O valor da constante dos gases utilizado foi 8,314 KJ/mol.K.

Tabela 4.28 - Valores da regressão linear para estimativa da energia de ativaao, reta $Y=A+BX$

Parâmetro	Valores	Erros
A	15,369	$\pm 0,881$
B	-3262,546	$\pm 271,511$

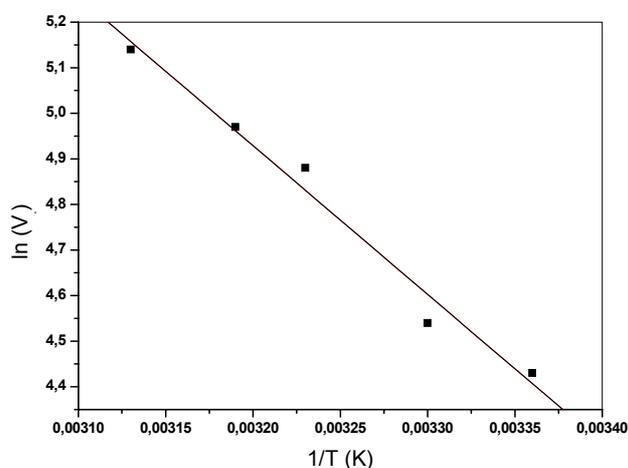


Figura 4.15 - Gráfico de Arrhenius – Efeito da temperatura na velocidade de reaao

$$\text{Como: } B = -\frac{E_a}{R}$$

$$E_a = 27,12 \text{ KJ/mol}$$

A energia de ativação é a energia necessária para levar todas as moléculas de um mol de uma substância até o estado reativo (estado de transição).

O valor estimado para PGA de *Bacillus megaterium* foi 27,12 kJ/mol, valor este que confere em magnitude com os obtidos por Kazan *et al.*, 1997, para enzima solúvel de *E. coli*, 30,24 kJ/mol. Nam, 1979, ao estudar as propriedades da PGA de *Micrococcus luteus*, encontrou energia de ativação desta enzima igual a 33,6 kJ/mol.

4.7.4. Estabilidades Térmica e Alcalina

A estabilidade térmica foi investigada incubando-se o caldo de fermentação em temperatura de 60°C. Em tempos determinados, alíquotas foram retiradas e resfriadas a 25°C para acompanhamento do decaimento da atividade até total inativação pela temperatura. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.29 e Figura 4.16.

Quanto à estabilidade em pH alcalino, alíquotas do caldo de fermentação contendo a enzima, foram expostas a pH 11,0, adicionando-se NaOH 5,0M. Em tempos determinados eram retiradas amostras para determinar o decaimento da atividade da enzima. Na Tabela 4.30 e Figura 4.17 os resultados podem ser acompanhados.

Tabela 4.29 - Acompanhamento da atividade enzimática de PGA após diferentes períodos de incubação a 60°C

Tempo (min)	Atividade Enzimática \pm 22 (UI/L)
0	395
1	385
3	372
5	286
7,5	234
10	200
15	84
30	9
45	0
60	0

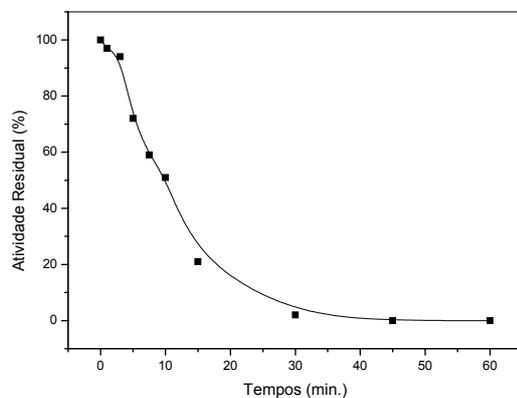


Figura 4.16 - Acompanhamento da atividade enzimática de PGA após diferentes períodos de incubação a 60°C

Tabela 4.30 - Acompanhamento da atividade enzimática de PGA em ensaios de estabilidade alcalina a pH 11,0

Tempo (min)	Atividade Enzimática \pm 22 (UI/L)
0	395
1	190
5	124
10	106
20	55
30	46
45	42
60	38
90	0

