

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

**DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES OPERACIONAIS**  
**NA PRODUÇÃO DE PENICILINA G ACILASE POR *Bacillus megaterium***

Vanessa Ribeiro de Souza

São Carlos – SP

2007

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

**DIFERENTES MEIOS DE CULTIVO E CONDIÇÕES OPERACIONAIS  
NA PRODUÇÃO DE PENICILINA G ACILASE POR *Bacillus megaterium***

Vanessa Ribeiro de Souza

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

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

São Carlos – SP  
2007

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

S729dm

Souza, Vanessa Ribeiro de.

Diferentes meios de cultivo e condições operacionais na produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium* / Vanessa Ribeiro de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2007. 249 p.

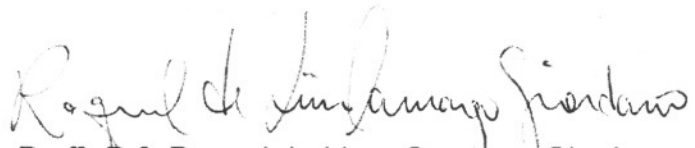
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Enzimas. 2. Penicilina G acilase. 3. *Bacillus megaterium*. 4. Aminoácidos. 5. Soro de queijo. 6. Oxigênio dissolvido. I. Título.

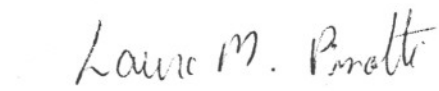
CDD: 660.634 (20<sup>a</sup>)

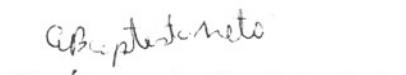
MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE  
**VANESSA RIBEIRO DE SOUZA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-  
GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SÃO CARLOS EM 16 DE AGOSTO DE 2007.

BANCA EXAMINADORA:

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

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Rodrigues  
**FEA/UNICAMP**

  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Laura Maria Pinotti  
**UNIVASF**

  
Dr. Álvaro de Baptista Neto  
**DEQ/UFSCar**

  
Prof. Dr. Roberto de Campos Camargo  
**PPG-EQ/UFSCar**

*Porque eu, o Senhor teu Deus, te seguro pela tua  
mão direita, e te digo: Não temas; eu te ajudarei.*

**Isaías 41:13**

*A meus pais, Edison e Vera, e Fabrício, meu  
irmão... pelo incentivo, compreensão e muito  
amor. Obrigada por mesmo de longe estarem  
sempre presentes  
É por vocês e pra vocês.*

## *Agradecimentos*

---

---

Meu primeiro agradecimento, a Prof<sup>a</sup> Raquel de Lima Camargo Giordano, é na verdade um reconhecimento pelo salto qualitativo de minha vida acadêmica. Quero registrar minha admiração por tamanha competência, e gratidão, não apenas pela orientação nesse trabalho, mas também pela amizade, apoio e formação pessoal.

Agradeço ao Prof<sup>o</sup> Roberto Giordano pelos esclarecimentos, desafios e sugestões que contribuíram para o enriquecimento dessa tese. Ao Prof<sup>o</sup> Antônio José Cruz pelo suporte e colaboração nos ensaios em biorreator.

Sou grata pela oportunidade de ter trabalhado com pessoas tão agradáveis, Rosineide, Edson e Renata. Foi bem mais fácil e prazeroso realizar esse trabalho junto com vocês.

Um agradecimento especial ao Wellington, meu namorado, que me emprestou ouvidos, colo e braços quando eu precisava desabafar e abraçar. Obrigada por sua atenção, carinho e compreensão.

Obrigada a Juliana e Kamilla, amigas de momentos felizes, tristes, engraçados, econômicos, frustrantes, desastrosos...enfim...Amigas!

Agradeço aos meus, inicialmente parceiros de laboratório, e que por conta da convivência e das afinidades hoje são grandes amigos, Gilson, Geísa e Álvaro. E mais: Adriano, Adilson, Carolina, Clóvis, Dasciana, Fabiana, Fábio, Marcelo, Mônica, Pedro, Rebeca, Sheila, Sidnei, Thiago, Wellington. Valeu galera!

Aos que já passaram, mas continuam presentes nos artigos, equipamentos, reagentes, ou simplesmente como lembranças agradáveis: Laura, Paulo Waldir, Célia, Charles, Andréa, Any, Carol Graciano, Dany. Ariane, Julia.

Meus sinceros agradecimentos ao técnico Amadeus, pela imensa colaboração nas análises cromatográficas que enriqueceram esse trabalho.

A toda família... gigante!!! avó, cunhada, tios e primos, que apoiaram, oraram, incentivaram, se interessaram e torceram para que eu realizasse esse objetivo. Divido com vocês essa conquista!

As agências financiadoras desse projeto, CNPq e FAPESP.

---

---

*Resumo*

---

---

Penicilina G acilase (PGA) é uma importante enzima industrial usada para produção do ácido 6-aminopenicilânico, intermediário chave na produção de ampicilina e outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos semi-sintéticos. A produção dessa enzima por *Bacillus megaterium* vem sendo estudada no grupo há muitos anos. Esta tese dá continuidade a esse estudo visando não só aumento da produção da enzima, mas também um melhor entendimento dos mecanismos regulatórios da expressão de PGA por *B. megaterium*. Neste trabalho foi realizado um estudo sistemático do inóculo, incluindo estratégias para conservação do microrganismo. Foram investigados diferentes meios de cultura e condições operacionais de cultivo na produção de PGA, em especial temperatura e concentração de oxigênio dissolvido. A recuperação da enzima foi também estudada, incluindo metodologias para minimização do conteúdo de proteínas presentes no soro de queijo, um nutriente importante na produção da enzima, mas cujo uso implica também a presença de proteínas contaminantes no meio de cultivo. Finalmente, a enzima foi caracterizada cineticamente.

No estudo do inóculo foram comparados, ao longo do tempo, os desempenhos na produção de PGA de microrganismos conservados como endósporos em glicerol 20% v/v, a  $-70^{\circ}\text{C}$  (criotubos), como endósporos conservados em meio sólido a  $4^{\circ}\text{C}$  (“slants”) e como células vegetativas em glicerol 8% v/v, a  $-70^{\circ}\text{C}$  (“eppendorfs”). Verificou-se que sob a forma de esporos congelados (criotubos) há preservação dos níveis de produção da enzima até 12 meses,  $521 \text{ UI/L} \pm 20 \text{ UI/L}$ , com grande reprodutibilidade. Conservação como “slants” além de mostrar variabilidade ao longo dos meses, apresenta queda acentuada desde o primeiro mês de conservação. Congelamento de células vegetativas conduz a níveis mais altos de produção da enzima,  $900 \text{ UI/L}$ , mas preserva atividade apenas durante cinco meses. Velocidades específicas máximas de crescimento dos microrganismos variaram com a forma de conservação, com  $\mu_{\text{máx}}$  “eppendorf” > “criotubo” > “slant”. Estudo do efeito do tempo de crescimento do inóculo na produção da enzima mostrou que, para as três formas de conservação estudada, a colheita do microrganismo entre 8 e 12 horas de cultivo conduzia a produções de enzima e concentração do microrganismo similares após 24 horas de produção.

O procedimento de colheita após 12 horas de cultivo, com inoculação de 10% do volume de biorreator, mostrou-se, assim, um bom critério para padronização do inóculo.

Foi estudada a influência da temperatura no cultivo de *B. megaterium* para produção de PGA na faixa entre 25-40°C. Os resultados mostraram que a máxima concentração celular e a máxima produção da enzima ocorrem no cultivo a 30°C.

O efeito da concentração de oxigênio dissolvido na produção de PGA foi extensamente estudado, sendo o biorreator (volume de meio: 1,2-2,0 L) alimentado com ar. Uma segunda linhagem de *B. megaterium* mostrou crescimento mais lento que a original, requerendo 24 horas para a fase de germinação/propagação, enquanto que a original requer 12 horas. Foi, assim, efetuado estudo em biorreator com diferentes estratégias de fornecimento de oxigênio (ar) para as duas linhagens. Ao longo dos anos, a produção de enzima em frascos agitados vem se mostrando maior que a obtida em biorreator em quase todos os ensaios realizados. A segunda linhagem mostrou de forma clara que a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação conduzia à maior produção da enzima dentre todas as condições testadas, com produção em biorreator similar à obtida em frasco agitado, 450 UI/L. Entretanto, produção em biorreator similar à obtida em frasco agitado, 550-600UI/L, só foi obtida com a linhagem original usando-se um perfil crescente de agitação, que implicava concentração de oxigênio dissolvido muito baixa, permanecendo em zero por vários períodos ao longo do cultivo. As duas linhagens apresentaram, portanto, requerimentos diferenciados para o oxigênio dissolvido. Alterações no meio de cultivo também alteram o requerimento de oxigênio dissolvido para obtenção da máxima produção da enzima.

Soro de queijo possui um fator que ainda não foi possível identificar que é nutriente essencial para a produção da enzima. O uso de soro hidrolisado permite melhor recuperação da enzima. Ensaios em frascos agitados, com a linhagem original, na presença de soro hidrolisado, conduziram a níveis de PGA similares aos obtidos com soro integral. Contudo, em biorreator, para todas as condições de oxigênio dissolvido testadas a produção da enzima era inferior à obtida em frascos agitados, qualquer que fosse a estratégia de aeração usada. Foram investigadas três possíveis explicações para esse fato: 1) forma de preservação do microrganismo; 2) alteração no tempo para se atingir e/ou manter o estágio metabólico onde ocorre expressão da enzima, o que poderia estar relacionado com a proporção entre células vegetativas/espores ao longo do tempo em frascos agitados e biorreator; 3) aumento na produção de proteases no ensaio em biorreator em relação ao ensaio em frasco agitado. A menor produção com soro hidrolisado não parece estar relacionada com nenhuma dessas



hipóteses, não tendo sido possível, portanto, até o momento, generalizar o estudo do efeito dessa variável na produção de PGA por *B. megaterium*.

Foi efetuado estudo da concentração e purificação da enzima produzida na presença de soro integral e hidrolisado, através de ultra-diafiltração. Foi estudado o efeito do pH e do número de lavagens na recuperação da enzima. Resultados obtidos mostraram eficiência da técnica para concentração da enzima, se realizada a baixa temperatura. Mostraram também que soro hidrolisado realmente facilita a purificação da enzima através da filtração em membrana, permitindo remoção de grande parte das proteínas contaminantes introduzidas no meio com o soro de queijo. Contudo, ocorre expressiva perda de PGA durante as etapas de diafiltração, que devem ser minimizadas. O pH não influenciou na recuperação da enzima.

Caracterização cinética da enzima produzida para a hidrólise de penicilina G mostrou que a máxima atividade de PGA ocorre a pH 8 e temperatura de 37°C. Os valores estimados para os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten foram de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  de 0,0344 mM<sub>PenG</sub>/min e 1,83 mM, respectivamente, com energia de ativação de 27,12 KJ/mol.

---

---

*Abstract*

---

---

Penicillin G acylase (PGA) is an important enzyme for industry, used to produce aminopenicillanic acid, a key intermediate in the synthesis of ampicillin, among other beta-lactam antibiotics. The production of this enzyme by *Bacillus megaterium* has been studied by the research group for several years. This work advances this research, aiming not only at the enhancement of the enzyme production, but also at a better understanding of *B. megaterium* regulatory expression mechanisms for PGA. A systematic study of the inoculum, including conservation strategies for the microorganism, was performed. Different cultivation media and operational conditions for the production of PGA were investigated, especially temperature and dissolved oxygen concentration. Enzyme recovery was also studied, including methodologies for minimizing protein contents in whey. Cheese whey is an important nutrient for enzyme production, but its use implies the presence of contaminant proteins in the culture broth. Finally, the enzyme was kinetically characterized.

During the inoculum study, PGA yields of microorganisms conserved using different techniques were compared: endospores in 20%-glycerol, -50°C (cryotubes), endospores in solid medium, in refrigerator (“slants”) and vegetative cells in 5%-glycerol, -50°C (“eppendorffs”). It was observed that cryotubes (frozen spores) preserve the enzyme production levels for 12 months, 521 IU/L  $\pm$ 20 IU/L with great reproducibility. Conservation in “slants” shows a marked fall of production after one month, with a low reproducibility along months. Freezing vegetative cells leads to the highest patterns of enzyme production, up to 900 IU/L, but preservation is sustained for only five months. Maximum specific growth rates changed according to the conservation method, with  $\mu_{\max}$  “eppendorff” > “cryotube” > “slant”. A study of the effect of the inoculum growth period on enzyme yield has shown that, for the three conservation methods, harvesting between 8 and 12 h led to similar cell mass and enzyme concentrations after 24 h of cultivation. The procedure of harvesting the inoculum after 12 h, with 10%-bioreactor inoculum volume, showed to be a good method for inoculum standardization.

The effect of temperature on the cultivation of *B. megaterium* for production of PGA was assessed in the range 24-40°C. Maximum cell concentration and maximum enzyme yield were achieved at 30°C.

The effect of the concentration of dissolved oxygen on the production of PGA was studied, using air to feed the bioreactor (culture medium volume: 1.2-2.0 L). A second *B. megaterium* strain showed a lower growth rate than the original one, demanding 24 h for germination/propagation, while the original one requires 12 h. Thus, different oxygen (air) feeding strategies were tested for both strains. Along the years, enzyme yields in agitated flasks have been higher than in bioreactor, for almost all assays. For the second strain, sustaining the dissolved oxygen at 10% of saturation led to the highest enzyme productivity among all tested conditions, with a bioreactor productivity similar to the agitated flasks. For the original strain a similar production was only achieved with an increasing stirring profile, implying a very low dissolved oxygen concentration, equal to zero during long periods of the cultivation. The two strains presented different dissolved oxygen requirements. Changes in the cultivation medium also implied different dissolved oxygen requirements for a maximum enzyme yield.

Cheese whey has a still no-identified substance that is an essential nutrient for enzyme production. The use of enzymatically hydrolyzed cheese whey improves the downstream process. Assays in agitated flasks, with the original strain, using hydrolyzed whey, led to PGA levels similar to the ones obtained using integral whey. However, in bioreactor the yield of enzyme was always lower than in agitated flasks, no matter the aeration strategy that was used. Three possible explanations for this fact were investigated: 1) microorganism preservation method; 2) changes in the time necessary for attaining and sustaining the metabolic state where enzyme expression occurs, what could be related to the ratio between vegetative cells and spores along time, in flasks and in the bioreactor; 3) increase in the production of proteases in the bioreactor, compared to the flasks. The lower yield using hydrolyzed whey does not seem to be related to none of these hypotheses, and up to now it was not possible to generalize the study of the effect of this variable on the PGA production by *B. megaterium*.

Enzyme purification and concentration, via ultra-diafiltration, in the presence of integral and hydrolyzed whey was another subject for research. The effect of pH and of the number of washing cycles on enzyme recovery was assessed. Results showed that this technique is efficient, provided it is run at low temperatures. Hydrolyzed whey indeed eases the purification of the enzyme using membranes, and great part of the contaminant whey proteins

can be removed. However, an expressive loss of PGA occurs during the diafiltration stages, which must be minimized. pH did not influence enzyme recovery.

The kinetic characterization of the produced enzyme, using the hydrolysis of penicillin G as standard reaction, has showed that maximum PGA activity is at pH 8 and 37°C. Estimated Michelis-Menten parameters were  $V_{\max} = 0.0344 \text{ mM}_{\text{PenG}}/\text{min}$  and  $K_m = 1.83 \text{ mM}$ , with activation energy equal to 27.12 KJ/mol.

---



---

**Índice de Figuras**


---



---

<b>Figura 2.1:</b> Estrutura química do núcleo $\beta$ -lactâmico.....	<b>5</b>
<b>Figura 2.2:</b> Reação esquemática da hidrólise de penicilina G para obtenção de ácido fenil acético (AFA) e ácido 6-aminopenicilânico (6-APA).....	<b>7</b>
<b>Figura 2.3:</b> Estrutura química de antibióticos semi-sintéticos.....	<b>8</b>
<b>Figura 2.4:</b> Comparação de processo químico com processo enzimático na hidrólise da penicilina G mostrando as vantagens de sua utilização.....	<b>9</b>
<b>Figura 2.5:</b> Representação esquemática de esporulação em bactérias.....	<b>15</b>
<b>Figura 2.6:</b> Curva de crescimento típico para cultivo de células em batelada: (A) fase “lag”, (B) fase log, (C) fase estacionária e (D) fase de morte ou declínio celular.....	<b>24</b>
<b>Figura 2.7:</b> Efeito do pH na atividade relativa de uma enzima.....	<b>32</b>
<b>Figura 2.8:</b> Efeito da temperatura na atividade enzimática. (A) aumento da velocidade de reação pela temperatura e (B) inativação das moléculas de enzima	<b>34</b>
<b>Figura 2.9:</b> Efeito da concentração de substrato sobre a velocidade de uma reação catalisada por enzima.....	<b>35</b>
<b>Figura 2.10:</b> Representação esquemática da ação de uma enzima na energia de ativação de uma reação. $\Delta G$ e $E_a$ de (a) uma reação não enzimática; (b) uma reação enzimática.....	<b>38</b>
<b>Figura 3.1:</b> (A) Reator Applikon com capacidade para 2,0 L; (B) sistema de aquisição de dados.....	<b>40</b>
<b>Figura 3.2:</b> Ajuste linear dos coeficientes angulares em função do tempo de retenção médio para cada proteína padrão.....	<b>55</b>
<b>Figura 4.1:</b> Acompanhamento da concentração celular ( $C_x$ ) de <i>Bacillus megaterium</i> ao longo do tempo de armazenamento, obtida após 24 horas de cultivo partindo de microrganismos nas diferentes formas de conservação.....	<b>65</b>
<b>Figura 4.2:</b> Acompanhamento da atividade enzimática (AE) obtida após 24 horas de cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> ao longo do tempo de armazenamento do microrganismo nas diferentes formas de conservação.....	<b>66</b>

<b>Figura 4.3:</b> Concentração celular ( $C_x$ ) em função do tempo durante a fase de crescimento (germinação e/ou propagação), no cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> conservado de três diferentes formas: esporos/glicerol congelados em ultrafreezer (criotubo), células vegetativas/glicerol congeladas em ultrafreezer (ependorf) e esporos conservados em meio sólido (slant).....	<b>69</b>
<b>Figura 4.4:</b> Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo de <i>B. megaterium</i> em biorreator partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a $-70^{\circ}\text{C}$ : (A) concentração de extrato de levedura= 5,0 g/L e (B) concentração de extrato de levedura= 10,0 g/L.....	<b>92</b>
<b>Figura 4.5:</b> Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo de <i>B. megaterium</i> em biorreator inoculado com células armazenadas como esporos em glicerol 20% v/v a $-70^{\circ}\text{C}$ com 10,0 g/L de extrato de levedura.....	<b>94</b>
<b>Figura 4.6:</b> Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de $\text{CO}_2$ ( $Y_{\text{CO}_2}$ ), (B) pH, (C) concentração de oxigênio dissolvido e (D) velocidade de agitação.....	<b>95</b>
<b>Figura 4.7:</b> Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do tempo de cultivo de <i>B. megaterium</i> em biorreator com 10,0 g/L de extrato de levedura inoculado com células armazenadas a $-70^{\circ}\text{C}$ (criotubos) e adição de pulsos.....	<b>97</b>
<b>Figura 4.8:</b> Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de $\text{CO}_2$ ( $Y_{\text{CO}_2}$ ), (B) pH, (C) velocidade de agitação e (D) concentração de oxigênio dissolvido.....	<b>98</b>
<b>Figura 4.9:</b> Valores de concentração celular e atividade enzimática ao longo do cultivo de <i>B. megaterium</i> em biorreator utilizando sulfato de amônio e fenilacetato de potássio como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente, a 20% de oxigênio dissolvido e $30^{\circ}\text{C}$ .....	<b>103</b>
<b>Figura 4.10:</b> Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de $\text{CO}_2$ ( $Y_{\text{CO}_2}$ ), (B) pH, (C) velocidade de agitação e (D) Concentração de oxigênio dissolvido.....	<b>104</b>