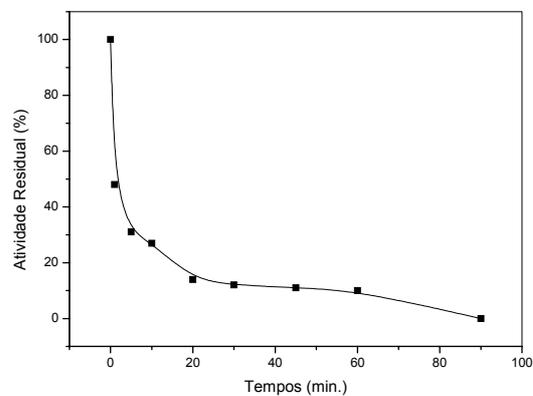


Figura 4.17 - Acompanhamento da atividade enzimática de PGA após diferentes períodos de incubação a pH 11,0

A meia vida da enzima a 60°C é de 10 minutos, com inativação completa após 45 minutos de exposição a esta temperatura.

Observa-se também que a PGA chega a completa inativação após 90 minutos de incubação a pH 11,0, com tempo de meia vida de 1 minuto, indicando a grande influência deste parâmetro na performance da enzima.

5 CONCLUSÕES

- No ensaio de produção de PGA por linhagem de *X. campestris* doada pela “Coleção de Culturas Tropicais (CCT)”, realizado em câmara rotativa a 300 rpm e 30°C, o crescimento celular foi pequeno e só ocorreu em 36 horas de cultivo. Medidas de atividade enzimática diretamente no caldo de cultivo e após lise celular, para averiguação de produção extra e intracelular, respectivamente, não acusaram produção da enzima. Foram realizadas tentativas de adaptação da nova linhagem de *X. campestris*, mas ensaios posteriores apresentaram resultados semelhantes ao primeiro, com pequeno crescimento celular e nenhuma produção de PGA.

- Uma linhagem de *X. campestris* proveniente do “Laboratório de Bacteriologia/ Virologia do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR)” foi utilizada em um ensaio em que se observou um crescimento celular mais acentuado, comparando-se com o ensaio com o microrganismo proveniente da CCT, atingindo o máximo de 1,89 g/L em 24 horas de cultivo. Contudo, medidas de atividade enzimática intra e extracelular mostraram não haver produção de PGA.

- Como os ensaios com linhagens de *X. campestris* de procedências conhecidas apresentaram resultados inexpressivos na produção da enzima, optou-se por realizar um trabalho em paralelo com o microrganismo reativado, identificado como uma linhagem de *Bacillus megaterium*, pela Fundação André Tosello.

- O tempo que o microrganismo leva para atingir crescimento celular considerável na etapa do inóculo é de 24 horas.

- A velocidade específica máxima de crescimento do microrganismo (μ_{\max}) é 0,33 h⁻¹

- A padronização do volume de inóculo, ou seja, a concentração celular, utilizada no início da fase de produção da enzima, confirmou que a metodologia que vem sendo utilizada, adição de 5 mL de inóculo (10% do volume total do meio de produção) obtido após 24 horas de cultivo, é uma estratégia eficiente.

- Experimentos realizados em câmara rotativa a 300 rpm e 30°C, mostraram que o pH inicial ótimo para a produção de PGA por *Bacillus megaterium* é 8,0 para o meio de crescimento e 7,0 para o meio de produção, condição esta que apresentou maior valor de atividade enzimática (624 UI/L).

- Os resultados mostram que 30°C é a temperatura ótima para o crescimento do microrganismo e para máxima produção de enzimas atingindo 355 UI/L na presença de 4,50 g/L de células.
- No estudo das composições de meios de produção, o meio composto por aminoácidos consumidos preferencialmente pelo microrganismo 20 g/L, fenilacetato de potássio 3,5 g/L, solução com diferentes sais 0,22 g/L, e soro de queijo 20,0 g/L mostrou ser o mais eficiente na produção da PGA, atingindo máxima concentração celular e atividade enzimática, 4,59 g/L e 592 UI/L, respectivamente, em 36 horas de cultivo, com pHs para os meios de crescimento e produção iguais a 8,0 e 7,0, respectivamente, e temperatura controlada em 30°C.
- Ensaio em biorreator para estudo da influência da concentração de oxigênio dissolvido mostraram que a condição de 10% de saturação no meio é a mais favorável na produção de PGA por *Bacillus megaterium*.
- A adição de pulsos contendo nutrientes mostrou-se favorável nos ensaios em biorreator, pois os níveis de atividades enzimáticas sofriam uma elevação após a adição destes.
- Análises de atividade proteolítica foram realizadas em caldos de fermentação de *X. campestris* e *B. megaterium*, utilizando-se a técnica do pHstato, o qual não detectou a presença de proteases.
- Em todos os ensaios com *B. megaterium*, tanto em câmara rotativa quanto em biorreator, observou-se uma tendência dos pHs à valores alcalinos no decorrer dos cultivos que pode ser explicada pela excreção de amônia, resultante da degradação oxidativa dos aminoácidos durante o metabolismo celular.
- A caracterização da PGA de *B. megaterium* nos permitiu identificar os valores ótimos para pH e temperatura, respectivamente, 8,0 e 47°C.
- O valor da energia de ativação estimado para PGA de *B. megaterium* foi 27,12KJ/mol.
- O valor para $V_{\text{máx}}$ encontrado foi $1,1 \cdot 10^{-3}$ mmol/min*UI e K_m igual a 1,51 mM
- Quanto às estabilidades térmica e alcalina, nota-se que a meia vida da enzima a 60°C é de 10 minutos, com inativação completa após 45 minutos de

exposição. Quanto à estabilidade alcalina, verificou-se a completa desnaturação de PGA após 90 minutos de incubação a pH 11,0, com tempo de meia vida de 1 minuto.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALASINGHAM, K.; WARBURTON, D.; DUNNIL, P.; LILLY, D. The Isolation and Kinetics of Penicillin Amidase from *Escherichia Coli*. *Biochimica ET Biophysica Acta*, p. 250-256, 1972.
- BARENDT, T.R.M., POLDERMAN-TIJMES, J.J., JEKEL, P.A., HENSGENS, C.M.H., VRIES, E.J., JANSSEN, D.B., DIJKSTRA, B.W. The sequence and crystal structure of the α - amino acid ester hydrolase from *Xanthomonas citri* define a new family of β -lactam antibiotic acylases. *Journal of Biological Chemistry*, 278: 23076-23084, 2003.
- BARENDT, T.R.M., YOSHIDA, H., DIJKSTRA, B.W. Three-dimensional structures of enzymes useful for β -lactam antibiotic production. *Current opinion in Biotechnology*, 15: 356-363, 2004.
- BARRERAS, M.; ABDIAN, P. L.; IELPI, L. Functional Characterization of GumK, a Membrane Associated Beta-Glucuronosyltransferase from *Xanthomonas campestris* required for Xanthan Polysaccharide Synthesis. *Glycobiology*, vol. 14, p. 233-241, 2004.
- BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2 ed, New York, McGraw Hill, 1986.
- BERAZAÍN, J. G.H. Q. Estudo sobre a Utilização de Soro de Queijo na Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Dissertação de Mestrado*. São Carlos, UFSCar, 1997.
- BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology, 8 ed., USA, 1974.
- BLINKOVSKY, A.M, MARKARYAN, A.N. Synthesis of β -lactam antibiotics containing α -aminophenylacetyl group in the acyl moiety catalysed by D-(-)-phenylglycyl- β -lactamide amidohydrolase. *Enz. Microb. Technol.*, 15:965-973, 1993.
- BRADBURY, J.F. *Xanthomonas*. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 1 (Ed. by Krieg, N.R.; Holt, J.G.). Williams & Wilkins, Baltimore, USA. 148-189, 1984.
- BRUGGINK, A.; ROOS, E.C.; VROOM, E. Penicillin Acylase in the Industrial Production of β -Lactam Antibiotics. *Organic Process Research & Development*, vol. 2, n°2, p. 128-133, 1998.
- BUCHHOLZ, K., KASCHE, V., BORNSCHEUER, U.T. Biocatalysts and Enzyme Technology. Weinheim: Wiley-VCH, Cap.1.p.1-26, 2005.