<b>Figura 4.11:</b> Valores de concentração celular e atividade enzimática ao longo do cultivo de <i>B. megaterium</i> em biorreator utilizando sulfato de amônio e fenilacetato de potássio como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente, a 30°C e limitação de oxigênio dissolvido de 20 para 5% da saturação após 12 horas de cultivo.....	<b>106</b>
<b>Figura 4.12:</b> Valores de concentração celular ( $C_x = 5,48$ g/L), atividade enzimática (AE= 255 U/L), concentração de lactose ( $C_{\text{lactose}} = 14,0$ g/L), concentração de proteínas ( $C_{\text{proteínas}} = 3,07$ g/L), concentração de fenilacetato de potássio ( $C_{\text{indutor}} = 3,06$ g/L) e concentração de sulfato de amônio ( $C_{\text{sulfato}} = 8,16$ g/L) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em biorreator em batelada alimentada utilizando sulfato de amônio e fenilacetato de potássio e 20% de oxigênio dissolvido durante todo o cultivo.....	<b>108</b>
<b>Figura 4.13:</b> Influência da temperatura na concentração celular de <i>Bacillus megaterium</i> ( $C_x$ ) e produção de penicilina G acilase (AE) em frascos agitados com meio padrão.....	<b>124</b>
<b>Figura 4.14:</b> Comparação entre os ensaios em biorreator a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido e inoculados com esporos da nova linhagem de <i>B. megaterium</i> conservadas em meio sólido a 4°C – (A) Valores de atividade enzimática (AE) e (B) concentração celular ( $C_x$ ).....	<b>128</b>
<b>Figura 4.15:</b> Valores máximos de atividade específica nos ensaios com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em biorreator inoculados com células dormentes da nova linhagem de <i>Bacillus megaterium</i> conservadas em meio sólido a 4°C – slants.....	<b>131</b>
<b>Figura 4.16:</b> Comparação entre os ensaios em biorreator a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em meio de cultivo padrão, com soro de queijo integral e inoculados com a linhagem tradicional de <i>Bacillus megaterium</i> – (A) Valores de atividade enzimática (AE) e (B) Valores de concentração celular ( $C_x$ ).....	<b>135</b>
<b>Figura 4.17:</b> Valores máximos de atividade específica nos ensaios com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em biorreator com meio de cultivo padrão partindo da linhagem tradicional de <i>Bacillus megaterium</i> .....	<b>140</b>

<b>Figura 4.18:</b> Comparação entre os ensaios em biorreator a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em meio de cultivo com soro de queijo hidrolisado e inoculados com a linhagem tradicional de <i>Bacillus megaterium</i> – (A) Valores de atividade enzimática (AE) e (B) concentração celular ( $C_x$ ).....	<b>142</b>
<b>Figura 4.19:</b> Valores máximos de atividade específica nos ensaios com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em biorreator com meio de cultivo utilizando soro de queijo hidrolisado partindo de células vegetativas da linhagem tradicional de <i>B. megaterium</i> .....	<b>145</b>
<b>Figura 4.20:</b> Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em meio reformulado partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a $-70^\circ\text{C}$ , com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 – Ensaio 19.....	<b>148</b>
<b>Figura 4.21:</b> Consumo de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) durante o cultivo de <i>B. megaterium</i> partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 19: Meio reformulado e manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação em todo cultivo e pH inicial 8,0.....	<b>148</b>
<b>Figura 4.22:</b> Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de $\text{CO}_2$ – $Y_{\text{CO}_2}$ , (B) velocidade de agitação, (C) fração molar de $\text{O}_2$ – $Y_{\text{O}_2}$ , (D) Concentração de oxigênio dissolvido, (E) velocidade de formação de $\text{CO}_2$ – $n_{\text{CO}_2}$ , (F) velocidade de consumo de $\text{O}_2$ – $n_{\text{O}_2}$ e (G) coeficiente respiratório – RQ – Ensaio 19.....	<b>150</b>
<b>Figura 4.23:</b> Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em meio reformulado partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a $-70^\circ\text{C}$ , com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 – Ensaio 20.....	<b>152</b>
<b>Figura 4.24:</b> Consumo de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) durante o cultivo de <i>B. megaterium</i> partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 20: Meio reformulado e manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação em todo cultivo e pH inicial 8,0.....	<b>153</b>



<b>Figura 4.25:</b> Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de CO <sub>2</sub> –Y <sub>CO<sub>2</sub></sub> , (B) velocidade de agitação, (C) fração molar de O <sub>2</sub> –Y <sub>O<sub>2</sub></sub> , (D) Concentração de oxigênio dissolvido, (E) velocidade de formação de CO <sub>2</sub> –nCO <sub>2</sub> , (F) velocidade de consumo de O <sub>2</sub> – nO <sub>2</sub> e (G) coeficiente respiratório – RQ – Ensaio 20.....	<b>154</b>
<b>Figura 4.26:</b> Acompanhamento do consumo e/ou formação de metabólitos ao longo do tempo de cultivo de <i>B. megaterium</i> em biorreator. (A) metabólito-chave, (B) lactose, galactose e ácido lático e (C) demais metabólitos não identificados.....	<b>158</b>
<b>Figura 4.27:</b> Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, SDS-PAGE, com revelação em prata. Linha 1: marcadores de peso molecular; 2: caldo fermentativo ultrafiltrado, com soro hidrolisado ; 3: caldo fermentativo ultrafiltrado e dialisado uma vez, com soro hidrolisado 4: caldo fermentativo ultrafiltrado, dialisado duas vezes, com soro hidrolisado 5: caldo fermentativo ultrafiltrado, com soro integral; 6: caldo ultrafiltrado, dialisado uma vez, com soro integral 7: caldo fermentativo ultrafiltrado, dialisado duas vezes, com soro integral.....	<b>166</b>
<b>Figura 4.28:</b> Acompanhamento da atividade enzimática (AE) da PGA de <i>Bacillus megaterium</i> em função de diferentes temperaturas (A) e pHs (B).....	<b>167</b>
<b>Figura 4.29:</b> Acompanhamento da atividade enzimática da PGA de <i>Bacillus megaterium</i> ao longo do tempo de incubação (A) estabilidade térmica e (B) estabilidade a pH alcalino.....	<b>167</b>
<b>Figura 4.30:</b> Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten aos pontos experimentais de velocidades iniciais (V <sub>iniciais</sub> ) na hidrólise de penicilina G em função de diferentes concentrações de substrato (C <sub>PenG</sub> ).....	<b>168</b>
<b>Figura 4.31:</b> Gráfico de Arrhenius – Efeito da temperatura na velocidade de reação de hidrólise de penicilina G catalisada por PGA produzida por <i>B. megaterium</i> 1.....	<b>170</b>

---

---

**Índice de Tabelas**

---

---

<b>Tabela 2.1:</b> Estrutura química de diferentes cadeias laterais ligadas ao núcleo $\beta$ -lactâmico de diferentes penicilinas.....	<b>6</b>
<b>Tabela 2.2:</b> Propriedades cinéticas de PGAs produzidas por diferentes microrganismos.....	<b>37</b>
<b>Tabela 3.1:</b> Composição do meio sólido para preservação das linhagens de <i>Bacillus megaterium</i> .....	<b>41</b>
<b>Tabela 3.2:</b> Composição das soluções de aminoácidos totais e preferenciais.....	<b>43</b>
<b>Tabela 3.3:</b> Composição da solução salina utilizada nos meio de cultivo para produção de PGA.....	<b>44</b>
<b>Tabela 3.4:</b> Composição dos meios de crescimento para germinação de <i>Bacillus megaterium</i> .....	<b>44</b>
<b>Tabela 3.5</b> Padrões utilizados para a calibração da coluna Superdex Peptide 10/300 GL:100-7000 Da utilizada na distribuição de massas moleculares.....	<b>62</b>
<b>Tabela 4.1:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos após 24 horas de cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> nos ensaios padrão em cinco replicatas em frascos agitados partindo de diferentes criotubos escolhidos aleatoriamente dos Lotes I e II.....	<b>63</b>
<b>Tabela 4.2:</b> Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) após 24 horas de cultivo de <i>B. megaterium</i> , e máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) para microrganismo conservado sob diferentes formas, com inóculo colhido após 12 horas de germinação e/ou propagação.....	<b>69</b>
<b>Tabela 4.3:</b> Influência do tempo de crescimento do inóculo durante a fase de germinação e/ou crescimento do microrganismo, armazenado sob diferentes formas de conservação na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> . $C_x$ inóculo= concentração celular no meio de crescimento após diferentes tempos de incubação, $C_x$ produção =concentração de células e (AE) = atividade enzimática após 24 horas de cultivo na fase de produção.....	<b>71</b>
<b>Tabela 4.4:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo em frascos agitados com concentração de aminoácidos total ( $C_{aa}$ ) de 20,0 g/L, partindo de criotubos – Lote II.....	<b>75</b>

<b>Tabela 4.5:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados com omissão individual de aminoácidos.....	76
<b>Tabela 4.6:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE) e concentração de aminoácidos totais ( $C_{aa \text{ total}}$ ) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados com omissão individual e combinada dos aminoácidos Arg, Lys e Thr.....	77
<b>Tabela 4.7:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados com diferentes combinações de Asp e Glu.....	78
<b>Tabela 4.8:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE) e concentração de aminoácidos totais ( $C_{aa \text{ total}}$ ) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados com redução da concentração de Asp e Glu.....	80
<b>Tabela 4.9:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados com concentração total de aminoácidos igual a 7,0 g/L, inoculados com microrganismo crescendo em meio padrão ou modificado.....	81
<b>Tabela 4.10:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE), concentrações de aminoácidos total ( $C_{aa \text{ total}}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados com reformulação da composição de aminoácidos.....	83
<b>Tabela 4.11:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE), concentrações de aminoácidos total ( $C_{aa \text{ total}}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados com composição de aminoácidos reformulada incubados com células vegetativas armazenadas em eppendorfs contendo glicerol 8% v/v.....	84
<b>Tabela 4.12:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE) e concentração de proteínas (medida por Lowry) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> utilizando diferentes fontes de nitrogênio com concentrações baseadas na caseína hidrolisada enzimaticamente com Alcalase <sup>®</sup> .....	86
<b>Tabela 4.13:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos de cultivo de <i>B. megaterium</i> utilizando extrato de levedura a diferentes concentrações.....	88

<b>Tabela 4.14:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) no cultivo de <i>B. megaterium</i> para produção de PGA em diferentes concentrações de extrato de levedura.....	<b>89</b>
<b>Tabela 4.15:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) no cultivo de <i>B. megaterium</i> para produção de PGA com diferentes concentrações de extrato de levedura em frascos agitados partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a $-70^{\circ}\text{C}$ .....	<b>91</b>
<b>Tabela 4.16:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) nos cultivos de <i>B. megaterium</i> para produção de PGA com extrato de levedura a 10,0 g/L em frascos agitados realizados em paralelo ao ensaio em biorreator inoculados com células armazenadas como esporos em glicerol 20% v/v a $-70^{\circ}\text{C}$ .....	<b>94</b>
<b>Tabela 4.17:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) nos cultivos de <i>B. megaterium</i> para produção de PGA com extrato de levedura a 10,0 g/L em frascos agitados inoculados com células armazenadas como esporos a $-70^{\circ}\text{C}$ realizados em paralelo ao ensaio em biorreator.....	<b>96</b>
<b>Tabela 4.18:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (A.E.) obtidos de cultivo de <i>B. megaterium</i> utilizando fontes individuais de carbono e nitrogênio.....	<b>100</b>
<b>Tabela 4.19:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos de cultivo de <i>B. megaterium</i> utilizando fenilacetato de potássio e sulfato de amônio como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.....	<b>101</b>
<b>Tabela 4.20:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados realizados em paralelo ao cultivo em biorreator com sulfato de amônio e fenilacetato de potássio como fonte de nitrogênio e carbono, respectivamente.....	<b>103</b>
<b>Tabela 4.21:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados realizados em paralelo ao cultivo em biorreator com sulfato de amônio e fenilacetato de potássio a $30^{\circ}\text{C}$ e limitação de oxigênio dissolvido de 20 para 5% da saturação após 12 horas.....	<b>105</b>

<b>Tabela 4.22:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados com sulfato de amônio e fenilacetato de potássio realizados em paralelo ao cultivo em biorreator.....	107
<b>Tabela 4.23:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados utilizando diferentes concentrações de fenilacetato de potássio.....	109
<b>Tabela 4.24:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE) e concentração de amido obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados acrescidos de diferentes concentrações de amido solúvel.....	110
<b>Tabela 4.25:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE) e concentrações de amido ( $C_{\text{amido}}$ ) e aminoácidos ( $C_{\text{aa totais}}$ ) obtidos no cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados acrescidos de amido hidrolisado....	112
<b>Tabela 4.26:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos do cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados com soro de queijo em diferentes configurações.....	114
<b>Tabela 4.27:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos do cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados com proteínas individuais na ausência e presença de lactose (na forma de permeado de soro “in natura”).....	116
<b>Tabela 4.28:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos do cultivo de <i>B. megaterium</i> com diferentes concentrações de soro de queijo em pó (5,0-20,0 g/L).....	118
<b>Tabela 4.29:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (A.E.) obtidos do cultivo de <i>B. megaterium</i> com soro de queijo desproteínizado por coagulação térmica a 90°C.....	119
<b>Tabela 4.30:</b> Distribuição de massa molecular das amostras de soro de queijo integral e hidrolisado na concentração de 19,6 g/L obtidas pela cromatografia por exclusão de tamanho.....	120
<b>Tabela 4.31:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (A.E.) obtidos do cultivo de <i>B. megaterium</i> com soro em pó submetidos a dois graus de hidrólise: 3,0 e 6,2%.....	120

<b>Tabela 4.32:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos do cultivo de <i>B. megaterium</i> em frascos agitados partindo de células vegetativas armazenadas em glicerol 8% v/v a $-70^{\circ}\text{C}$ com soro de queijo hidrolisado.....	<b>121</b>
<b>Tabela 4.33:</b> Descrição resumida dos ensaios realizados em biorreator de bancada para estudos da influência do oxigênio dissolvido na produção de PGA por <i>B. megaterium</i> 2 conservado em meio sólido a $4^{\circ}\text{C}$ – “slants”.....	<b>126</b>
<b>Tabela 4.34:</b> Descrição resumida dos ensaios realizados para estudos da influência do oxigênio dissolvido na produção de PGA em biorreator pela linhagem tradicional de <i>B. megaterium</i> .....	<b>133</b>
<b>Tabela 4.35:</b> Descrição resumida dos ensaios realizados para estudos da influência da concentração de oxigênio dissolvido na produção de PGA pela linhagem tradicional de <i>B. megaterium</i> em meio de cultivo contendo soro de queijo hidrolisado.....	<b>141</b>
<b>Tabela 4.36:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE), concentração de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) ao longo do cultivo com meio reformulado partindo de eppendorf – Ensaio 19: Perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0.....	<b>146</b>
<b>Tabela 4.37:</b> Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE), concentração de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) ao longo do cultivo com meio reformulado partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 20: controle da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação e pH inicial 8,0.....	<b>151</b>
<b>Tabela 4.38:</b> Valores de atividade enzimática (AE) e concentração de proteínas ( $C_{proteínas}$ ) medidas em caldo conendo PGA produzida por <i>Bacillus megaterium</i> , pelos métodos de Lowry e Bradford, antes e depois da etapa de microfiltração.....	<b>159</b>
<b>Tabela 4.39:</b> Valores de atividade enzimática (AE) e concentração de proteínas ( $C_{proteínas}$ ) obtidos de caldos de cultivo ultrafiltrados em membrana de 50 kDa com fator de concentração volumétrica igual a 10.....	<b>161</b>
<b>Tabela 4.40:</b> Valores de atividade enzimática (AE) e concentração de proteínas ( $C_{proteínas}$ ) antes e depois da diafiltração com tampão fosfato pH 8,0, 100 mM.....	<b>162</b>

<b>Tabela 4.41:</b> Valores de atividade enzimática (AE) e concentração de proteínas ( $C_{\text{proteínas}}$ ) determinadas pelos métodos de Bradford e Lowry para as amostras submetidas respectivamente a microfiltração em membrana de 0,45 $\mu\text{m}$ e ultrafiltração em membrana de 50 kDa.....	<b>163</b>
<b>Tabela 4.42:</b> Valores de atividade enzimática (AE) e concentração de proteínas ( $C_{\text{proteínas}}$ ) dosadas pelo método de Bradford obtidas no permeado e concentrado após etapas de diafiltração a diferentes pHs. Volume inicial de caldo ultrafiltrado= 100 mL.....	<b>164</b>
<b>Tabela 4.43:</b> Percentuais de recuperação de unidades de penicilina G acilase ( $AE_{\text{final}}$ ) e atividade específica ( $AE_{\text{específica}}$ ) na fração concentrada após etapas de diafiltração com diferentes volumes de lavagem. Partindo de 100 mL de caldo com $AE_{\text{inicial}}= 420 \text{ UI/L}$ (42 UI) e $AE_{\text{específica inicial}}=0,89 \text{ UI/mg}_{\text{proteína}}$ .....	<b>165</b>
<b>Tabela 4.44:</b> Propriedades cinéticas de PGAs produzidas por diferentes microrganismos.....	<b>169</b>
<b>Tabela 4.45:</b> Valores da regressão linear para estimativa da energia de ativação, reta $Y=A+BX$ .....	<b>170</b>

## *Sumário*

---

---

<i>Resumo</i> .....	i
<i>Abstract</i> .....	iv
<i>Índice de Figuras</i> .....	vii
<i>Índice de Tabelas</i> .....	xii

### *Capítulo 1. Introdução*

---

---

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

### *Capítulo 2. Revisão Bibliográfica*

---

---

2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. Antibióticos.....	4
2.1.1. Penicilinas.....	4
2.1.1.1. Penicilinas Biossintéticas.....	5
2.1.1.2. Penicilinas Semi-sintéticas.....	7
2.2. Penicilina G Acilase.....	10
2.3. Penicilina G Acilase de <i>Bacillus megaterium</i> .....	11
2.4. <i>Bacillus megaterium</i> .....	11
2.4.1. Esporulação e Germinação em <i>Bacillus megaterium</i> .....	12
2.5. Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> .....	15
2.5.1. Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> no DEQ/UFSCar.....	18
2.6. Efeito da Composição dos Meios de Cultivo na Produção de PGA.....	19
2.7. Cinética de Processos Fermentativos.....	23
2.7.1. Fases do Crescimento Microbiano.....	24
2.7.2. Influência das Condições do Meio no Crescimento Microbiano.....	27
2.8. Separação e Purificação de Enzimas.....	30
2.9. Caracterização de Enzimas.....	31
2.9.1. pH Ótimo.....	32
2.9.2. Temperatura Ótima.....	33