- BURTSCHER, H., GÜNTER, S. Reconstitution *in vivo* of penicillin G acylase activity from separately expressed subunits. *European Journal of Biochemistry* 205:77-83, 1992.
- GANG, C.; ZHU, S.; YANG S.; ZHAO G.; JIANG W. Cloning Overexpression , and Characterization of a Novel Thermostable Penicillin G Acylase from *Achromobacter xylosoxidans*: Probing the Molecular Basis for Its High Thermostability. *Applied and Enviromental Microbiology*, 2764-2770, 2004.
- CALLERI, E.; TEMPORINI, C.; MASSOLINI, G.; CACCIALANZA, G. Penicillin G acylase-based stationary phases: analytical applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 35 p. 243–258, 2004.
- COLE, M. *Drugs of the Future*, vol. 6, p. 697-727, 1981.
- DE LEON, A.; B. GARCIA, A. P. BARBA DE LA ROSA; F. VILLASENÖR, A. ESTRADA, R. LOPEZ-REVILLA. Periplasmic penicillin G acylase activity in recombinant *Escherichia coli* cells permeabilized with organic solvents. *Process Biochemistry* 39, 301-305, 2003.
- DEAK, P. M.; LUTZ-WAHL, S.; BOTHE, H.; FISCHER, L. Bioreactor cultivation of *Escherichia coli* for production of recombinant penicillin G amidase from *Alcaligenes faecalis*. *Biochemistry Letters*; 25, 397-400, 2003.
- ESGALHADO, M.E., ROSEIRO, J.C., COLLAÇO, M.T.A. Kinetics of toxicity in cultures of *Xanthomonas campestris*. *Food Microbiology*,13: 441-446, 1996.
- FLORES, G.; XAVIER, S.; OSUNA, J. Production of a fully funciotnal, permuted single-chain penicillin G acylase. *Protein Science*, 13:1677-1683, 2004
- FURIGO JUNIOR, A. Apostila: Enzimas e suas aplicações – Cinética Enzimática. Universidade de Santa Catarina, 2001.
- GARCÍA-OCHOA., F., SANTOS, V.E., CASA, J.A., GÓMEZ, E. Xanthan gum: Production, Recovery, and Properties. *Biotechnology Advances*, 18: 549-579, 2000.
- GOTTWALD, R. T., GRAHAM, J. H. In: Compendium of citrus diseases. (Eds. Timmer, L. W., Garnsey, S. M. & Graham, J. H.). *Am. Phytopatology Society Saint Paul*. p.5-7, 2000.
- HOJO, O.; Estudo sobre a Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Tese*, São Carlos, UFScar, 1997.
- HONG, H. A.; DUC, L. H.; CUTTING, S.M. The Use of Bacterial Spore Formers as Probiotics. *Microbiology Reviews*, vol. 29, p. 813 – 835, 2004.
- ILLANES, A.; ACEVEDO, F.; GENTINA, J. C.; REYES, I.; TORRES, R.; CARTAGENA, O; RUIZ, M.; Production of Penicillim G Acylase from *Bacillus*