2.9.3 Parâmetros Cinéticos - $K_m$ e $V_{m\acute{a}x}$ .....	35
2.9.4. Energia de Ativação.....	37

### **Capítulo 3. Materiais e Métodos**

---

3. Materiais e Métodos.....	39
3.1. Microrganismos.....	39
3.2. Nutrientes.....	39
3.3. Equipamentos.....	40
3.4. Conservação e Preservação do Microrganismo.....	41
3.4.1. Armazenamento do Microrganismo em Meio Sólido – “Slants”.....	41
3.4.2. Armazenamento do Microrganismo em Glicerol 20% v/v – Criotubos.....	42
3.4.3. Armazenamento do Microrganismo em Glicerol 8% v/v – “Eppendorfs”....	42
3.5. Composições das Diferentes Soluções Utilizadas na Preparação dos Meios de Crescimento e Produção.....	42
3.6. Obtenção do Inóculo.....	44
3.7. Produção da Enzima em Câmara Rotativa.....	45
3.8. Produção da Enzima em Biorreator.....	45
3.9. Análises das Amostras para Acompanhamento do Crescimento Celular e Produção de PGA por <i>B. megaterium</i> .....	46
3.9.1. Determinação da Concentração Celular.....	46
3.9.2. Contagem de Esporos e células vegetativas – Método TCID <sub>50</sub> .....	46
3.9.3. Determinação da Atividade Enzimática – Método PDAB.....	49
3.10. Análise da Presença de Proteases nos Caldos de Fermentação.....	49
3.10.1. Determinação da Atividade Proteolítica – Técnica do pHstato.....	49
3.10.2. Determinação da Atividade Proteolítica – Método Ginther.....	50
3.11. Acompanhamento do Consumo de Substratos.....	50
3.11.1 Determinação da Concentração de Lactose – Método DNS.....	50
3.11.2. Determinação da Concentração de Fenilacetato de Potássio.....	51
3.11.3. Determinação da Concentração de Glicose – Método Enzimático.....	51
3.11.4. Determinação da Concentração de Aminoácidos.....	52
3.11.5. Determinação da Concentração de Proteínas.....	52
3.11.5.1. Método de Lowry.....	52

3.11.5.2. Método de Bradford.....	53
3.11.5.3. Distribuição de Massas Moleculares.....	53
3.11.6. Determinação da Concentração de Sulfato de Amônio – Método de Kjeldahl.....	55
3.11.7. Determinação de Carboidratos e Ácidos Orgânicos.....	56
3.12. Preparo de Diferentes Substratos para Composição de Meios de Cultivo.....	56
3.12.1 Hidrólise do Amido por $\alpha$ -amilase.....	56
3.12.2. Hidrólise do Soro de Queijo por Tripsina Imobilizada em Quitosana.....	57
3.13. Separação e Purificação Preliminar de PGA de <i>Bacillus megaterium</i> .....	58
3.13.1. Microfiltração.....	58
3.13.2. Ultrafiltração.....	59
3.13.3. Diafiltração.....	59
3.14. Caracterização da PGA de <i>Bacillus megaterium</i> .....	59
3.14.1. Determinação da Temperatura e pH Ótimos.....	59
3.14.2. Estabilidade Térmica e Alcalina da PGA de <i>Bacillus megaterium</i> .....	60
3.14.3. Determinação dos Parâmetros Cinéticos - $V_{m\acute{a}x}$ e $K_m$ .....	60
3.14.4. Determinação da Energia de Ativação – $E_a$ .....	61

#### **Capítulo 4. Resultados e Discussão**

---

4. Resultados e Discussão.....	62
4.1. Padronização do Inóculo.....	62
4.1.1. Determinação da Variabilidade do Inóculo.....	62
4.1.2. Estratégias de Conservação/Reativação da Cultura.....	64
4.1.3. Cinética de Crescimento de <i>B. megaterium</i> para Microrganismos Conservados em Diferentes Formas de Preservação.....	68
4.1.4. Estudo da Influência do Tempo de Crescimento Durante a Fase de Germinação e/ou Propagação do Inóculo na Produção de PGA por <i>B. megaterium</i> .....	70
4.1.5. Conclusões do Item 4.1: Padronização do Inóculo.....	72
4.2. Estudo do Meio de Cultivo para Produção de Penicilina G Acilase por <i>Bacillus megaterium</i> .....	73

4.2.1. Estudo de Diferentes Composições da Solução de Aminoácidos na Produção de PGA por <i>B. megaterium</i> .....	<b>74</b>
4.2.2. Estudo de Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio na Produção de PGA por <i>Bacillus megaterium</i> .....	<b>85</b>
4.2.2.1. Influência da Concentração de Extrato de Levedura.....	<b>87</b>
4.2.2.2. Estudo de Fontes Individuais de Carbono e Nitrogênio.....	<b>99</b>
4.2.2.3. Influência de Diferentes Concentrações de Fenilacetato de Potássio na Produção de PGA.....	<b>109</b>
4.2.2.4. Utilização de Amido para Aumentar a Produção de PGA.....	<b>110</b>
4.2.3. Influência do Soro de Queijo na Produção da Enzima.....	<b>112</b>
4.2.3.1. Estratégias para minimizar a presença das proteínas do soro de queijo: Otimização da Concentração do Soro de Queijo.....	<b>117</b>
4.2.4. Conclusões do Item 4.2.: Estudo do Meio de Cultivo.....	<b>122</b>
4.3. Estudos das Condições Operacionais na Produção de Penicilina G Acilase por <i>Bacillus megaterium</i> .....	<b>123</b>
4.3.1. Influência da Temperatura na Produção de Penicilina G Acilase por <i>Bacillus megaterium</i> .....	<b>123</b>
4.3.2. Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de Penicilina G Acilase por <i>Bacillus megaterium</i> .....	<b>125</b>
4.3.2.1. Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de PGA com a Nova Linhagem de <i>B. megaterium</i> .....	<b>126</b>
4.3.2.2. Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de PGA com a Linhagem Tradicional de <i>B. megaterium</i> .....	<b>131</b>
4.3.2.2.a. Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de PGA por <i>B. megaterium</i> 1 em Meio de Cultivo Padrão – Soro de Queijo Integral..	<b>132</b>
4.3.2.2.b. Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de PGA por <i>B. megaterium</i> 1 em Meio de Cultivo com Soro de Queijo Hidrolisado...	<b>140</b>
4.3.2.2.c. Avaliação da Composição Reformulada de Aminoácidos na Produção de PGA em Biorreator.....	<b>146</b>
4.3.3. Conclusões do Item 4.3: Estudo da Influência da Temperatura e Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de PGA por <i>B. megaterium</i> ....	<b>155</b>
4.5. Concentração e Purificação da Enzima por Ultra e Diafiltração.....	<b>159</b>

4.5.1. Procedimentos de Concentração e Purificação para Enzima Produzida em Meio de Cultivo Contendo Soro de Queijo Integral.....	159
4.5.1.1. Microfiltração dos Caldos de Cultivo Contendo Soro de Queijo Integral...	159
4.5.1.2. Ultrafiltração dos Caldos de Cultivo Contendo Soro de Queijo Integral....	160
4.5.1.3. Diafiltração dos Caldos de Cultivo Contendo Soro de Queijo Integral.....	161
4.5.2. Procedimentos de Concentração e Purificação para Enzima Produzida em Meio de Cultivo Contendo Soro de Queijo Hidrolisado.....	162
4.5.2.1. Micro e Ultrafiltração de Caldos Contendo Soro de Queijo Hidrolisado....	162
4.5.2.2. Diafiltração dos Caldos de Cultivo Contendo Soro de Queijo Hidrolisado: Influência do pH e do Volume de Lavagem.....	163
4.6. Caracterização de Penicilina G Acilase de <i>Bacillus megaterium</i> .....	166

### ***Capítulo 5. Conclusões***

---



---

5. Conclusões.....	171
--------------------	-----

### ***Capítulo 6. Sugestões***

---



---

6. Sugestões.....	174
-------------------	-----

### ***Capítulo 7. Referências Bibliográficas***

---



---

7. Referências Bibliográficas.....	175
------------------------------------	-----

### ***Anexos***

---



---

Anexos.....	187
-------------	-----

## 1. INTRODUÇÃO

Transformações enzimáticas para obtenção de produtos farmacêuticos têm se mostrado como uma alternativa competitiva a processos químicos tradicionais em termos de custos e riscos e por isso tem sido amplamente explorada na síntese de antibióticos.

As penicilinas são os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos mais importantes em termos de produção anual e volume de prescrição, com contribuição estimada em aproximadamente 19% no mercado mundial de antibióticos, devido a sua superior ação inibitória sobre células bacteriana, amplo espectro de atividade e baixa toxicidade (Parmar, *et al.*, 2004). Contudo, o uso excessivo desses agentes anti-bacterianos permitiu o desenvolvimento de patógenos resistentes. Para superar esse problema, fez-se necessário o uso de novos antibióticos semi-sintéticos. As penicilinas semi-sintéticas não apenas exibem melhores propriedades tais como aumento de estabilidade, fácil absorção e menos efeitos colaterais do que as penicilinas naturais, mas também contornam a deficiência quanto à resistência microbiana aos antibióticos (Rajendhran e Gunasekaran, 2004).

A grande maioria das penicilinas semi-sintéticas é obtida pela desacilação química ou enzimática de penicilinas naturais, produzindo o ácido 6-aminopenicilânico, 6-APA. Os métodos químicos para a produção de 6-APA são ecologicamente prejudiciais e requerem o uso de reagentes perigosos. Em contraste, a conversão enzimática é estereoespecífica, com alto rendimento devido à redução de subprodutos e as condições reacionais são bastante amenas (Calleri *et al.*, 2004).

Comparativos econômicos indicam que a produção de 6-APA pela rota enzimática é pelo menos 9% mais barata que o processo químico tradicional, podendo chegar a mais de 20% se a produção de 6-APA pela via enzimática for integrada à produção da penicilina G por fermentação (Parmar *et al.*, 2004).

Penicilina G acilase, PGA, é a enzima usada na indústria para catalisar a hidrólise da penicilina G para obtenção do 6-APA. Estima-se que mais de 88% do 6-APA produzido mundialmente pela via enzimática é obtido pela reação com PGA (Rajendhran, *et al.*, 2004). Devido à grande importância industrial dessa enzima, muitos esforços têm sido direcionados para isolar PGA de diferentes fontes (microrganismos), estender suas aplicações industriais e obter um biocatalisador mais barato e com grande especificidade, atividade, pureza e estabilidade. (José *et al.*, 2003).

PGA pode ser produzida por uma variedade de microrganismos incluindo bactérias, fungos e leveduras. O microrganismo mais estudado é *Escherichia coli*, uma

bactéria gram-negativa, cuja enzima produzida, permanece acumulada no espaço periplasmático da célula. *Bacillus megaterium*, gram-positivo, é um dos poucos microrganismos que secretam a enzima para o meio de cultivo, o que simplifica procedimentos de recuperação da enzima.

Esta tese se insere numa linha de pesquisa há tempos estudada no Laboratório de Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar voltada à produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium*. Estudos realizados anteriormente pelo grupo investigaram diversos aspectos do processo de produção da enzima. No primeiro trabalho desenvolvido por Hojo, 1997, foram realizados estudos preliminares tais como: definição do tempo de incubação, concentrações iniciais do meio de cultura, armazenamento da enzima e padronização dos métodos analíticos. Trabalhos subseqüentes estudaram utilização de soro de queijo como fonte de carbono (Berazain, 1997); influência da concentração de oxigênio dissolvido (Visnardi, 1997); efeito dos micronutrientes, vitaminas e sais minerais, no crescimento do microrganismo e produção da enzima (Inocêncio, 2002); diferentes composições de meio de cultura, purificação/concentração e imobilização da enzima (Pinotti, 1999 e 2003), influência da concentração de aminoácidos no meio de cultivo (Souza, 2003); e utilização de técnicas computacionais visando simular variáveis do processo de produção (Nucci, 2003; Silva, 2003 e Tonin, 2005). Ao longo desses anos foram geradas várias publicações em revistas internacionais nesse tema (Hojo e Hokka, 1998, Pinotti *et al.*, 2000, 2002 e 2007, Souza *et al.*, 2005, Silva *et al.*, 2006, Nucci, *et al.*, 2007).

A experiência e os conhecimentos acumulados pelo grupo ao longo dos anos, nos permitiram dar continuidade a este projeto, revisitando diferentes aspectos da produção da enzima. Variáveis que pensávamos serem independentes e já estarem definidas mostravam que eram, na verdade, dependentes de outros fatores no cultivo e requeriam novo estudo, mais aprofundado. Contudo, embora por vezes tenhamos tido a sensação de estarmos percorrendo o mesmo caminho, insistimos, pois nos movia a certeza de que na verdade estávamos caminhando num plano de conhecimento superior ao anterior.

Assim, neste trabalho, demos continuidade ao estudo da produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium*, enfocando os seguintes objetivos:

#### **A) Estudo sistemático do inóculo:**

Definir estratégias para preservação do microrganismo:

1. Conservação de esporos em meio sólido a 4°C (slants)
2. Conservação de células dormentes em glicerol 20% p/v a -70°C (criotubos)

3. Conservação de células vegetativas em glicerol 8% p/v a  $-70^{\circ}\text{C}$  (eppendorfs)

**B) Produção de PGA por *Bacillus megaterium*:**

Desenvolver um meio de cultivo simplificado que permita o aumento da atividade enzimática, através de ensaios preliminares realizados em frascos agitados:

1. Definir a melhor composição e concentração de aminoácidos livres
2. Investigar diferentes fontes de carbono e nitrogênio
3. Estudar metodologias para minimizar o conteúdo de proteínas presentes no soro de queijo

Definir as condições mais favoráveis à produção da enzima em biorreator, em especial temperatura e concentração de oxigênio dissolvido

Estabelecer a melhor estratégia para a produção da enzima em biorreator (batelada ou batelada alimentada, vazão de alimentação, composição do meio suplementar)

**C) Purificar PGA por *Bacillus megaterium*:**

Remoção de proteínas remanescentes do caldo fermentativo, através de processos de filtração em membranas: micro, ultra e diafiltração

**D) Caracterizar cineticamente a enzima produzida por *B. megaterium*:**

Caracterizar a PGA quanto à:

1. Temperatura ótima
2. pH ótimo
3. Estabilidade térmica
4. Estabilidade a pH alcalino
5. Parâmetros cinéticos  $V_{\text{máx}}$  e  $K_m$

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Neste capítulo serão abordados alguns temas relevantes ao melhor entendimento do contexto em que se insere esta tese: um breve histórico sobre antibióticos, primordialmente, as penicilinas; a enzima penicilina G acilase e os aspectos pertinentes à produção da PGA, o foco deste trabalho.

### **2.1. Antibióticos**

Antibióticos são agentes quimioterápicos naturais produzidos por microrganismos, que são administrados para combater infecções bacterianas em seres humanos e animais. Eles interferem no metabolismo celular e por mecanismos diversos levam a interrupção da atividade das células, seja inibindo seu crescimento ou eliminando os microrganismos patogênicos, já que afetam a síntese de componentes do peptidoglicano da parede celular bacteriana. Sem essa proteção, há uma maior absorção de água, aumentando o volume das células e conseqüentemente provocando um rompimento da parede celular.

O primeiro antibiótico descoberto, a Penicilina, recebeu esse nome quando Alexander Fleming, em 1929, observou a formação de halos de inibição causados por um produto secretado por *Penicillium notatum* sobre bactérias patogênicas, *Staphylococcus aureus*, inoculadas em placas de ágar.

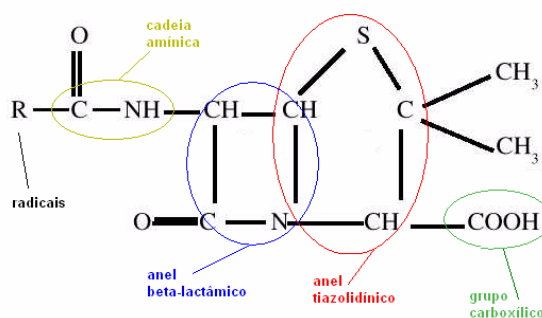
#### **2.1.1. Penicilinas**

Penicilina é o nome genérico de um grande grupo de substâncias antibióticas derivadas de diversas espécies do fungo *Penicillium*. Comercialmente, constitui o maior mercado mundial de antibióticos, do total produzido mundialmente, cerca de  $5 \times 10^7$  Kg/ano, as penicilinas contribuem com  $3 \times 10^7$  Kg/ano (Elander, *et al.*, 2003).

As várias penicilinas existentes são constituídas de um anel tiazolidina fundido a um núcleo comum, o anel  $\beta$ -lactâmico denominado ácido 6-aminopenicilânico, ao qual se liga um grupamento variável por uma ligação peptídica. O núcleo  $\beta$ -lactâmico corresponde a uma amida cíclica (lactama) contendo quatro lados e ao anel tiazolidínico contendo enxofre (tio) (Sebek, *et al.*, 1987).

A Figura 2.1 mostra a estrutura química do ácido 6-aminopenicilânico, 6-APA.





**Figura 2.1:** Estrutura química do núcleo comum, o anel  $\beta$ -lactâmico.

As diversas cadeias laterais ligadas ao 6-APA conferem propriedades especiais a cada derivado. Dependendo da forma de obtenção, as penicilinas podem ser classificadas como biossintéticas ou semi-sintéticas.

#### 2.1.1.1. Penicilinas Biossintéticas

As penicilinas biossintéticas também chamadas de penicilinas naturais apresentam as seguintes características:

- Preparadas como sais de sódio, potássio e outras bases;
- Solúveis em água, álcool etílico, éter, éster e dioxana;
- Ligeiramente solúveis em clorofórmio e benzeno;
- Incolores na forma cristalina;
- Inativadas pelo calor, hidróxido de sódio, cisteína, ácido clorídrico e penicilanase
- Não são afetadas pela saliva ou pela bile (Pelkzar, *et al.*, 1986).

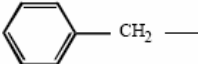

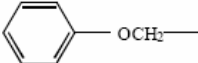
As penicilinas naturais são obtidas diretamente do caldo de bioprocessos, apresentando diferentes estruturas. Essas diferenças são possíveis, pois enzimas de metabolismo secundário em geral apresentam uma menor especificidade de substrato e estão sob um controle menos restrito que as enzimas de metabolismo primário.

Devido a essa característica comum dos microrganismos que produzem penicilinas, eles são capazes de sintetizar grupos estruturalmente relacionados com antibióticos, ao invés de estruturas únicas. Dessa forma, pode se direcionar a produção de

estruturas previamente desejadas pela adição de precursores exógenos, que competirão com os precursores endógenos, sendo preferencialmente incorporados, sintetizando o antibiótico correspondente, suprimindo ou eliminando completamente a formação das estruturas obtidas sem a adição de precursor.

As primeiras observações nesse sentido foram feitas durante os primeiros trabalhos para produção de penicilinas, nos quais se notava que para diferentes composições de meio eram formadas diferentes penicilinas. Essa diferença era devido à cadeia lateral acila unida ao 6-APA através de uma ligação amida (Sebek, 1987).

**Tabela 2.1:** Estrutura química de diferentes cadeias laterais ligadas ao núcleo  $\beta$ -lactâmico de diferentes penicilinas (Menezes *et al.*, 2000).

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

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  $\beta$ -lactâmico.

Além da diferença estrutural, as penicilinas G e V diferem em sua estabilidade em meio ácido. A penicilina G é degradada no estômago pelo suco gástrico, inviabilizando a sua administração oral, sendo, pois, utilizada apenas por via intramuscular.

Penicilina G pode ser obtida naturalmente em cultivos de *Penicillium chrysogenum* ou *Penicillium notatum* na presença de ácido fenilacético ou do precursor fenil

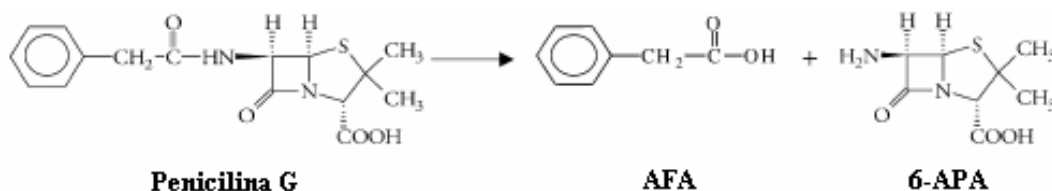
acetato de potássio. Além de sua atividade intrínseca como agente terapêutico, é também utilizada como matéria-prima para a produção dos antibióticos semi-sintéticos através da mudança no radical ligado ao grupo amino do 6-APA (Pelkzar, et al., 1986).