- megaterium* in Complex and Defined Media. *Process Biochemistry*, vol. 29, p. 263-270, 1994.
- JOSÉ, L.; MARTINEZ, L.; ILIYNÁ, A.; MALFAVON, L. D.; SÁNCHEZ, O.; DUSTET C.; Partial Characterization of Penicillin Acylase From Fungi *Aspergillus Fumigatus* and *Mucor Gryseocianum*, 2003.
- KAZAN, D., ERTAN, H., ERARSLAN, A. Stabilization of *Escherichia coli* Penicillin G Acylase Against Thermal Inactivation by Cross-linking with Dextran Dialdehyde Polymers . *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 48, p. 191 – 197, 1997.
- LEHNINGER, A.L., *Princípios de Bioquímica*. São Paulo, Sarvier, p. 127-194, 2000.
- LEÓN, A. D.; HERNÁNDEZ, V.; GALINDO, E.; RAMÍREZ, O.T. Effects of Dissolved Oxygen Tension on the Production of Recombinant Penicillin Acylase in *Escherichia coli*. *Enzyme Microbial Technology*, vol. 33, p. 689 – 697, 2003.
- LIGON, B.L. Penicillin: Its Discovery and Early Development. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, vol. 15, n°1, p. 52-57, 2004.
- LIN, Y.H; H.-C HSIAO e C. P. CHOU. Strain Improvement to Enhance the Production of Recombinant Penicillin Acylase in High-Cell-Density *Escherichia coli* cultures. *Enzyme Microbial Technology*, 2002.
- LO, Y.M., YANG, S.T., MIN, D.B. Effects of yeast extract and glucose on xanthan production and cell growth in batch culture of *Xanthomonas campestris*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47: 689-694, 1997.
- MARTÍN, L.; PRIETO, M. A.; CORTÉS, E.; GARCÍA, J. L. Cloning and Sequencing of the pac Gene Encoding the Penicillin G Acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *FEMS Microbiology Letters*, v. 125, p. 287-292, 1995.
- MEINHARDT, L.W., RIBEIRO, M.P.M.A., COLETTA, H.D., DUMENYO, C.K., TSAI, S.M., BELLATO, C.D. Genotypic analysis of *Xylella fastidiosa* isolates from different hosts using sequences homologous to the *Xanthomonas rpf* genes. *Molecular Plant Pathology*, vol. 4 n°5, p. 327-335, 2003.
- MENEZES, J.C., ALVES, T.P., CARDOSO, J.P. Biotecnologia Microbiana: A Produção de Penicilina. *Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações*, cap.12, 2000.
- MOO-YOUNG, M.; CHISTI, Y.; Biochemical Engineering in Biotechnology. *Pure & Applied Chemistry*. vol. 66, n° 1, p. 117-136, 1994
- MOOTER, V.D, SWINGS, M. Numerical Analysis of 295 Phenotypic features of 266 *Xanthomonas* strains and aim proved taxonomy of the genus. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 40: 348-369, 1990.

- NAN, D. H., RYU, D. D. Y. Biochemical Properties of Penicillin Amidohydrolase from *Micrococcus luteus*. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 38, p. 35 – 38, 1979.
- NEKOLNY, D., CHALOUPKA, J. Protein Catabolism in Growing *Bacillus megaterium* During Adaptation to Salt Stress. *FEMS Microbioly Letters*, vol. 184, p. 173 – 177, 2000.
- NICHOLSON, W.L. Roles of *Bacillus* endospores in the Environment . *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 59, p. 410 – 416, 2002.
- NUCCI, E. R.; Aplicação da Lógica Fuzzy na Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Dissertação de Mestrado*, São Carlos, UFSCar, 2003
- PARMAR, A., KUMAR, S.S.; MARWAHA, J.F.; KENNEDY. Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA), *Biotechnology Advances*, vol. 18, p. 289–301. 2000.
- PELKZAR, J. R.; CHAN, E.; KRIEG, N. R. Microbiology, 5 ed, Mc Graw-Hill, New York, 1986.
- PINOTTI, L. M.; Estudo da Produção, Purificação e Imobilização de Penicilina G Acilase de *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Dissertação de Mestrado*, São Carlos, 1999.
- PINOTTI, L. M.; Produção e Purificação de Penicilina G Acilase. *Tese*, São Carlos, 2003.
- PINOTTI, L. M.; SOUZA, V. R.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO R. L. C. The Penicillin G Acylase Production by *Bacillus megaterium* is Amino Acid Consumption Dependent. *Biotechnology and Bioengineering*, no prelo.
- OSPINA, S. S. Characterization and Use of a Penicillin Acylase Biocatalyst. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 205-214, 1992.
- RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Recent Biotechnological Interventions for Developing Improved Penicillin G Acylases. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 97, nº. 1, p. 1–13, 2004.
- RAWLINGS, N.D., MORTON, F.R., BARRETT, A.J. MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Res* 34, D270-D272. 2006.
- SANTOS, V.E. Producción de xantano. PhD thesis. Madrid, Spain, Universidad Complutense, 1993.
- SAVIDGE, T. A.; COLE, M.; Penicillin Acylase (bacterial). *Methods im Enzymology*, vol. 43, p. 705-721, 1975.

- SAVIDGE, T.A. Enzymatic Conversions used in the Production of Penicillins and Cephalosporins. *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, Ed. Marcel Dekker, 1984.
- SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. *Biotecnologia Industrial*, vol. 1 – Fundamentos, Ed. Edgard Blucher Ltda, Brasil, 2001.
- SHEWALE, J.G.; SIVARAMAN, H. Penicillin Acylase: Enzyme Production and its Application in the Manufacture of 6-APA. *Proc. Biochem.*, p. 146-154, 1989.
- SHULER, M.L., KARGI, F. *Bioprocess Engineering – Basic Concepts*. New Jersey, USA, Prentice Hall, 479p, 1992.
- SILVA, R. G. Técnicas de Inferência de Estado Aplicadas ao Processo de Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Tese*, São Carlos, UFSCar, 2003.
- SINCHAILKUL, S.; SOOKKHEO, B.; TOPANURUKU, S.; JUAN, H. F.; PHUTRAKUL, S.; CHEN, S. T. Bioinformatics, Functional Genomics, and Proteomics Study of *Bacillus sp.* *Journal of Chromatography B*, vol. 771, p. 261 – 287, 2002.
- SOUZA, V. R. Requerimentos Nutricionais na Produção de Penicilina G Acilase por *B. megaterium* ATCC 14945. *Dissertação de Mestrado*, São Carlos, UFSCar, 2003.
- SOUZA, V.S., SILVA, A.C.G., GIORDANO, R.L.C. Caracterização de Penicilina G Acilase – Solúvel e Imobilizada – Produzida por *B. megaterium* ATCC 14945. XV Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2004.
- SOUZA, V. R.; SILVA, A. C. G.; PINOTTI, L. M.; ARAÚJO, H. S. S.; GIORDANO, R. L. C. Characterization of the Penicillin G Acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 48, p. 105-111, 2005.
- VANDAMME, E. J.; VOETS, J. P. *Advanced. Applied. Microbiology*, 1974.
- VANDAMME, E. J. *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, vol. 3, p. 45-140; New York, 1984.
- VALESOVÁ, R.; HOLLEROVÁ-SOBOTKOVA, L.; STEPANEK, V., KYSLIK, P. Optimization of the host-plasmid interaction in the recombinant *Escherichia coli* strains overproducing penicillin G acylase. *Enzyme and Microbial Technology*, 35:74-80, 2004.
- VARY, P. S. Prime Time for *Bacillus megaterium*. *Microbiology*. 140: 1001-1013, 1994.

VAUTERIN, L., HOSTE, B., KERSTER, K., SWINGS. Reclassification of *Xanthomonas*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 45: 472-489, 1995.

VISNARDI, C.; Estudo de Alguns Aspectos do Processo de Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Dissertação de Mestrado*, São Carlos, UFSCar, 1997.

VOET, J. G. *Biochemistry*, 2 ed, New York, 1995.

VOJTISEK, V.; SLEZÁK, J. Penicillinamidohydrolase in *Escherichia coli* – Synthesis of the Enzyme, Kinetics and Specificity of Its induction and the Effect of O₂. *Folia Microbiol.*, vol. 20, p. 289 -297, 1975.

VOTRUBA, J., PAZLAROVÁ, J., DVORAKOVÁ, M., VANATALU, K., VÁCHOVA, L., STRNADOVÁ, M., KUCEROVÁ, H., CHALOUPKA, J. External Factors Involved in the Regulation of an Extracellular Proteinase Synthesis in *Bacillus megaterium* – The Effect of Glucose and Amino Acids. *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 26, p. 373 – 377, 1987.

YANG, S.; HUANG, H.; ZHANG, R.A., HUANG, X.D.; LI, S.Y.; YUAN Z.Y. Expression and purification of extracellular penicillin G acylase in *Bacillus subtilis*. *Protein Expres. Purif.*, v.21, n1, p.60-64, 2001.

- Cinética enzimática: <http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/scriptFrame.html>

- Novozymes: <http://www.novozymes.com.br>

ANEXO I



Coleção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Ladino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

Relatório Técnico

Análise Microbiológica

(OS 060071)

Apresentado a: Universidade Federal de São Carlos
(UFSCar) – Departamento de Engenharia
Química.