### 2.1.1.2. Penicilinas Semi-sintéticas

As penicilinas naturais podem ser destruídas por enzimas denominadas penicilinases. Essas enzimas destroem o anel  $\beta$ -lactâmico do núcleo básico da molécula e por esta razão são também denominadas  $\beta$ -lactamases. A abertura desse anel impede a penicilina de atuar no bloqueio da formação da parede celular de bactérias, não combatendo assim a infecção. Bactérias que produzem a enzima penicilinase são assim resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. Quando as penicilinas foram introduzidas para uso hospitalar na década de 40, mostraram-se de grande utilidade no tratamento de infecções, no entanto, as populações de microrganismos produtores de penicilinases não eram afetadas e continuaram a crescer, atingindo cerca de 80% das infecções em meados de 1950 (Sebek, 1987).

Em resposta a essa situação, foram sintetizados novos antibióticos, incluindo as penicilinas semi-sintéticas, sendo algumas altamente efetivas no combate às populações resistentes a penicilina, dentre elas meticilina e nafcilina. Esses novos antibióticos apresentavam maior estabilidade, pouca afinidade com  $\beta$ -lactamases, melhor absorção, além de apresentarem menor número de efeitos colaterais e grande espectro de atuação antimicrobiana frente às penicilinas naturais (Cole, 1981).

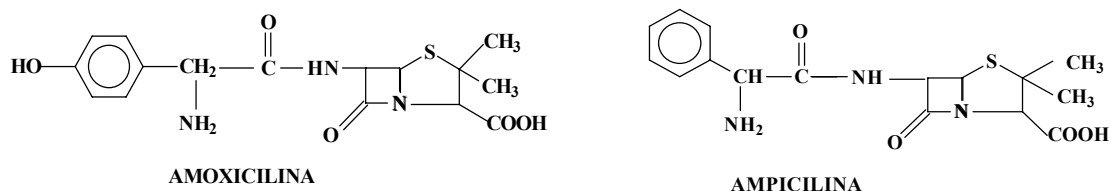
O desenvolvimento de penicilinas semi-sintéticas requer a produção do intermediário 6-APA obtido a partir da desacilação de penicilinas naturais, principalmente a penicilina G.



**Figura 2.2:** Reação esquemática da hidrólise de penicilina G para obtenção de ácido fenil acético (AFA) e ácido 6-aminopenicilânico (6-APA).

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, 1984).



**Figura 2.3:** Estrutura química de antibióticos semi-sintéticos.

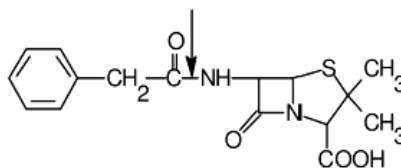
A desacilação de penicilinas biossintéticas pode ser feita por via química ou enzimática. Os métodos químicos tradicionais são ecologicamente prejudiciais devido a sua alta carga poluente e requerem o uso de reagentes perigosos. Em contrapartida, a conversão enzimática é estereo-específica, possibilitando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

Comparativos econômicos da 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).

As enzimas envolvidas nesse processo são classificadas na Comissão de Enzimas com o nome oficial de penicilina amidohidrolase (E. C. 3.5.1.11), mas nomes não oficiais como penicilina acilase e penicilina amidase são comumente usados.

A seguir, a Figura 2.4 apresenta uma comparação entre a hidrólise da penicilina G por processo químico tradicional e processo enzimático.

**Benzilpenicilina: Penicilina G**

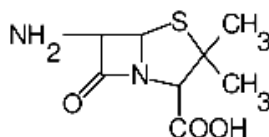


**Processo enzimático**

Enzima imobilizada  
 Amônia  
 +30°C

**Processo químico**

Dimetilclorosilano  
 N,N'-dimetilanilina  
 Fosfopentacloroeto  
 Amônia  
 -40°C



Ácido 6-aminopenicilânico + ácido fenilacético

**Requerimentos para a produção de 500 t de 6-APA**

Para a hidrólise:

1000 t Penicilina G	1000 t Penicilina G
45 t Amônia	300 t Dimetilclorosilano
1 t Enzima imobilizada	800 t N,N'-dimetilanilina
10000 m <sup>3</sup> Água	600 t Fosfopentacloroeto
	160 t Amônia
	4200 m <sup>3</sup> Diclorometano
	4200 m <sup>3</sup> n-butanol

Para o processo de purificação:

Acetona	Ácido hidrocloreídrico
Bicarbonato de Amônio	Butilacetato
	Acetona

**Figura 2.4:** Comparação de processo químico com processo enzimático na hidrólise da penicilina G mostrando as vantagens de sua utilização (Buchholz, *et al*, 2005).

## 2.2. Penicilina G Acilase

Aplicações biotecnológicas das penicilinas acilases tem emergido como uma alternativa para processos químicos tradicionais: manufatura de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, pequenos peptídeos de isômeros puros de misturas racêmicas. Embora, estas enzimas estejam envolvidas principalmente na produção industrial de penicilinas semi-sintéticas (Calleri, *et al.*, 2004).

Penicilinas acilases são classificadas com bases na especificidade pelo substrato:

- Penicilina G acilase (PGA) – hidrolisa preferencialmente penicilina G;
- Penicilina V acilase (PVA) – hidrolisa especialmente penicilina V;
- Ampicilina acilase – tem preferência por hidrolisar ampicilina.

Estima-se que mais de 88% do 6-APA produzido mundialmente pela rota enzimática é obtido pela reação catalisada por PGA, e o restante por PVA (Rajendhran, *et al.*, 2004).

Devido a grande importância industrial da PGA, muitos esforços têm sido direcionados para isolar enzimas de diferentes fontes, estender suas aplicações industriais e obter um biocatalisador mais barato e com grande especificidade, atividade, pureza e estabilidade (José, *et al.*, 2003).

PGA é produzida por uma variedade de microrganismo, tais como bactérias, fungos e leveduras, em geral, é produzida em processos fermentativos e obtida de linhagens selvagens ou mutantes.

As enzimas de bactérias gram-negativas permanecem acumuladas no espaço periplásmico e as PGAs de bactérias gram-positivas como *Arthrobacter viscosus* e *Bacillus megaterium* são secretadas (Rajendhran, *et al.*, 2003).

Com relação às PGAs de *B. megaterium* e *E. coli*, elas são inibidas pelo produto, competitivamente pelo ácido fenil acético e não competitivamente pelo 6-APA. Quanto à temperatura e pH ótimos de reação, os valores estão comumente na faixa de 35-37° e pH 7,8-8,0, respectivamente, dependendo da origem (Savidge e Cole, 1975).

Estudos recentes com respeito à estrutura da PGA de *E. coli* revelam que a enzima é produzida como um precursor de cadeia única consistindo de 846 resíduos de aminoácidos no citoplasma. O precursor é então processado pela remoção de uma sequência

de sinais e um espaçador com 26 e 54 aminoácidos, respectivamente, resultando numa enzima “madura” que é um heterodímero de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  (209 e 557 resíduos de aminoácidos). Seu papel “in vivo” permanece não esclarecido, porém o fato da expressão ser regulada pelo ácido fenil acético faz com que haja especulações de que ela possa estar envolvida na assimilação de componentes aromáticos como fonte de carbono (Calleri, *et al.*, 2004).

### 2.3. Penicilina G Acilase de *Bacillus megaterium*

Pesquisa e desenvolvimento da produção de PGA têm sido realizados principalmente com a enzima obtida intracelularmente por *Escherichia coli* (Szentirmai, 1964; Vojtisek e Slezak, 1975; Savidge e Cole, 1975; Shewale e Sivaraman, 1989; Ospina, 1992; De León-Rodríguez, *et al.*, 2006). A purificação da enzima intracelular requer ruptura das células, o que origina custos elevados para sua recuperação. Esta ruptura, em escala laboratorial, pode ser feita por sonda de ultrassom e em larga escala pela passagem das células em um homegeinizador industrial de alta pressão (Savidge e Cole, 1975).

Uma alternativa é a utilização de um microrganismo que produza a enzima e acrete para o meio de cultivo, característica de *Bacillus megaterium*. O modo de produção extracelular da PGA de *Bacillus megaterium* torna particularmente interessante o processo do ponto de vista econômico, pois os procedimentos de purificação tornam-se sobremaneira simplificados e conseqüentemente menos caros.

### 2.4. *Bacillus megaterium*

Os membros do gênero *Bacillus sp* 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, celulases, proteases e xilanases - anticorpos e outros metabólitos (Sinhaikul, 2002).

*Bacillus megaterium* é um microrganismo aeróbio particularmente interessante por sua fisiologia e ampla extensão de seu habitat, podendo ser encontrado no solo, em alimentos desidratados, água marinha, sedimentos e até mesmo em mel de abelha.

Sua importância econômica se deve ao fato de produzir penicilina acilase, amilases, glicose desidrogenase, antibióticos (emimicina, oxitanocina), esteróide hidrolase e ser o maior produtor de vitamina B<sub>12</sub>. Além disso, é usado crescentemente como hospedeiro

para expressão de DNA recombinante, por secretar proteínas facilmente, não ter endotoxina na parede celular e ser industrialmente comprovado como microrganismo rentável ao se utilizar substratos baratos, além de não expressar proteases alcalinas que interferem nas clonagens em *Bacillus*.

*B. megaterium* tem capacidade de esporulação e destaca-se dentro do gênero bacilos pelo grande tamanho de suas células vegetativas e esporos, daí a origem do seu nome.

As células vegetativas mostram-se como cilindros de extremidades arredondadas, apresentando diferentes dimensões conforme o meio de cultura. Em ágar nutriente tem diâmetro em torno de 1,5 µm e comprimento na faixa de 2,5-6,0 µm. Os esporos apresentam-se elipsoidais com dimensões de 0,8-1,2 por 1,5-2,0 µm; Cresce de forma ordenada, abundante, lisa, aparência gordurosa, translúcida para opaca, branca leitosa para amarelo, sem escurecimento com o tempo.

O crescimento em placas mostra formação de colônias circulares, superfície rugosa, margens levemente onduladas, não espalhada, branco leitoso para amarelado e levemente aderente. Quando cultivado em meio de cultura por 24 horas a 30°C apresenta ligeira turvação do meio e se cultivado em meio de cultura por tempo prolongado, sua coloração pode variar de uma tonalidade marrom até preta (Murao *et al*, 1964).

Quanto às propriedades fisiológicas sabe-se que a temperatura ótima de crescimento está entre 28-35° C, não ocorrendo crescimento acima de 45°C. O pH ótimo está na faixa de 7,0-8,5, e nenhum crescimento ocorre a pH 5,0 ou menor. Apresenta capacidade para reduzir nitrato em nitrito, produz amônia, forma ácidos, porém não forma gases em glicose, frutose, galactose, maltose, sacarose e amido. Digere caseína facilmente, podendo se reproduzir em meios sem fatores de crescimento, contando apenas com sais de amônia ou nitrato como fontes de nitrogênio e glicose como fonte de carbono (Bergey, 1974).

#### **2.4.1. Esporulação e Germinação em *Bacillus megaterium***

Algumas bactérias podem apresentar um estilo de vida alternativo que implica na formação de esporos. O processo de desenvolvimento que resulta no surgimento de esporos é denominado esporulação. Condições ambientais pouco adequadas ao crescimento vegetativo como carência nutricional ou alta densidade celular associadas a sinais internos relacionados ao metabolismo e ciclo celular, podem disparar este processo.

A estrutura do esporo é completamente diferente da célula vegetativa que lhe deu origem, o que caracteriza um processo de diferenciação celular. Os esporos apresentam



uma morfologia e uma composição enzimática e química que lhes confere resistência às condições pouco propícias ao crescimento vegetativo, como ausência de nutrientes, baixa disponibilidade de água ou temperatura elevada. O conteúdo de água diminui de 75-80%, nas células vegetativas, para 15-20% nos esporos, os quais apresentam uma baixa atividade metabólica (dormentes) comparada à das células vegetativas. O esporo é envolvido por uma capa protetora constituída de proteínas, glicoproteínas e peptidoglicanas.

As bactérias que formam esporos o fazem geralmente durante a fase estacionária em resposta às condições ambientais metabólicas. Quando nutrientes como carbono ou nitrogênio tornam-se limitantes, esporos altamente resistentes são formados dentro da célula-mãe. Com muito pouca frequência, algumas bactérias formam esporos até mesmo quando nutrientes estão disponíveis. Embora células dormentes não sejam metabolicamente ativas, elas podem sobreviver a longos períodos de escassez nutricional e são mais resistentes a altas temperaturas, radiação e substâncias tóxicas (Black, 1996).

A formação de esporos se inicia pela replicação do DNA formando um material nuclear longo, compacto. Os dois cromossomos formados pela replicação separam-se e movem-se para locais diferentes da célula. A maior parte do RNA celular e algumas moléculas de proteína citoplasmática juntam-se em torno do DNA para fazer o núcleo ou a parte viva do endósporo. O núcleo contém ácido dipicolínico e íons cálcio que provavelmente contribuem na resistência ao calor. O septo do esporo, formado pela membrana celular, cresce ao redor do centro fechando este em uma espessura dupla da membrana celular. As camadas dessa membrana sintetizam peptoglicano e o liberam no espaço entre as membranas, formando uma camada chamada córtex. Essa estrutura protege o centro contra mudanças de pressão osmótica, tais como aquelas resultantes de secagem.

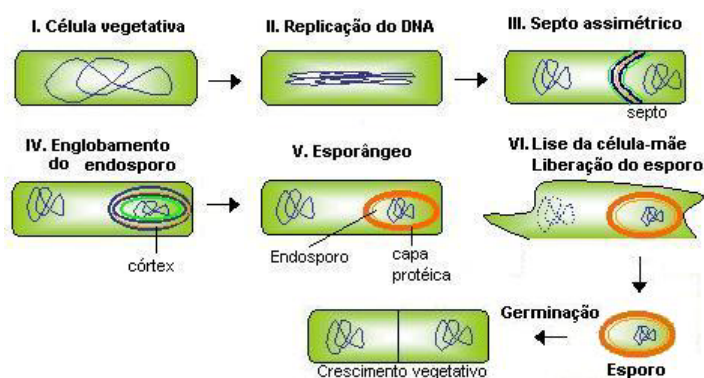
Uma outra camada, formada de proteína queratina e chamada capa (impenetrável para muitas substâncias químicas), é colocada em torno do córtex pela célula mãe. Finalmente, em alguns endoesporos um exospório, uma membrana protéica-lipídica, é formada fora da capa pela célula mãe.

Uma vez retornada as condições favoráveis, o esporo desenvolve uma célula vegetativa num processo chamado de germinação, que ocorre em três estágios. O primeiro que é a ativação, usualmente requer algum agente traumático, tais como baixo pH ou calor, que danifique a capa. Sem a danificação, alguns endoesporos podem germinar lentamente. O segundo estágio, que é a germinação propriamente dita, requer água e uma agente de germinação, como alanina ou certos íons inorgânicos, que penetram a capa danificada. Durante este processo, muito do peptoglicano cortical é rompido e seus fragmentos são

liberados ao meio. E, finalmente, ocorre o crescimento em meio com nutrientes adequados. Proteínas e RNA são sintetizados, e em torno de 1 hora começa a síntese de DNA. A célula agora é uma célula vegetativa e sofre divisão binária (Black, 1966).

A esporulação em bacilos tem sido estudada para aplicar a diferenciação da célula desse gênero como um sistema modelo para entender o desenvolvimento das demais células. Uma grande quantidade desses estudos foi desenvolvida com *Bacillus megaterium* por causa de seu tamanho, sua habilidade para esporular em diversos meios e germinar sincronizadamente em uma ampla variedade de germinantes.

De acordo com Vary, 1994, o estudo de esporulação em *B. megaterium* foi possível graças às sofisticadas técnicas moleculares e genéticas, mutantes e mudanças morfológicas observáveis, porém a germinação é mais difícil de entender. Por ser um processo rápido, não é facilmente acompanhada seqüencialmente, uma vez que eventos iniciais ocorrem no esporo com poucas mudanças morfológicas. Um fato intrigante é que os esporos respondem somente a poucos componentes que conseguem penetrar através de diversas camadas da capa: a membrana externa, o córtex até o receptor localizado na membrana interna. Uma vez superadas as diversas camadas, os efeitos são dramáticos e rápidos, utilizando enzimas e outros componentes já presentes no esporo. O resto da germinação é uma seqüência de eventos biossintéticos pouco entendidos chamados crescimento, que resulta na liberação de uma célula nova metabolicamente ativa dentro de 90 minutos. A seqüência desses eventos é: ativação, aumento da sensibilidade ao calor, inchaço, liberação de depicolínico e hexasamina, início do metabolismo, geração de ATP, síntese de RNA e DNA, síntese de proteínas e finalmente aparecimento da célula de divisão.



**Figura 2.5:** Representação esquemática de esporulação em bactérias.

Em culturas de bactérias do gênero *Bacillus* sp o fim da fase exponencial de crescimento define o início da esporulação. Monteiro, *et al.*, 2005 ao estudar a influência das condições do cultivo de *Bacillus subtilis* verificou que variáveis operacionais tais como pH, concentração de oxigênio dissolvido e composição do meio interferem significativamente na produção de esporos, estimados pelo Método TCID<sub>50</sub>, descrito por Reed and Muench, 1938. Cultivos a pH 7,5 apresentaram maior concentração de esporos na faixa estudada, 6,0-9,0. A concentração de oxigênio dissolvido pareceu não influenciar o crescimento do microrganismo, embora a presença de esporos tenha sido mais pronunciada controlando-se a concentração de oxigênio dissolvido em 30% da saturação. Observou-se um decréscimo na formação de esporos com o aumento da concentração da fonte de carbono. Baixas concentrações de glicose, 2,0-5,0 g/L, adicionadas inicialmente, foram consumidas antes do fim da fase exponencial, enquanto que para altas concentrações ocorria consumo de glicose ainda na fase estacionária.

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

A enzima extracelular de *Bacillus megaterium* tem cada vez mais despertado o interesse acadêmico e industrial, no entanto, aspectos relevantes sobre os procedimentos para sua obtenção são escassos e mantidos sobre segredo industrial.

Os primeiros trabalhos sobre produção de PGA por *Bacillus megaterium* reportados em literatura descrevem a composição de um meio de cultura para a produção da enzima: caseína hidrolisada (3%), glicose (0,5%) e adição do indutor ácido fenil acético (0,15%) após 8 horas de incubação do microrganismo (Chiang e Bennett, 1967). Acevedo e Cooney, 1973, estudaram o efeito da limitação das fontes de nitrogênio, enxofre e fósforo na produção da enzima em cultura contínua, utilizando como única fonte de nitrogênio a histidina. Os resultados mostraram que a produção da enzima é controlada por diversos mecanismos regulatórios que dependem das condições ambientais do meio de cultura e da concentração do indutor, o ácido fenil acético (AFA), sendo que baixas concentrações deste estimulam o crescimento e altas concentrações o inibem.

Já Illanes *et al.*, 1994, apresentaram resultados para a produção da enzima utilizando meios complexos e definidos onde foram observados a cinética de indução por ácido fenil acético e o efeito da glicose na produção da enzima. 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.

Uma das fontes de nitrogênio mais comumente utilizada é a caseína hidrolisada, porém uma ampla variedade de outras fontes estão disponíveis a preços razoáveis. Gentina *et al.*, 1997, utilizaram diferentes fontes de nitrogênio na síntese e expressão da enzima e os resultados mostraram que a baixa produção em alguns dos substratos é devida à natureza protéica da fonte de nitrogênio.

Pinotti, *et al.*, 2000, ao estudar diferentes composições de meio de cultivo para produção da PGA, verificaram que para altas produções da enzima, 138 UI/L, aminoácidos livres são requeridos.

Yang, *et al.*, 2006, utilizaram os aminoácidos livres reportados no trabalho de Pinotti, *et al.*, 2000, excluindo os aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano, que são produzidos pela via pentose fosfato. Quando o meio mínimo foi suplementado com os aminoácidos a atividade enzimática aumentou em 2,5 vezes.

O crescente aumento na produção de penicilinas semi-sintéticas e conseqüentemente a produção de seu precursor, o 6-APA, tem incentivado pesquisas sobre a produção PGA. 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 obtidos com a PGA de *E. coli*, a enzima mais comumente usada nos processos industriais, com atividade enzimática em torno de 200 UI/mL.

Attingir essa meta requer assim não só continuidade dos estudos de otimização de meio e condições operacionais, como também uso de outras abordagens, abrangendo técnicas de seleção e modificação genética de microrganismos produtores.

Uma alternativa promissora é a produção de PGA recombinante com o objetivo de aumentar a produção de PGA em microrganismos portadores do gene *pac*. A tecnologia do DNA recombinante tem sido amplamente utilizada para a obtenção de linhagens clonadas com maior capacidade de produção da enzima.

O microrganismo mais utilizado para a produção de proteínas recombinantes é a *E. coli* uma vez que sua informação genética é bem conhecida. Linhagens clonadas têm sido utilizadas 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 microrganismos (Cai *et al.*, 2004), análise da atividade enzimática e enovelamento das subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  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).

Martín *et al* (1995) subclonaram e expressaram a PGA de *B. megaterium* ATCC 14945, a mesma linhagem utilizada nesse trabalho em *E. coli*. Os autores não observaram a secreção da enzima recombinante sugerindo que o peptídeo sinal contido na sequência 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* AC 8904 em *Bacillus subtilis* WB 600 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 40 U/mL sob condições otimizadas. A PGA purificada apresentou uma atividade específica de 45 U/mg de proteína. Os valores atingidos, segundo os próprios autores ainda são baixos para uma escala de produção industrial.

### 2.5.1. Produção de PGA por *Bacillus megaterium* no DEQ/UFSCar

A literatura reporta poucos estudos sobre a produção extracelular de PGA por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. Dado a importância do processo 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 205 UI/L, valores semelhantes aos obtidos por Illanes, e colaboradores, 1994.

No segundo trabalho realizado no departamento, Berazaín, 1997, estudou a aplicação do soro de queijo em pó 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 O<sub>2</sub>, concentração celular e produção da enzima. O autor ajustou uma correlação do crescimento do microrganismo em função da velocidade de produção de CO<sub>2</sub> 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) 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<sup>®</sup>, onde se obtinha maior disponibilidade de aminoácidos e pequenos peptídeos para o microrganismo.

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.

Souza, 2003, estudou os requerimentos nutricionais do *B. megaterium*. Foram investigados os efeitos de diferentes concentrações de aminoácidos e sua composição em frascos agitados. Para todas as composições estudadas, com omissão individual de aminoácidos, a produção da enzima alcançava em torno de 217 ± 34 UI/L. Os resultados mostraram que nenhum dos 18 aminoácidos que compõe 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.

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

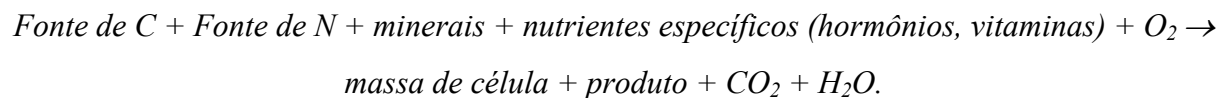
Tonin, 2005, propôs um modelo híbrido combinando equação de balanço com redes neurais para inferir a concentração celular ao longo do processo. O modelo proposto foi capaz de inferir com boa precisão a concentração celular nos ensaios de treinamento e obteve boas previsões nos ensaios de validação para os testes realizados.

## 2.6. Efeito da Composição dos Meios de Cultivo na Produção de PGA

A formulação adequada dos meios de cultivo 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:



A maioria dos nutrientes é fornecida a níveis acima das necessidades mínimas, no entanto, alguns nutrientes que 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.

Dada a 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.

Alguns estudos relacionados à composição de meios de cultivos foram desenvolvidos na tentativa de proporcionar maior esclarecimento a respeito das necessidades do microrganismo, tanto no sentido do crescimento celular como obtenção de produtos desejados são apresentados a seguir.

O efeito de alguns aminoácidos na produção de proteases por *B. megaterium* foi estudado por Chaloupka *et al.*, 1966. Conforme os autores, proteases são formadas no meio de cultivo durante o crescimento em meio contendo sais e glicose, embora também tenham sido sintetizadas em meio livre de nitrogênio, onde não se verificava crescimento das células. A adição de aminoácidos individuais ou a mistura deles inibiu substancialmente a síntese de enzima, sendo que os aminoácidos que mais contribuíram para tal efeito foram treonina, isoleucina e valina, porém quando uma mistura de aminoácidos que individualmente não reprimia a síntese foi adicionada, ocorreu uma repressão muito maior que quando se utilizava treonina, indicando um efeito aditivo.

Neidhardt *et al.*, 1974, desenvolveram um meio sintético mínimo para cultivo de enterobactérias. Esse meio, no qual os macronutrientes (fosfato, sulfato e nitrogênio) estavam presentes em quantidades suficientemente baixas para permitir seguimento isotópico, manteve o crescimento de *E. coli* e *Salmonella typhimurium* a taxas comparáveis com os meios sintéticos tradicionais que utilizavam altas concentrações de fosfato. Ambas as culturas cresceram em meio MPOS-glicose e foram inoculadas nesse mesmo meio, porém suplementado com diferentes nutrientes. O crescimento das bactérias foi monitorado e o ponto de desaceleração definiu a concentração mínima necessária do nutriente em estudo.

O crescimento de duas linhagens de *Lactococcus lactis*, uma de origem vegetal e outra de laticínio foi estudado por Cocaign-Bouquet e colaboradores, 1995. A formulação de um meio sintético foi realizada através da técnica da omissão simples de cada componente para determinar os verdadeiros requerimentos nutricionais (meio mínimo). Com relação às vitaminas, ácido nicotínico e pantotênico parecem ser igualmente requeridas por ambas as espécies, mostrando-se essenciais para o crescimento. No que diz respeito aos aminoácidos, a remoção de seis deles (ácido glutâmico, valina, metionina, leucina, isoleucina e histidina) impedia o crescimento de todas as espécies. As duas linhagens indicaram requerimento absoluto para magnésio, pois quando este nutriente foi omitido o crescimento parou rapidamente. Os autores verificaram que os aminoácidos fornecidos satisfazem o



requerimento de nitrogênio para a síntese de biomassa, pois quando sal de amônio, outra fonte de nitrogênio, foi removido do meio não provocou alteração no crescimento.

Neviani *et al.*, 1995, investigaram a relação entre requerimento de aminoácidos e atividade peptidase em três linhagens de *Streptococcus salivarius* utilizando meio sintético sem componentes nitrogenados e meio composto de leite sem a fração de nitrogênio não protéico (leite RD). Cultivos sem adição de aminoácidos, cultivos suplementados com uma mistura de 18 deles e cultivos caracterizados pela omissão de aminoácidos individuais foram comparados entre si. As linhagens mostraram ser dependentes de aminoácidos em seus crescimentos e apresentaram diferentes requerimentos para esse nutriente. As diferenças mais óbvias foram em bactérias crescendo em meio livre de nitrogênio e menos evidentes em leite RD, onde provavelmente os microrganismos tenham usado as proteínas do leite como fonte de nitrogênio.

Trabalho realizado por Fisher, 1999, com *Bacillus subtilis* que tem uma relação estreita com *Bacillus megaterium*, reporta que três sistemas regulatórios de proteínas controlam a expressão de genes envolvidos no metabolismo de nitrogênio em resposta à disponibilidade de nutrientes. (a) CodY: reprime a expressão dos genes necessários ao metabolismo de compostos nitrogenados quando as células estão crescendo em meios contendo aminoácidos. (b) GlnR: reprime apenas células crescendo com excesso de nitrogênio e (c) TnrA: ativa ou reprime a transcrição apenas durante crescimento limitado por nitrogênio. GlnR e TnrA provavelmente direcionam as células no sentido de crescimento vegetativo adaptado, mais do que no sentido da esporulação, durante crescimento limitado de nitrogênio. A síntese de enzimas degradativas de aminoácidos geralmente não é regulada em esporos de *Bacillus*. Em esporos germinativos de *B. megaterium* mais de 50% de aminoácidos livres gerados por ação de proteases são degradados, produzindo 10-20 vezes a energia obtida pelo catabolismo do 3-fosfoglicerato, a maior fonte de energia em esporos dormentes.

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. Nesse estudo, os autores também verificaram que a produção da enzima é dependente da presença de aminoácidos.

Rajendhran e colaboradores, 2002, estudaram otimização de um meio de cultivo contendo  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , triptona, extrato de levedura, sacarose e indutor ácido fenil acético, AFA, para produção de PGA por *Bacillus sp.* A otimização foi desenvolvida em duas etapas. A primeira, para determinar o efeito de cada constituinte na produção da enzima e crescimento celular, a segunda para ajustar os níveis desses

constituintes de modo a obter maior rendimento na produção de PGA.  $K_2HPO_4$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  e triptona apresentaram efeito significativamente positivo na concentração de PGA e biomassa, porém,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  exibiu um efeito negativo na produção da enzima. O meio otimizado conduziu a um aumento de duas vezes na produção de PGA em comparação ao meio não otimizado.

Souza, 2003, verificou que a remoção individual de um aminoácido de uma mistura de 18, em meio de cultivo para produção de penicilina G acilase por *Bacillus megaterium* não provocou efeito algum no crescimento do microrganismo e nem na produção da enzima. Os aminoácidos serina, ácido aspártico, ácido glutâmico, treonina, lisina, arginina e alanina eram preferencialmente consumidos pelo microrganismo.

A suplementação do meio de cultivo para *Bacillus* sp contendo  $K_2HPO_4$  (1,0 g/L),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  (0,5 g/L),  $CaCl_2 \cdot H_2O$  (0,05 g/L) e AFA (1,5 g/L) com sacarose (20,0 g/L) e triptona (3,0 g/L) atingiu máxima concentração de enzima,  $10,1 \text{ UI} \cdot \text{mL}^{-1}$ , produção duas vezes maior do que em meio basal. (Rajendhran, *et al.*, 2003).

Yang e colaboradores, 2006, otimizaram a composição do meio de cultivo proposto por Pinotti, *et al.*, 2000, omitindo grupos de aminoácidos. A maior produção de PGA foi alcançada com a omissão do grupo aromático, tirosina, fenilalanina e triptofano.

Pinotti *et al.*, 2006, mostraram que glicerol e glicose reprimem a produção de PGA por *B. megaterium*. Foi concluído que AFA 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%. Verificou-se também um efeito inibitório quando a concentração da solução dos 18 aminoácidos é aumentada.

A utilização de amido na produção de PGA por *Bacillus subtilis* foi investigada por Zhang e colaboradores, 2006. A concentração de enzima aumentou significativamente quando o meio foi suplementado com amido parcialmente hidrolisado, alcançando 546 U/L, enquanto que o amido comum conduziu a 283 U/L.

Cultivos de *Escherichia coli* recombinante utilizando diferentes concentrações de soro de queijo (5,0-10,0 g/L) como única fonte de carbono foram realizados a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido (3-15%). A maior concentração de enzimas, 901 UI/L foi atingida com a combinação de 5,0 g/L de soro de queijo e controle de oxigênio dissolvido em 3% da saturação (De León *et al.*, 2006).

Alguns dos trabalhos acima descritos foram tomados como base para a produção de PGA por *Bacillus megaterium* realizada nesse estudo.

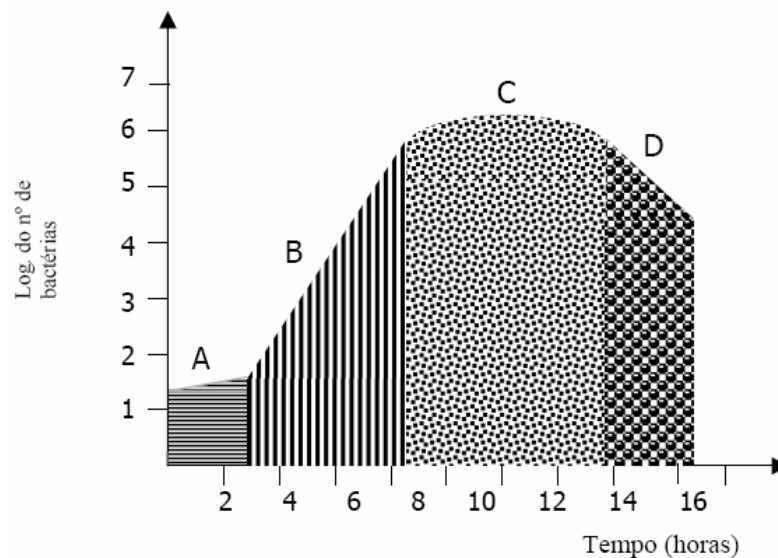
## **2.7. Cinética de Processos Fermentativos**

Microorganismos 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 (Hiss, 2001).

### **2.7.1. Fases do Crescimento Microbiano**

Tanto na natureza como em laboratórios, o crescimento de populações microbianas torna-se limitado, seja pela exaustão de nutrientes disponíveis, seja pelo acúmulo de substâncias tóxicas. Quando um determinado microrganismo é semeado num meio de cultivo de composição adequada e incubado em temperatura e pH apropriados, o seu crescimento segue uma curva definida e característica, tal como a apresentada na Figura 2.6.



**Figura 2.6:** Curva de crescimento típico para cultivo de células em batelada: (A) fase “lag”, (B) fase log, (C) fase estacionária e (D) fase de morte ou declínio celular.

Após a inoculação das células no meio de cultura, há um período no qual pouco ou nenhum crescimento ocorre. Este período é considerado como uma fase de adaptação (A- fase “lag”). Nesta fase a biomassa inoculada se adapta às novas condições químicas e físicas, reorganizando seus constituintes moleculares, sintetizando DNA, novas proteínas e enzimas, que são um pré-requisito para divisão (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. A idade do inóculo tem um forte efeito na duração da fase “lag”, que tende a aumentar com o aumento dessa idade. Em alguns casos há uma idade ótima, que resulta numa fase “lag” mínima. Múltiplas fases “lag” podem ser observadas quando as células são inoculadas num meio com várias fontes de nutrientes. Esse fenômeno é conhecido como efeito diáuxico, onde as células preferencialmente utilizam a fonte de carbono mais facilmente assimilável para então adaptar-se à segunda fonte. Isto ocorre devido à repressão catabólica das enzimas necessárias ao metabolismo do segundo substrato. No fim da fase “lag” a população de microrganismos está bem adaptada ao novo ambiente.

Depois deste período de adaptação, as células se multiplicam 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” (B). Este é um período de crescimento balanceado, no qual as células estão se dividindo a uma taxa geométrica constante até atingir um máximo de crescimento. Os componentes celulares como RNA, proteínas, peso seco e polímeros da parede celular estão também aumentando a uma taxa constante. Como as células na fase exponencial estão se dividindo a uma taxa máxima, elas são muito menores em diâmetro que as células na fase “lag”. A fase de crescimento exponencial normalmente chega ao final devido à depleção de nutrientes essenciais, diminuição de oxigênio em cultura aeróbia ou acúmulo de produtos tóxicos. Assim permite-se concluir que a velocidade de crescimento é proporcional à concentração celular,  $C_x$ . A velocidade de crescimento do microrganismo (Equação. 2.1) é função de  $C_x$  e de  $\mu$ , onde  $\mu$  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,  $S$ . O modelo de Monod propõe uma relação entre a velocidade específica de crescimento celular,  $\mu$ , 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  $S$  é alto. Assim, para altas concentrações de substrato  $S \gg K_s \rightarrow \mu = \mu_{m\acute{a}x} = \text{constante}$ .

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 tempo,  $t$ , obtém-se uma reta, característica do crescimento exponencial.

Valores de  $\mu_{m\acute{a}x}$  variam com o tipo de microrganismo e os valores de  $K_s$  dependem da natureza do substrato.

Seguindo a fase exponencial tem-se a fase estacionária (C), período em que a taxa de crescimento é zero (sem divisão celular) ou a velocidade de crescimento é igual à velocidade de morte. A energia necessária para manter as células na fase estacionária é denominada energia de manutenção e é obtida a partir da degradação de produtos de armazenamento celular, ou seja, glicogênio, amido e lipídeos.

Finalmente na fase de morte (D), as condições se tornam fortemente impróprias para o crescimento, as células se reproduzem mais lentamente e as células mortas aumentam em números elevados. Nesta fase o meio se encontra deficiente em nutrientes e rico em toxinas produzidas pelos próprios microrganismos.

A literatura reporta valores característicos 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<sup>-1</sup> (Blanch e Clark, 1997).

Já para *Bacillus megaterium*, os valores de  $\mu_{\text{máx}}$  alcançam 0,60 h<sup>-1</sup> quando cresceram em meio composto por aminoácidos e soro de queijo e 0,35 h<sup>-1</sup> para meios compostos por caseína hidrolisada enzimaticamente (Silva, 2003).

Uma linhagem de *Achromobacter* sp apresentou  $\mu_{\text{máx}}$  igual a 0,3 h<sup>-1</sup> quando cultivada na presença de extrato de levedura, cloreto de sódio, cloreto de magnésio e indutor ácido fenilacético para produção de acilase com atividade catalítica sobre ampicilina e penicilina G (Plhácková, *et al.*, 2003).

De-León e colaboradores, 2003, observaram que em cultivos com *E. coli* recombinante a máxima atividade enzimática era obtida com  $\mu_{\text{máx}}$  a baixos valores, esses, por sua vez estavam relacionados com limitações na concentração de oxigênio dissolvido. A máxima taxa de crescimento específico e concentração de oxigênio dissolvido foram 0,38 h<sup>-1</sup> e 0,54 %, respectivamente. Em comparação, Li, *et al.*, 1992, reportou valor de 0,50 h<sup>-1</sup> para  $\mu_{\text{máx}}$  a 0,46 % de oxigênio dissolvido.

### 2.7.2. 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, pH e concentração de oxigênio dissolvido (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  $20^{\circ}\text{C}$  e  $50^{\circ}\text{C}$ ) 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  $10^{\circ}\text{C}$ . 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.

A produção da maioria das penicilinas G acilases é frequentemente conduzida a baixas temperaturas, em torno de  $28^{\circ}\text{C}$  (Chou *et al.*, 2000; Sobotkova *et al.*, 1996; Keilmann *et al.*, 1993; Meevootisom e Saunders, 1987). Huang e colaboradores, 2002, demonstraram via expressão heteróloga do gene *pac* de *Providencia rettgeri* em *E. coli* produção de PGA a  $37^{\circ}\text{C}$  com pH da cultura mantido próximo a neutralidade, 6,5-7,5. Essa condição é bastante atrativa do ponto de vista industrial, já que a temperatura ótima de crescimento para células hospedeira de *E. coli* é  $37^{\circ}\text{C}$ , podendo-se reduzir o tempo do processo global em comparação a cultivos em que a temperatura ótima para o crescimento do microrganismo está na faixa de  $28^{\circ}\text{C}$ . Já para a enzima de *Bacillus megaterium*, a temperatura ótima para produção da PGA coincide com a temperatura ótima para crescimento do microrganismo, em torno de  $28-30^{\circ}\text{C}$ , tal como reportado nos trabalhos de Acevedo e Cooney, 1973; Illanes *et al.*, 1994; Senthivel e Pai, 1996 e 1998; Hojo e Hokka, 1996; Pinotti *et al.*, 2000 e 2002; Silva *et al.*, 2006.