Apresentado por: Coleção de Culturas Tropical
Fundação André Tosello

Dezembro 2006



Coletção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301 Pq. Taquaral
CEP 13087-010 Campinas SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

Relatório Técnico

Serviço: Identificação de microrganismos

Relatório: 060071rf

Interessado: Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Data de Recebimento: 10/10/2006

Serviço No.	Descrição do Serviço/Amostra
060071-1	Suspeita de <i>Bacillus megaterium</i> (meio de cultivo – Extrato de carne peptona).

1. Objetivos:

Identificação de microrganismo por taxonomia convencional.

2. Metodologia utilizada:

• Identificação de bactéria por Taxonomia clássica convencional.

Avaliação de características fisiológicas e metabolismo bioquímico pela taxonomia clássica convencional, associada a sistema de testes rápidos de identificação.

A identificação é baseada na análise comparativa de características diferenciais de morfologia, fisiologia e metabolismo bioquímico da linhagem teste com dados das espécies de referência descritas na literatura.

3. Resultados:

Serviço No.	Amostra	Resultados
060071-1	Suspeita de <i>Bacillus megaterium</i> (meio de cultivo – Extrato de carne peptona).	<i>Bacillus megaterium</i> de Bary 1884 ^{AL}

4. Bibliografia:

HARWOOD, C.R. , *Biotechnology Handbooks. Bacillus*. Edited by Colin R. Harwood, 1989. Vol.2.

Gordon, R.E.; Haynes, W.C. and Pang, C.Hor-Nay. *The Genus Bacillus*. Agriculture Handbook Nº 427. Washington, D.C.: U.S. Department of Agriculture, 1973.

Holt J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.³, Stanley J.T., Williams, S.T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. The Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

Sneath, P.H.A. Endospore-forming Gram positive rods and cocci. *In*: Sneath P.H.³; Mair, N.S.; Sharpe, M.E. and Holt, J.G. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1986. Vol.2, section 13: 1104-1138.



Coletção de Culturas Tropical
www.cct.org.br

Fundação André Tosello
www.fat.org.br
R. Latino Coelho, 1301, Rq. Taquaral
CEP 13087-010, Campinas, SP
Fone/Fax: (19) 3242-7022
Fax: (19) 3242-7827
CNPJ 46.126.322/0001-82

FICHA DE IDENTIFICAÇÃO

No. SERVIÇO: 060071-1

1. Caracterização Morfológica

Cultivo em meio Ágar Nutriente a 30°C por 24 horas.

As colônias apresentaram coloração creme, forma circular elevada, margem levemente ondulada, superfície levemente rugosa, presença de brilho, textura cremosa e presença de odor.

As células apresentaram-se em forma de bastonete, Gram positivos, esporulados, com células isoladas e em pares, com algumas cadeias curtas. Foram observados esporos elipsoidais, subterminais e esporângio não distendido.

2. Caracterização Fenotípica

São bastonetes Gram positivos, esporulados, móveis, aeróbicos.

Resultados positivos:

Catalase, desaminação da fenilalanina, redução de nitrato, decomposição de caseína, assimilação do citrato, hidrólise da esculina, hidrólise de amido, crescimento em pH5,7, crescimento em diferentes concentrações de NaCl. Utilização de carboidratos com formação de ácidos a partir de: glicose, galactose, xilose, rafinose, arabinose, sacarose, N-acetil-D-glicosamina, manitol, maltose, trealose. Teste de fermentação de glicose em caldo na presença de inibidor seletivo: ácido mandélico, tiocianato de potássio.

Resultados negativos:

Oxidase, crescimento a 50°C, descarboxilação da lisina, produção de acetoina, fermentação de glicose em presença de 7% de NaCl, urease, redução do composto 2,3,5 - clorato de trifeniltetrazólio, decomposição de tirosina. Utilização de carboidratos com formação de ácidos a partir de: inositol, tagatose, palatinose, arabitól, inulina, salicina, sorbitol, amilopectina, ribose, amígdalina. Teste de fermentação de glicose em caldo na presença de inibidor seletivo: clindamicina, acetato de sódio, poliamidociprofloxacina, ácido nalidíxico.

3. Resultado da Identificação

A cultura 060071-1 foi identificada como *Bacillus megaterium* da Bary 1884^{ATCC}.