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 a 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, fora desta faixa, a fisiologia da célula fica seriamente afetada, prejudicando o desempenho da cultura. 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  $\text{CO}_2$  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.

Publicações sobre a produção de PGA por diferentes microrganismos foram revisadas e todos os trabalhos reportaram processos a pHs iniciais ajustados na faixa de 7,0-

8,0. Na maioria destes, o valor de pH inicial é mantido constante durante todo o cultivo pela adição automática de soluções de hidróxido de sódio.

As condições de operação de um bioprocessamento podem afetar a formação de produtos e subprodutos em processos aeróbios através das rotas metabólicas e mudanças na velocidade das reações intracelulares. Com base nessas interações alguns bioprocessos requerem controle nas taxas de transferência de oxigênio. Similarmente alguns bioprocessos requerem condições controladas de pH, enquanto que outros requerem operações a pHs não controlados, de modo a aumentar a produtividade e seletividade (Çalik, *et al.*, 2003).

Uma das mais importantes variáveis em bioprocessos é a concentração de oxigênio dissolvido, expressa como a porcentagem do valor de saturação a pressão atmosférica. 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 é um elemento essencial para crescimento de microrganismos aeróbios, pois funciona como receptor de hidrogênio e elétrons no mecanismo de respiração para geração de energia. A taxa de respiração é geralmente independente da concentração de oxigênio dissolvido acima de um nível crítico. Abaixo desse nível uma pequena mudança na concentração de oxigênio dissolvido pode causar uma alteração fisiológica significativa no metabolismo celular. 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.

Na produção de metabólitos secundários, os valores ótimos para a concentração de oxigênio dissolvido não devem ser os mesmos que para o crescimento do microrganismo. Segundo Sargantanis e Karim, 1996, condições limitadas de oxigênio aumentam a síntese de produtos secundários. Assim, um controle preciso da concentração de oxigênio dissolvido é requerido em processos fermentativos para investigar as melhores condições para formação de produtos. Métodos típicos de controle de oxigênio dissolvido em fermentações incluem variações da velocidade de agitação ou fluxo de ar. Estas manipulações resultam em variação do coeficiente de transferência de massa  $K_La$  e outras características físicas do sistema tais como taxa de cisalhamento que pode afetar metabolismo microbiano.



Segundo Vojtisek, 1975, a presença de oxigênio dissolvido é um fator de extrema importância na produção de penicilinas acilases, funcionando como repressor quando em altas concentrações. Um ponto ótimo para a concentração de oxigênio dissolvido é em torno de 10% do valor de saturação, onde segundo Visnardi, 1997, a produção de PGA por *Bacillus megaterium* é máxima, sendo que valores acima de 40% ou abaixo de 5% não favorecem a expressão da enzima. De-León e colaboradores, 2003, estudaram o efeito de concentração de oxigênio dissolvido (0-40%) na produção de PGA por *E. coli* recombinante e verificaram que as mais baixas concentrações de oxigênio promoviam maior concentração de enzima, sendo a máxima atividade enzimática obtida a 1% do valor da saturação.

## 2.8. Separação e Purificação de Enzimas

O crescente interesse pelos processos de purificação de biomoléculas deve-se ao desenvolvimento da biotecnologia e à demanda das indústrias farmacêutica e química por produtos com alto grau de pureza. A purificação de biomoléculas exige o emprego de muitas técnicas devendo-se buscar a mais apropriada para cada estágio de separação. A quantidade e tipo de técnicas usadas dependerão da natureza e das características das amostras, assim como do grau de pureza desejado no produto final.

Uma rota típica para recuperação primária de proteínas envolve o uso de operações convencionais de ruptura de células, centrifugação e ultrafiltração. A purificação propriamente dita é atingida à custa de múltiplas etapas de cromatografia.

Vários autores têm estudado a purificação de PGA. Os métodos mais comuns para purificação da enzima são: cromatografia de afinidade (Boccu *et al.*, 1990; Mahajan e Borkar, 1982), cromatografia de pseudo-afinidade (Fonseca e Cabral, 1996; Fitton *et al.*, 2001; Santarelli *et al.*, 2000), cromatografia de interação hidrofóbica (Mahajan e Borkar, 1984; Kasche *et al.*, 1990), e cromatografia por afinidade em metal imobilizado (Fitton e Santarelli, 2001; Liu *et al.*, 2003). No entanto, um “scale-up” desses processos é bastante difícil, pois requer instrumentação complexa, limitando os níveis de produção da enzima e tornando seu custo extremamente alto.

Os processos de separação com membranas destacam-se como alternativas aos processos convencionais de purificação preliminar. Em muitos casos, o baixo consumo de energia, a redução no número de etapas do processamento, maior eficiência na separação e maior qualidade do produto final são seus principais atrativos.

A primeira operação, direcionada no sentido da separação sólido-líquido de caldos fermentados, é a microfiltração. O concentrado retém toda a biomassa e permanecendo no permeado a enzima de interesse, proteínas remanescentes do meio de cultivo, sais e água. A ultrafiltração atua como uma etapa de purificação para o primeiro permeado. A qualidade do permeado assim obtido, determina as operações subseqüentes, e em alguns casos uma segunda ultrafiltração pode ser requerida para concentração do permeado, em geral, soluções muito diluídas com respeito à proteína alvo. Finalmente, a diafiltração, em que o permeado a priori concentrado e submetido a extração do solvente, é continuamente alimentado por solvente com vazão igual a do permeado. Trata-se, de uma operação de lavagem da solução em questão, utilizada quando se deseja purificar um determinado soluto onde os contaminantes são compostos de dimensões menores que as do soluto de interesse. Assim, os contaminantes vão sendo eliminados no permeado enquanto a membrana retém o soluto de interesse. Uma vez alcançada a pureza desejada, interrompe-se a adição de solvente e se necessário pode-se efetuar a concentração do soluto desejado.

São muitos os trabalhos que reportam a utilizam de membranas para purificação de biomoléculas obtidas de caldo fermentativos.

Uma lipase extracelular produzida por *Bacillus thermoleovorans* foi diafiltrada e concentrada em membrana de 50 kDa. A atividade específica foi aumentada em 6 vezes se comparada ao extrato bruto, com uma recuperação de 100% (Ochoa, *et al.*, 2005). Tessier, *et al.*, 2005 estudaram a eficiência de membranas com diferentes “cut-off”, 5, 30 e 100 kDa, na purificação do antibiótico benzil penicilina obtido de cultivos de *Penicillium chrysogenum*. Os resultados mostraram que alta recuperação (89-91%) foi obtida pela ultrafiltração em membranas de 30 e 100 kDa e que a etapa de diafiltração deve ser aplicada durante os procedimentos de ultrafiltração para aumentar a recuperação do antibióticos nos permeados obtidos.

A separação de proteínas em membrana de 50 kDa foi investigada por Gosh e Cui, 2000. Eles verificaram a dependência da purificação com a pressão transmembrana. A 20 kPa, a porcentagem de pureza da proteína foi de aproximadamente 18%, enquanto que a 120 kPa alcançou mais de 89% de purificação. No trabalho de Zhou e colaboradores, 2006, micro e ultrafiltração foram aplicadas na separação de ácido hialurônico de caldos fermentados com dois esquemas de separação: o primeiro usando microfiltração seguida por ultrafiltração com água pura como dialisante, o segundo similar ao primeiro exceto por aplicar o permeado da microfiltração como solução de lavagem no estágio da ultrafiltração. Os dois esquemas promoveram efetiva purificação do ácido hialurônico, com fator de purificação igual a 1000.

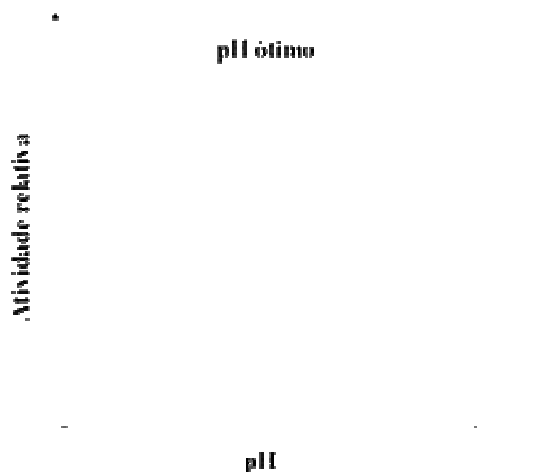
A segunda estratégia parece ser mais eficiente, com rendimento global de 89% contra 77% ao se utilizar água como diafiltrado.

## 2.9. Caracterização de Enzimas

Propriedades como temperatura, pH, concentração de substrato são bastante relevantes quando se deseja aplicar uma determinada enzima numa reação química, pois esses parâmetros podem influenciar significativamente a velocidade de uma reação enzimática, e a maneira mais adequada de se prevenir quanto a essas influências é caracterizar a enzima de acordo com essas propriedades, principalmente porque elas variam conforme a procedência, ou seja, microrganismos diferentes dão origem a enzimas com propriedades diferentes.

### 2.9.1. pH Ótimo

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: (1) afetam o estado iônico dos aminoácidos do sítio catalítico, relevante na catálise e na união com o substrato e (2) modificam a estabilidade da proteína, reduzindo a atividade, podendo até causar desnaturação da enzima caso sejam atingidos valores extremos.



**Figura 2.7:** Efeito do pH na atividade relativa de uma enzima.

A estrutura tri-dimensional da enzima, responsável pela sua atividade catalítica, é estabilizada por pontes de hidrogênio, interação hidrofóbica e uma ponte

dissulfeto, mudanças no pH, alteram a concentração de hidrogênio, alterando 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).

No caso de PGA de *E. coli*, o grupo amino da serina terminal presente na subunidade  $\beta$  é responsável pela atração do próton  $H^+$  do grupo  $OH^-$  presente no resíduo serina. Apenas quando esse próton é atraído que o oxigênio adquire força suficiente para o ataque à ligação amida da Penicilina G, liberando ácido fenil acético e 6-APA (Duggleby, 1995).

Enzimas provenientes de diferentes microrganismos têm sido amplamente estudadas e caracterizadas, contudo as informações sobre a PGA de *Bacillus megaterium* são bastante escassas. Illanes, *et al.*, 1994, verificaram que a enzima produzida por *B. megaterium* apresentava máxima atividade enzimática a pH 8,0, mantendo-se completamente estável na faixa de 7,0 a 8,5, com significativa inativação apenas a pHs acima de 9,5 e abaixo de 5,0.

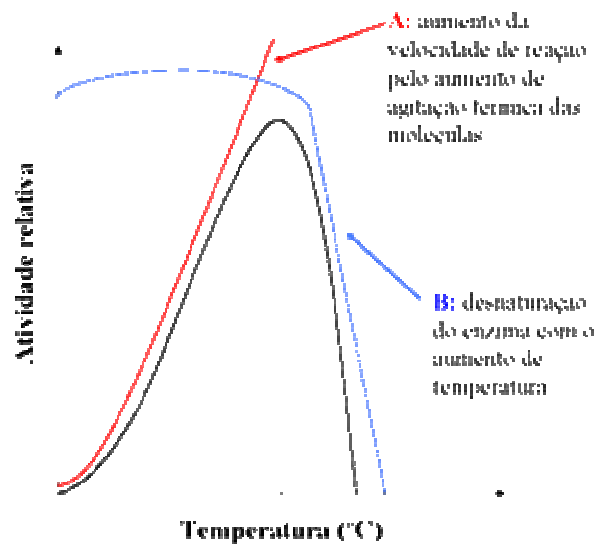
Os valores de pH ótimo para as enzimas de *E. coli* e *B. megaterium* na hidrólise da Penicilina G reportados por Savidge e Cole, 1975, foram 8,2 e 8,5, respectivamente. No entanto, valores ligeiramente mais baixos, tal como 7,8 são frequentemente usados (Shewale e Sivaraman, 1989; Álvaro *et al.*, 1992; Ospina *et al.*, 1992). Enzimas obtidas de duas diferentes linhagens de fungos, *Aspergillus fumigatus* e *Mucor gryseocianum* apresentaram valores ótimos de pH na faixa de 7,0-8,0 e 7,5-8,5. (José *et al.*, 2003). A caracterização de uma acilase proveniente de linhagens de *Achromobacter* sp mostrou máxima atividade catalítica entre pH 7,0 e 8,0. (Plhácková, *et al.*, 2003).

### 2.9.2. Temperatura Ótima

Sabe-se que temperatura é uma medida da energia cinética das moléculas que se movem e vibram constantemente. Uma reação química significa uma ou mais ligações entre essas moléculas. A formação e o rompimento dessas ligações requerem certa energia. Apenas as moléculas que possuem energia suficiente (energia de ativação), podem se transformar em um intermediário estável que precede a sua conversão em produtos. Um

aumento na temperatura se traduz em um grande aumento no número de moléculas “energeticamente capazes”.

Quando uma enzima está presente, os aumentos na temperatura, tal como ocorre com o pH, tem um duplo efeito: (1) aumentam a velocidade de conversão de substrato a produto e (2) aumentam a quantidade de enzima desnaturada, inativação térmica, provocada pelo rompimento de ligações que mantêm a estrutura da enzima.



**Figura 2.8:** 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 2.8, curva B). A temperatura ótima para cada enzima será uma consequência da interação entre estes dois fatores. Obviamente, diferentes enzimas terão diferentes temperaturas ótimas.

As enzimas extracelulares de *Bacillus megaterium* são reportadas na literatura com máxima atividade a 35-45°C (Chiang e Bennett, 1967; Savidge e Cole; Illanes, *et al.*, 1994). Para as PGAs de *E. coli* os valores ótimos de temperatura estão em torno de 37°C (Balasingham, *et al.*, 1972; Shewale e Sivaraman, 1989; Álvaro *et al.*, 1992; Ospina *et al.*,

1992). Enzimas provenientes de linhagens de *Aspergillus fumigatus* e *Mucor gryseocianum* apresentaram máxima atividade a 40°C. (José, *et al.*, 2003). Microrganismos recombinantes, produzem enzimas com atividades catalíticas máximas numa ampla faixa de temperatura, desde 40 a 55°C. (Erarslan *et al.*, 1991; Wen, *et al.*, 2004).

### 2.9.3 Parâmetros Cinéticos - $K_m$ e $V_{máx}$

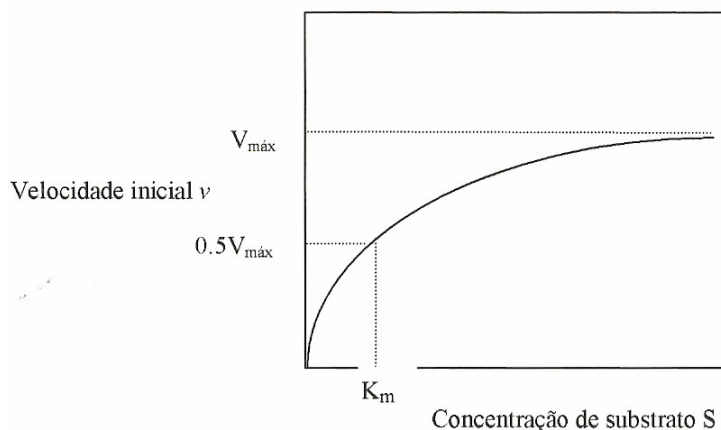
O termo cinética pode ser definido como sendo o estudo da velocidade da reação e como ela sofre alterações em resposta a mudanças nas condições experimentais.

Com respeito à concentração de substrato, um dos fatores que exercem forte influência na velocidade da reação, é geralmente aceito que a maioria das reações enzimáticas seja representada pelo modelo de Michaelis-Menten.

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.

Em uma baixa concentração 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.

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 da reação catalisada por enzima.

A equação que traduz o comportamento da curva de velocidade inicial ( $v_0$ ) em função da concentração de substrato  $[S]$ , 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, temperatura e concentração de substrato.

A Tabela 2.2 apresenta as propriedades cinéticas de penicilinas acilases provenientes de diferentes microrganismos.

**Tabela 2.2:** Propriedades cinéticas de PGAs produzidas por diferentes microrganismos

Microrganismo	T <sub>ótima</sub> (°C)	pH <sub>ótimo</sub>	K <sub>m</sub> (mM)	Referência
<i>Bacillus megaterium</i>	37	8,7	4,5	Savidge e Cole, 1975
<i>Bacillus megaterium</i>	37	8,0	2,0	Illanes, <i>et al.</i> , 1994
<i>Escherichia coli</i>	37	8,0	0,7	Savidge e Cole, 1975
<i>Escherichia coli</i>	37	7,8	1,1	Shewale e Sivaraman, 1989
<i>Kluyvera citrophila</i>	37	8,0	15,0	Álvaro <i>et al.</i> , 1992
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40	7,0-8,0	1,8x10 <sup>-4</sup>	José <i>et al.</i> , 2003
<i>Mucor gryseocianum</i>	40	7,5-8,5	1,5x10 <sup>-4</sup>	José <i>et al.</i> , 2003
<i>K. citrophila</i> em <i>E. coli</i>	55	8,5	0,02	Wen, <i>et al.</i> , 2004

#### 2.10.4. Energia de Ativação

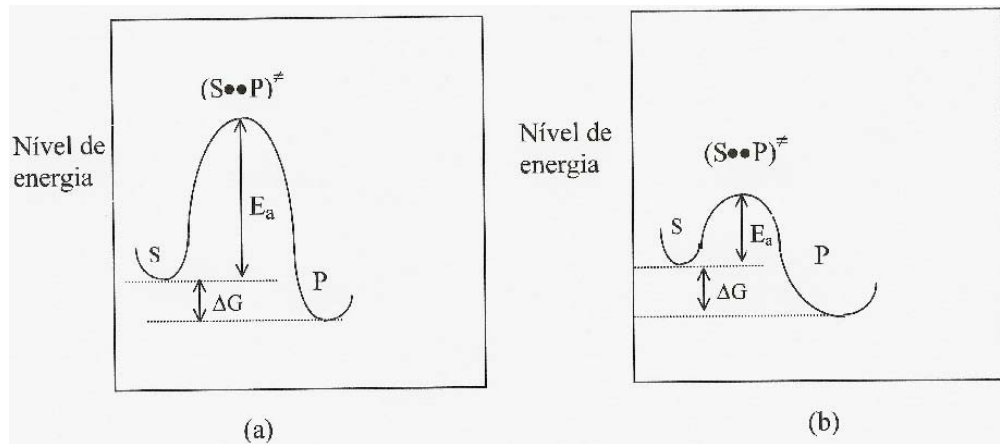
Segundo Bailey, 1986, energia de ativação é a energia mínima necessária para que uma molécula de reagente ou de substrato S alcance o estado de transição S••P<sup>‡</sup> para se tornar uma molécula de produto P.

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

A velocidade da reação S→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<sup>8</sup> a 10<sup>11</sup> vezes mais rapidamente que a mesma reação não catalisada.

As enzimas não afetam o ΔG (energia livre de Gibbs) ou a K<sub>eq</sub> (constante de equilíbrio) de uma reação. Elas simplesmente aceleram a velocidade com a qual a reação alcança o equilíbrio. A Figura 2.10 ilustra a ação de uma enzima na energia de ativação de uma reação.





**Figura 2.10:** Representação esquemática da ação de uma enzima na energia de ativação de uma reação.  $\Delta G$  e  $E_a$  de (a) uma reação não enzimática; (b) uma reação enzimática.

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, 1991).

A literatura reporta os seguintes valores para energia de ativação na hidrólise de penicilina G por penicilina G acilase: 42,48 kJ/mol (Erarslan e Ertan, 1995), 30,24 kJ/mol (Kazan *et al.*, 1997) para enzimas proveniente de *E. coli*, e 33,6 kJ/mol para a de *Micrococcus luteus* (Nam e Ryu, 1979).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os materiais e métodos descritos a seguir referem-se aos ensaios de produção de PGA por *Bacillus megaterium* em câmara rotativa “shaker” e em biorreator; bem como às análises das amostras para acompanhamento das variáveis de interesse na produção da enzima, procedimentos de separação e purificação preliminar da PGA e caracterização da enzima com respeito à temperatura e pH ótimos, estabilidades térmica e alcalina e parâmetros cinéticos ( $V_{máx}$  e  $K_m$ ).

#### **3.1. Microrganismos**

Linhagem de *Bacillus megaterium* ATCC 14945 doada pela Fundação André Tosello – Campinas – SP;

Linhagem de *Bacillus megaterium* de Bary 1884<sup>AL</sup> ATCC 35985 identificada e caracterizada pela Fundação André Tosello.

#### **3.2. Nutrientes**

Diferentes nutrientes foram testados na composição dos meios de cultivo em frascos agitados e em biorreator: soro de queijo em pó (Sigma), soro de queijo “in natura” doado pela Cooperativa de Laticínios São Carlos, indutor fenilacetato de potássio e água de maceração de milho doados pela Prodotti - São Paulo, aminoácidos livres cedidos pela Ajinomoto.

Amido solúvel, caseína, sulfato de amônio, uréia, extrato de levedura, triptona e peptona 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.

Extrato de carne, peptona, cloreto de sódio, bacto-triptona, ágar e glicerol, de variadas marcas comerciais, foram utilizados nas etapas de manutenção e preservação do microrganismo.

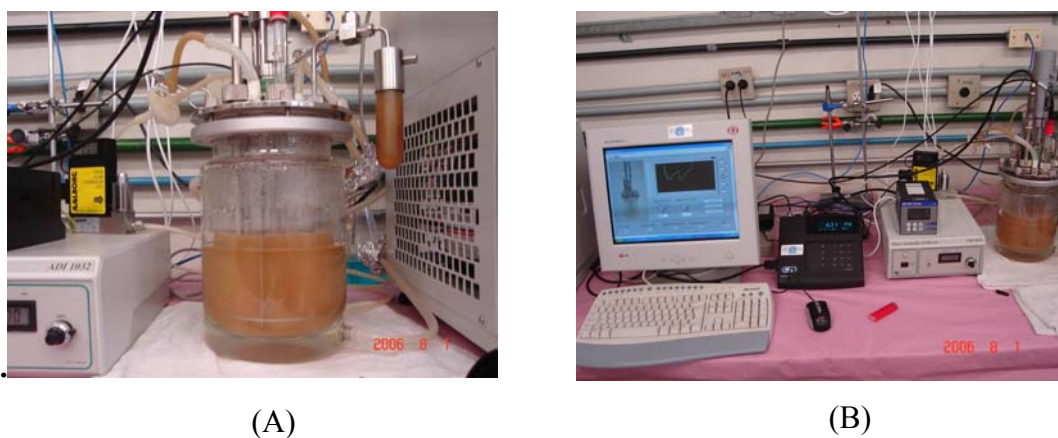
### 3.3. Equipamentos

**Autoclaves:** Na esterilização dos meios de cultura e todo material em contato com os microrganismos foram utilizadas autoclaves da marca FABBE modelo 103, 4000 W e 2000 W.

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

**Câmara rotativa de temperatura controlada – “shaker”:** As etapas de crescimento dos microrganismos e produção da enzima foram realizadas em frascos agitados (erlenmeyers) em mesa rotativa com controle de temperatura e velocidade de agitação, da marca NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC.

**Biorreator tipo tanque agitado:** Ensaios em batelada convencional e alimentada foram realizados em biorreator APPLIKON encamisado com capacidade para 2,0 L acoplado a um sistema de aquisição de dados, apresentado na Figura 3.1.



**Figura 3.1:** Reator Applikon com capacidade para 2,0 L (A); sistema de aquisição de dados (B).

**Centrífuga Refrigerada:** A separação do microrganismo dos caldos fermentados foi realizada em centrífuga refrigerada EPPENDORF, modelo 5403, com capacidade para seis tubos.

**Estufa:** Para secagem de material limpo e incubação de caldos fermentados a 80°C utilizou-se estufa bacteriológica QUALXTRON.

**pHstato:** pHstato Titrino 718, METROHM foi empregado nos ensaios de hidrólise de soro de queijo.

**Banho termostático:** As análises de atividade enzimática foram realizadas em reator de vidro encamisado com capacidade para 50 mL acoplado a um banho termostático BROOKFIELD modelo EX – 200.

**Espectrofotômetro:** Espectrofotômetro PHARMACIA BIOTECH modelo Ultrospec 2000 foi utilizado para acompanhamento de diferentes métodos colorimétricos.

**Incubadora:** Para a incubação de microrganismos em meio sólidos e em placas de 96 poços utilizou-se incubadora MA 415/S MARCONI.

Balança analítica METTLER modelo PB 3002, pHmetro ORION modelo 420 A, demais equipamentos e vidrarias comuns a laboratório foram utilizados na preparação dos meios de cultivo.

### 3.4. Conservação e Preservação do Microrganismo

#### 3.4.1. Armazenamento do Microrganismo em Meio Sólido – “Slants”

As composições dos meios sólidos para manutenção e preservação das linhagens de *Bacillus megaterium* em tubos inclinados – “slants” e frascos de Roux estão descritas na Tabela 3.1. Os microrganismos foram repicados em condições assépticas para “slants”, posteriormente deixados em estufa incubadora com temperatura controlada em 30°C por sete dias, sendo transferidos, conforme a necessidade, ora para frascos de Roux, ora para meios de cultura, por meio da raspagem dos esporos com auxílio de solução salina NaCl 0,9% p/v e alça de platina.

**Tabela 3.1:** Composição do meio sólido para preservação das linhagens de *Bacillus megaterium*

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

### **3.4.2. Armazenamento do Microrganismo em Glicerol 20% v/v – Criotubos**

O preparo dos criotubos inicia-se pela transferência de células dormentes de *B.s megaterium* conservadas em “slants” para frascos de Roux contendo meio sólido descrito anteriormente. Após a passagem dos esporos para os frascos, com o auxílio de alça de platina e solução salina NaCl 0,9% p/v, estes permaneceram incubados por sete dias a 30°C. Ao final desse período, a cada frasco de Roux foram adicionados 10,0 mL da solução salina, para remoção dos esporos, sendo o conteúdo de todos os frascos transferidos para um erlenmeyer contendo solução estéril de glicerol 20% v/v. Volumes de 3,5 mL de suspensão composta pelo meio esporulado e a solução crioprotetora foram acondicionados em criotubos esterilizados e armazenados em ultrafreezer a -70°C.

### **3.4.3. Armazenamento do Microrganismo em Glicerol 8% v/v – “Eppendorfs”**

A conservação da linhagem de *Bacillus megaterium* como células vegetativas consistia em armazenar, em “eppendorfs” estéreis, 900 µL de caldo fermentativo provenientes da cultura de microrganismo, na presença de 100 µL de solução crioprotetora glicerol 80% v/v, armazenando-o imediatamente em ultrafreezer a -70°C.

## **3.6. Composições das Diferentes Soluções Utilizadas na Preparação dos Meios de Crescimento e Produção**

As composições das soluções de aminoácidos totais e preferenciais e solução salina utilizadas na preparação dos meios de crescimento e produção estão apresentadas nas Tabelas 3.2 e 3.3, respectivamente.

Devido aos sais apresentarem concentrações consideravelmente pequenas nos meios de cultura, optou-se por preparar uma solução estoque 10 vezes concentrada, que por sua vez foi convenientemente diluída para compor os meios de crescimento e produção, minimizando, assim, os erros experimentais provenientes das pesagens.

De igual modo, as soluções de aminoácidos livres foram preparadas em concentrações maiores que aquelas que compõem os meios de cultura, sendo adicionados volumes de soluções, correspondentes às concentrações iniciais desejadas nos cultivos.

Tabela 3.2: Composição das soluções de aminoácidos totais e preferenciais.

Aminoácidos		Concentração (g/L)			
		Aminoácidos totais		Aminoácidos preferenciais	
		Solução Estoque	Meios de Cultivo	Solução Estoque	Meios de Cultivo
<b>Alanina</b>	Ala	1,16	0,29	2,86	0,72
<b>Arginina</b>	Arg	1,64	0,41	3,82	0,96
<b>Ácido Aspártico</b>	Asp	2,53	0,63	9,23	2,31
Cisteína	Cys	0,13	0,03	-	-
<b>Ácido Glutâmico</b>	Glu	4,47	1,12	15,91	3,98
Glicina	Gly	0,44	0,11	-	-
Histidina	His	0,98	0,28	-	-
Leucina	Leu	4,18	1,05	-	-
Isoleucina	Ile	2,10	0,53	-	-
<b>Lisina</b>	Lys	3,02	0,76	3,82	0,96
Metionina	Met	2,49	0,63	-	-
Fenilalanina	Phe	2,44	0,61	-	-
Prolina	Pro	4,30	1,08	-	-
<b>Serina</b>	Ser	2,49	0,63	3,34	0,84
<b>Treonina</b>	Thr	1,91	0,48	1,11	0,28
Tirosina	Tyr	1,96	0,49	-	-
Triptofano	Trp	0,53	0,13	-	-
Valina	Val	2,76	0,69	-	-
<b>Total</b>		<b>39,53</b>	<b>9,89</b>	<b>40,09</b>	<b>10,02</b>

**Tabela 3.3:** Composição da solução salina utilizada nos meio de cultivo para produção de PGA

Nutrientes	Concentração (g/L)		
	Solução Estoque	Meio de Crescimento	Meio de Produção
Cloreto de magnésio hexahidratado	3,78	0,189	0,08316
Cloreto de cálcio hexahidratado	3,36	0,168	0,07392
Sulfato de sódio	4,80	0,24	0,1056
Cloreto de ferro hexahidratado	1,30	0,065	0,0286
Cloreto de cobalto hexahidratado	0,10	0,005	0,0022
Cloreto de manganês tetra hidratado	0,09	0,0045	0,00198
Cloreto de cobre dihidratado	0,07	0,0035	0,00154
Molibdato de sódio dihidratado	0,06	0,003	0,00132
Cloreto de zinco	0,006	0,0003	0,000132
<b>Total</b>	<b>13,566</b>	<b>0,678</b>	<b>0,298</b>

### 3.6. Obtenção do Inóculo

A reativação e crescimento do microrganismo foi realizada em erlenmeyers de 500 mL contendo 75 mL do meio de germinação, cujas composições estão descritas na Tabela 3.4. Após adição do microrganismo, os meios de germinação eram mantidos a 30°C e 300 rpm, permanecendo as células de *Bacillus megaterium* ATCC 14945 e ATCC 35985 incubadas por 12 e 24 horas, respectivamente.

**Tabela 3.4:** Composição dos meios de crescimento para germinação de *Bacillus megaterium*.

Nutriente	Concentração (g/L)	
	MC Padrão	MC LB*
Extrato de levedura	-	5,0
Bacto-triptona	-	10,0
Cloreto de sódio	-	5,0
Aminoácidos preferenciais	10,0	-
Solução salina	0,5	-
Soro de queijo em pó	7,0	-

\*Meio Luria-Bertani

A Tabela 3.4 apresenta também a composição do meio LB utilizado na incubação de placas de 96 poços para determinação da relação entre células vegetativas e esporos nos cultivos de *Bacillus megaterium*.

### **3.7. Produção da Enzima em Câmara Rotativa**

A enzima obtida nos cultivos de *B. megaterium* foi produzida 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, que se prolongava por períodos variáveis de 12 a 72 horas. As composições dos meios de produção serão descritas posteriormente nos tópicos referentes a cada ensaio, desenvolvidos com o propósito de estudar a relação do microrganismo com os diferentes nutrientes.

Amostras retiradas em intervalos definidos de tempo foram primeiramente utilizadas para determinação da concentração celular. Aliquotas de 20 mL do caldo de fermentação foram centrifugadas por 20 minutos a 11000 rpm e 4°C, e os sobrenadantes utilizados para a determinação da atividade enzimática e acompanhamento do consumo dos nutrientes.

### **3.8. Produção da Enzima em Biorreator**

A enzima foi obtida pelo cultivo de linhagens de *Bacillus megaterium* em biorreator encamisado, agitado e aerado, com capacidade para 2,0 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 sifonamento 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. Diferentes composições de meio foram também avaliadas e serão descritos nos itens pertinentes a cada ensaio.



### 3.9. Análises das Amostras para Acompanhamento do Crescimento Celular e Produção de PGA por *B. megaterium*

Inicialmente, as amostras retiradas em intervalos definidos de tempo de cultivo eram avaliadas com respeito ao crescimento celular. Em seguida, a análise das amostras para acompanhamento da produção de enzima e consumo dos substratos iniciava-se pela separação do microrganismo do meio de cultura, através de centrifugação a 4°C e 11000 rpm por 20 minutos. Os sobrenadantes obtidos da centrifugação eram utilizados para quantificação da atividade enzimática, determinação da concentração de proteínas, lactose, aminoácidos, fenilacetato de potássio e sulfato de amônia.

#### 3.9.1. Determinação da Concentração Celular

A concentração de células foi acompanhada através de medidas de densidade ótica a 600 nm, das amostras coletadas em caldos fermentativos, convenientemente diluídas (FD) em uma solução salina NaCl 0,8 % p/v, de modo que o valor da absorbância fosse inferior a 0,6. A concentração celular expressa em grama de célula seca por litro, foi determinada pela curva de calibração, equação 3.1, obtida através da relação entre concentração de células secas em função da densidade ótica:

$$C_x (\text{g}_{\text{célula seca/L}}) = (0,3 * D.O_{600\text{nm}}) * F_{\text{diluição}} \quad (3.1)$$

Onde:

$C_x$  = Concentração celular;

$D.O_{600\text{nm}}$  = Densidade ótica a 600 nm;

$F_{\text{diluição}}$  = Fator de diluição.

#### 3.9.2. Contagem de Esporos e células vegetativas – Método TCID<sub>50</sub>

Este método, descrito originalmente por Reed e Muench, 1938, permite determinar um título viral em doses infecciosas 50% em cultura de tecidos (TCID<sub>50</sub>). O TCID<sub>50</sub> é o inverso da diluição da suspensão viral que infecta 50% das culturas de células (diluição limite de 50%). A diluição limite 50% é determinada pela interpolação das frequências cumulativas de respostas positivas e negativas que ocorram numa diluição viral

para a qual se antecipe 50% de respostas positivas e 50% de respostas negativas. Uma vez que este último resultado deverá ocorrer entre as diluições virais em que se observem 100% de resultados negativos e 100% de resultados positivos, é fundamental que se analise uma gama de diluições virais que inclua os resultados extremos (100% de resultados positivos e 100% de resultados negativos).

O método TCID<sub>50</sub> pode ser aplicado à contagem de bactérias, sendo a concentração dada diretamente pelo TCID<sub>50</sub>. Neste caso utilizam-se placas de 96 poços, de acordo com o procedimento seguinte:

1. Preparação das placas de 96 poços (ver exemplo no Anexo 1):
  - a. Colocar em cada um dos poços **a2** a **a?** da linha **a**, 180 µL de meio de cultura apropriado. Neste estudou-se, utilizou o meio líquido LB, cuja composição foi previamente descrita na Tabela 3.4. O número de poços deverá ser igual ao número de diluições preliminares
  - b. Colocar em cada um dos poços **b** a **g** das colunas **1** a **11** 180 µL de meio de cultura apropriado;
2. Preparação das diluições:
  - a. Colocar no poço **a1** a amostra a titular: alíquotas de caldos fermentados retiradas em intervalos definidos de tempo de cultivo;
  - b. Retirar 20 µL do poço **a1** e colocar no poço **a2**. Homogenizar a amostra utilizando a micropipeta;
  - c. Trocar a ponta da micropipeta, e repetir o passo anterior nos poços da linha **a** até uma diluição antes da primeira diluição a colocar nos poços teste.
  - d. Trocar a ponta da micropipeta e retirar 20 µL do último poço das diluições preliminares (**a?**) e colocar no poço **b1**. Homogenizar a amostra utilizando a micropipeta;
  - e. Trocar a ponta da micropipeta, e retirar 20 µL do poço **b1** e colocar no poço **c1**. Homogenizar a amostra utilizando a micropipeta;
  - f. Repetir o passo anterior até concluir todas as diluições requeridas.
3. Inoculação dos poços teste:
  - a. Com uma pipeta multicanal, retirar 10 µL de cada uma das diluições dos poços **b1** a **g1**, e colocar nos poços **b2** a **g2**;
  - b. Repetir o passo anterior e inocular sucessivamente os poços das colunas seguintes

4. Incubação da placa

Incubar a placa pelo período de tempo apropriado, à temperatura ótima de crescimento do microrganismo.

5. Contagem

Contar o número de poços contaminados e não contaminados em cada uma das diluições. Os poços contaminados são normalmente diferenciados dos não contaminados a olho nu desde que o tempo de incubação seja suficiente, visto apresentarem turbidez. Para as amostras de caldos fermentados, as placas permaneceram incubadas por 48 horas a 30°C.

6. Cálculo do título

O TCID<sub>50</sub> é utilizado para determinação do título. Para contagens de bactérias o valor do TCID<sub>50</sub>/mL, corresponde à concentração de células por mL

Em termos matemáticos a diluição limite 50% é dada por:

$$\log_{10}(\text{diluição limite } 50\%) = \log_{10}(\text{diluição imediatamente } > 50\%) + (-PD) \quad (3.2)$$

PD é a distancia proporcional entre as duas diluições em que se esperaria encontrar 50% de respostas positivas. Esta distância é inferida por interpolação linear de acordo com a seguinte fórmula:

$$PD = \frac{((\% \text{ positivos imediatamente } > 50\%) - 50\%)}{((\% \text{ positivos imediatamente } > 50\%) - \% \text{ positivos imediatamente } < 50\%)} \quad (3.3)$$

O recíproco desta diluição corresponde ao título viral em número de doses infecciosas (TCID<sub>50</sub>) por unidade de inóculo.

$$\text{Diluição limite } 50\% = 10^{(\log_{10}(\text{diluição imediatamente } > 50\%) + (-PD))} \quad (3.4)$$

O título viral em termos de TCID<sub>50</sub> é dado por:

$$TCID_{50} = \frac{1}{\text{Diluição limite}_{50\%}} \quad (3.5)$$

Sendo em concentração dada por:

$$TCID_{50} = \frac{I * I}{mL \text{ Diluição limite}_{50\%} V} \quad (3.6)$$

Onde V é o volume de amostra aplicada em cada ensaio (mL).

### 3.9.3. Determinação da Atividade Enzimática – Método PDAB

O método consiste em determinar a atividade amidase da PGA utilizando o reagente p-dimetilamino benzaldeído (PDAB) de acordo com o protocolo proposto por Balashingham *et al.*, 1972. O grupo amino presente no ácido 6-amino penicilânico (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 foi acompanhado espectrofotometricamente em um 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) foi 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 encamisado, com capacidade para 50 mL, com temperatura controlada em 37°C por meio de banho termostatizado, colocou-se um volume conhecido de penicilina G 4% p/v, dissolvida em tampão fosfato 0,1 M e pH 8,0. Ao estabilizar a temperatura, adicionou-se, sob agitação, o caldo enzimático. Tomaram-se alíquotas de 0,5 mL em diferentes tempos de reação, as quais foram adicionadas em cubetas previamente preparadas com o reagente PDAB (0,5 mL de PDAB 0,5% p/v diluído em metanol; 1,0 mL de hidróxido de sódio 0,05 M e 2,0 mL de ácido acético 20% v/v), após reagir por 2,5 minutos, tomava-se a medida da absorbância.

## 3.10. Análise da Presença de Proteases nos Caldos de Fermentação

### 3.10.1. Determinação da Atividade Proteolítica – Técnica do pHstato.

A presença de proteases nos meios de produção foi verificada através da técnica do pHstato, que 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.

A hidrólise foi realizada com 40,0 mL de solução de caseína 40,0 g/L e 4,0 mL do extrato enzimático (caldo fermentativo), por 15 minutos à 50°C e pH 8,0. O controle de pH foi mantido através da adição de uma solução de NaOH 0,03M.

### **3.10.2. Determinação da Atividade Proteolítica – Método Ginther.**

Para algumas condições experimentais foram também avaliadas as atividades proteolíticas pelo método colorimétrico da Azocaseína proposto por Ginther, 1979. Em 250 µL de uma solução 1% p/v de azocaseína em tampão fosfato pH 8,0 e 0,2 M, adicionou-se 150 µL de extrato enzimático, incubando-se a 37°C por 30 minutos. A reação foi paralisada com adição de 1,0 mL de solução de ácido tricloroacético a 10% p/v. Após centrifugação da amostra a 10000 rpm por 10 minutos, adicionou-se 1,4 mL de solução de NaOH 1,0 M a 1,02 mL do sobrenadante obtido. A leitura foi realizada a 440 nm.

Uma unidade é a quantidade de enzima que produz a alteração em uma unidade de absorbância por minuto nas condições do método proposto.

## **3.11. Acompanhamento do Consumo de Substratos**

### **3.11.1 Determinação da Concentração de Lactose – Método DNS**

Maltose e lactose são dissacarídeos que apresentam uma extremidade redutora, assim pode-se acompanhar o consumo de lactose através da dosagem de açúcares redutores pelo método do DNS (Miller, 1959). Nesta análise é necessária a preparação de uma curva de calibração com soluções de Açúcares Redutores de 0,6 a 1,5 g/L.

O reagente foi preparado, mantendo-se num banho à  $\pm 45^\circ \text{C}$ , ou usando bico de Bunsen com muito cuidado, para que não atinja a temperatura de ebulição. Em um becker de  $\pm 400 \text{ mL}$ , dissolveu-se por completo 30 gramas de sal de Rochelle P.A. (tartarato duplo de sódio e potássio) em 50 mL de água destilada. Adicionou-se em seguida 1 grama de 3-5 ácido dinitrosalicílico (DNS) à solução anterior, e com uma bagueta de vidro tentou-se dissolver ao máximo as partículas sólidas. E finalmente adicionou-se 20 mL de solução de NaOH 2 M misturando sempre até completa dissolução dos sólidos presentes.

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

A 1 mL de solução de açúcar redutor, adequadamente diluída adicionou-se 2 mL da solução de DNS. O tubo Follin-wu de 25 mL com esta mistura foi aquecido por 5 minutos em água em ebulição e a seguir resfriado em água gelada, mantendo os tubos tampados com rolhas fendidas. Completou-se o volume do tubo até 25 mL com água destilada, homogeneizou-se bem, e determinou-se a absorvância no espectrofotômetro num comprimento de onda de 540 nm.

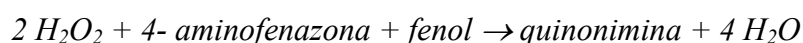
### 3.11.2. Determinação da Concentração de Fenilacetato de Potássio

O consumo de fenilacetato de potássio ao longo das fermentações foi acompanhado através de análise das amostras por cromatografia líquida de afinidade. Como fase estacionária foi utilizada coluna  $C_{18}$  e como fase móvel 35% de acetonitrila e 65% de solução aquosa, composta por 10 mM de  $H_3PO_4$ , 5 mM de  $K_2HPO_4$ , a pH 3,0 e 25°C eluindo a uma vazão de 1,0L/min. A temperatura de separação foi 25°C e a detecção dos picos foi realizada em comprimento de onda de 225 nm.

### 3.11.3. Determinação da Concentração de Glicose – Método Enzimático

O método enzimático para determinação da concentração de glicose é bastante sensível e específico. Gera pouco volume de resíduo e é de baixa complexidade.

O fundamento é simples. Tem-se um reativo de trabalho onde estão as enzimas glicose oxidase e a peroxidase. A glicose foi determinada após a oxidação enzimática na presença de glicose oxidase. O peróxido de hidrogênio formado reagia sob catalise da peroxidase com fenol e 4-aminofenazona originando a quinimina que é um cromógeno vermelho-violeta. A absorção era proporcional à concentração de glicose na amostra.



Adicionava-se 2,0 mL do reativo de trabalho, descrito no protocolo do fabricante, em um tubo de ensaio com 20 µL da amostra contendo glicose, adequadamente diluída, de modo que a concentração de glicose esteja em torno de 3,0 g/L. Incubou-se o tubo por 10 minutos a 37°C. Após a reação, a amostra aparentava um aspecto rosada que tende a se intensificar com a concentração de glicose. A leitura da absorbância era realizada a 505 nm.

#### 3.11.4. Determinação da Concentração de Aminoácidos

A concentração de aminoácidos foi determinada pelo método Pico-tag descrito por Cohen *et al.*, 1989. Esta metodologia baseia-se na separação por cromatografia de fase reversa, utilizando pré-coluna para derivatização das amostras. O reagente de derivatização consistia de uma solução de etanol, trietilamina, fenil-isotiocianato e água na proporção 7:1:1:1. A separação utilizava como eluentes acetato de sódio tri-hidratado a pH 6,4 – fase móvel A e acetonitrila 60% v/v – fase móvel B, eluindo a uma vazão de 1,0 mL/min.

#### 3.11.5. Determinação da Concentração de Proteínas

##### 3.11.5.1. Método de Lowry

As concentrações de proteínas foram avaliadas quantitativamente segundo o método modificado de Lowry (Hartree, 1972).

Este método baseia-se na reação do cobre com a proteína, em meio alcalino, e posteriormente redução do reagente de fosfomolibdato-fosfotungstenato no reagente folin. Quando o reagente folin é adicionado à proteína tratada com o cobre, ocorre a redução do reagente folin que resulta em uma cor mais intensa, com absorção máxima em 660 nm. A concentração de proteínas é determinada através de uma curva padrão previamente construída para a soroalbumina bovina, com concentrações na faixa de 0,2-0,8 g/L.

Em tubos de ensaios, adicionou-se 1 mL de amostra e 5 mL de solução contendo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% p/v em NaOH 0,1 N, CuSO<sub>4</sub> 1% p/v em água destilada e tartarato de sódio potássico 1% p/v em água destilada. Esperava-se 15 minutos e adicionava-se 0,5 mL do reagente Folin Ciocalteau diluído na proporção de 1:2 na hora do uso. Após 30 minutos lia-se a absorbância em espectrofotômetro à 660nm.

### 3.11.5.2. Método de Bradford

Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto massa molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.

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

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

### 3.11.5.3. Distribuição de Massas Moleculares

As concentrações de proteínas e peptídeos foram determinadas via cromatografia por exclusão de tamanho em HPLC Shimadzu utilizando-se coluna Superdex Peptide 10/300 GL:100-7000 Da (GE Biosciences) como fase estacionária e como fase móvel, tampão fosfato sódico 0,02 M pH 7,2, contendo 0,25 M de NaCl, a uma vazão de 0,25 mL/min. O volume de amostras injetado na coluna de peptídeos era de 25  $\mu$ L, sendo a detecção feita no UV a 214 nm.

Para isto foi necessário definir procedimentos de calibração, utilizando padrões adequados, para que se pudesse obter a distribuição mássica de peptídeos para cada amostra considerada, foram injetados cinco padrões (dois peptídeos e 3 proteínas) para que se pudesse relacionar a massa molecular de peptídeos com o tempo de retenção na coluna. A Tabela 3.5 apresenta os padrões utilizados para a calibração do método, com suas respectivas massas moleculares e tempo de retenção na coluna utilizada.



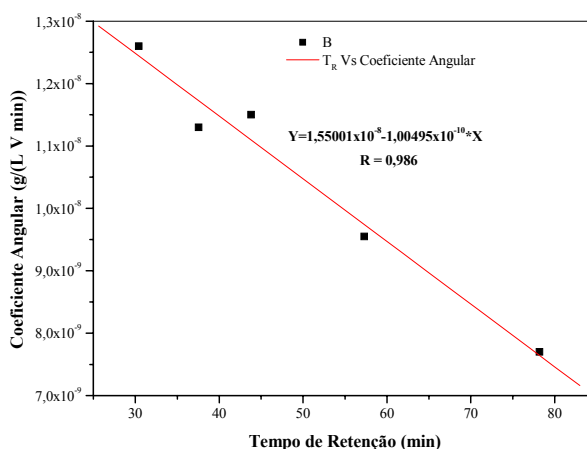
**Tabela 3.5:** Padrões utilizados para a calibração da coluna Superdex Peptide 10/300 GL:100-7000 Da utilizada na distribuição de massas moleculares

Amostra Padrão	Massa Molecular (Da)	Tempo de Retenção (min)
Leucine (peptídeo)	555,6	78,2
Neurotensin (peptídeo)	1672,9	57,3
Insulina	5807,6	43,8
$\alpha$ -Lactalbumina	14146,0	37,6
Soro Albumina Bovina	67000,0	30,4

Estabeleceu-se, em seguida, uma curva de calibração (área versus concentração mássica) para cada um dos padrões. Estes pontos experimentais foram ajustados a uma reta para determinar os coeficientes angulares para cada caso. Logo, foi levantada a curva de tempo de retenção (TR) médio versus coeficientes angulares, mostrada na Figura 3.2, onde foi observando que os pontos se ajustaram a uma reta.

Obteve-se, então, uma equação geral que correlaciona concentração mássica (g/L) à área no cromatograma (volts versus min) em função do tempo de retenção da proteína na coluna.

$$C = (1,55001 \times 10^{-8} - 1,00495 \times 10^{-10} \times \text{tempo}) \times \text{área} \tag{3.7}$$



**Figura 3.2:** Ajuste linear dos coeficientes angulares em função do tempo de retenção médio para cada proteína padrão.

### 3.11.6. Determinação da Concentração de Sulfato de Amônio – Método de Kjeldahl

A concentração de sulfato de amônio presente nas amostras de fermentação foi determinada pelo método de Kjeldahl, seguindo o protocolo estabelecido no boletim técnico da Micronal, 1985. Nesses ensaios utilizava-se uma unidade de destilação de amônia, onde todo nitrogênio presente na amostra era quantificado.

Para a destilação das amostras, em erlenmeyers contendo 100 mL de solução de ácido bórico 2% v/v foram adicionadas 3 gotas de indicador misto, sendo então os erlenmeyers posicionados na unidade de destilação juntamente com os tubos contendo as amostras de interesse. A estes tubos, adicionava-se 30 mL de água destilada e solução de NaOH p/v até que fosse atingida uma coloração marrom escuro. A partir daí, as amostras eram destiladas por um período de sete minutos. Posteriormente, o destilado coletado no erlenmeyer era submetido à etapa de titulação. Nessa etapa, o conteúdo dos erlenmeyers era titulado com HCl padronizado na concentração de 0,1 N. A concentração de sulfato de amônia presente nas amostras era quantificada através da seguinte equação:

$$C_N \text{ (g/L)} = \frac{V_{HCl} * C_{HCl} * 14}{V_{amostra}} \quad (3.8)$$

Onde:

$C_N$  = concentração de nitrogênio total (g/L)

$V_{HCl}$  = volume de ácido gasto na titulação (mL)

$C_{HCl}$  = concentração do ácido usado na titulação (N)

14 = massa molecular do nitrogênio (g/mol)

$V_{amostra}$  = volume da amostra analisada (mL)

### 3.11.7. Determinação de Carboidratos e Ácidos Orgânicos

A presença de carboidratos e ácidos orgânicos foram identificadas por cromatografia líquida de troca iônica utilizando a coluna Aminex HPX-87H da Bio-Rad como fase estacionária e solução de ácido sulfúrico a 5 mM, eluindo a uma vazão de 0,6 mL/min, como fase móvel. A temperatura para separação dos componentes foi de 50°C. A detecção dos ácidos orgânicos foi realizada em detector UV a um comprimento de onda de 210 nm e dos carboidratos em índice de refração.

### 3.12. Preparo de Diferentes Substratos para Composição de Meios de Cultivo

Diferentes composições de nutrientes foram estudadas para otimização dos meios de cultivo, dentre os quais soro de queijo hidrolisado e amido solúvel hidrolisado. Este tópico descreve os procedimentos para hidrólise de ambos os substratos.

#### 3.12.1 Hidrólise do Amido por $\alpha$ -amilase

O procedimento inicia-se pela preparação da solução de amido na concentração de 100 g/L. Suspendeu-se em becker de 1,0 L, 100 g de amido solúvel em 100 mL de água destilada, adicionando-a aos poucos até umedecer o pó e só então adicionar o restante. A essa suspensão, adicionar mais 600 mL de água destilada fervente e 100 mL de solução de NaOH 0,1 M contendo 0,1 M  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , pois o cálcio é requerido para ativação da enzima. Ajustou-se o pH com HCl para 6,5, completou-se o volume para 1,0 L e aqueceu-se a solução até 80°C, sob vigorosa agitação.

A reação de hidrólise inicia-se com a adição de 1,0 mL ou 2,0 mL de  $\alpha$ -amilase BAN 120L. A atividade declarada da enzima é de 120 KNU/g sendo 1 KNU (1000 Unidades Novo) a quantidade de enzima que hidrolisa 5,26 gramas de amido por hora nas condições padrões. Alíquotas foram retiradas a cada minuto nas hidrólises de 5 minutos e em intervalos definidos nas hidrólises de 3 horas para posterior determinação da concentração de glicose. A reação é finalizada com a inativação da enzima pela adição de NaOH até pH 12,0 ou submetendo-se a solução a temperatura de ebulição.

#### 3.12.2. Hidrólise do Soro de Queijo por Tripsina Imobilizada em Quitosana

Tripsina imobilizada em gel de quitosana a uma carga de aproximadamente 60,0  $\text{mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{gel}}$  foi empregada nas hidrólises de soro de queijo. As reações foram realizadas em pHstato a pH 8,0 e 55°C, sendo o pH mantido constante pela adição de NaOH 0,5 M. Foram utilizados 0,4 L do nutriente (71,3 gramas de soro de queijo em pó diluídos em 400 mL de solução salina) e 5,1 gramas de gel. A concentração de proteínas era de aproximadamente 18,0 g/L, resultando numa razão enzima/substrato de 0,04.

As reações prosseguiram por 1 e 10 horas, sendo finalizada pela separação do substrato e enzima por filtração em peneira de aço inox. Os graus de hidrólise (GH) atingiram

3,0% e 6,2%, sendo estimados pelos volumes de soda consumidos para manter o pH constante segundo a relação a seguir:

$$GH = \frac{h}{h_{total}} \times 100\% = B \times N_b \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{MP} \times \frac{1}{h_{total}} \times 100\% \quad (3.9)$$

Onde:  $h_{total}$  = número total de ligações peptídicas no substrato protéico em mmol/g

$h$  = número de ligações peptídicas hidrolisadas;

$B$  = consumo de base em mL;

$N_b$  = normalidade da base;

$\alpha$  = grau de dissociação médio dos grupos  $\alpha$ -NH;

$MP$  = massa de proteína em g;.

Para a utilização de soro de queijo como substrato,  $h_{total}$  recomendado= 8.8 meqv/g proteína (Adler-Nissen, 1986).

### 3.13. Separação e Purificação Preliminar de PGA de *Bacillus megaterium*

A enzima proveniente de caldos fermentativos de cultivo de *Bacillus megaterium* em biorreator foi separada do microrganismo e nutrientes remanescentes seguindo três etapas, a saber: microfiltração, ultrafiltração e diafiltração. A filtração do caldo fermentativo em membranas com curva de corte adequado permitia um pequeno grau de purificação, pois ocorria permeação preferencial das substâncias menores que a enzima. O uso seqüencial da diafiltração garantia uma remoção mais acentuada dessas substâncias, com retenção da proteína. O uso combinado da ultra/diafiltração permitia, pois significativo aumento na pureza do extrato.

#### 3.13.1. Microfiltração

O extrato bruto do meio de cultura contendo além da enzima de interesse, suspensão de células do microrganismo, foi submetido ao processo de microfiltração em membrana de celulose com porosidade de 0,2  $\mu$ m acoplada a unidade de filtração Millipore. A

alimentação do caldo foi feita através de uma bomba conectada ao sistema de filtração, que por sua vez, tinha sua pressão monitorada por um manômetro, devendo esta ser inferior a 1,5 bar. Tanto a porção alimentada (caldo fermentativo) quanto a porção de permeado (caldo livre de microrganismo) foram mantidos em banho de gelo para preservação da atividade catalítica da PGA.

Os procedimentos de limpeza da membrana foram de extrema importância para o bom desempenho do processo de filtração. Logo em seguida à utilização, a membrana era exaustivamente lavada com água destilada para a retirada do material que possa ter aderido à membrana. Após vários volumes de enxágüe com água destilada, deu-se seqüência ao processo de limpeza através de lavagem com solução de hidróxido de sódio 10 mM. Finalizado o processo de limpeza, a membrana era então armazenada a 5°C, em solução de azida sódica 0,1 % p/v. Para cada início de microfiltração a membrana era lavada abundantemente com água destilada, sendo dispensável a limpeza com hidróxido de sódio.

### **3.13.2. Ultrafiltração**

O caldo livre de microrganismos, proveniente da microfiltração, mantido em banho de gelo, foi alimentado ao sistema de filtração, agora equipado com uma membrana de éster de celulose de porosidade igual a 50 kDa.

Como esta etapa tinha por objetivo concentrar o caldo foi estabelecido um fator de concentração volumétrica, representado pela relação entre o volume inicial e final da ultrafiltração. Para todos os casos, o fator de concentração estabelecido foi igual a 10, ou seja, iniciava-se a ultrafiltração com 3,0 L de caldo microfiltrado, e dava-se como encerrado o processo quando se atingia 300 mL de caldo concentrado. Assim como na microfiltração, após o uso, a membrana foi exaustivamente lavada, seguindo o mesmo procedimento de limpeza já descrito em etapa anterior.

### **3.13.3. Diafiltração**

Nesta etapa, utilizou-se o mesmo módulo da ultrafiltração, membrana de porosidade de 50 kDa, diferindo da etapa anterior apenas pela reposição do volume de permeado por igual volume de solução de lavagem: tampão fosfato 10 mM, pH 8,0 ou permeado de soro de queijo “in natura” ultrafiltrado em membrana de 10 kDa. O caldo

ultrafiltrado concentrado mantido em banho de gelo, foi diafiltrado com volumes de lavagem estabelecidos, sempre se retornando ao volume de partida.

### **3.14. Caracterização da PGA de *Bacillus megaterium***

A determinação da temperatura e pH ótimos, bem como do modelo cinético que represente a influência da concentração do substrato é importante para a utilização industrial da enzima e podem variar conforme o substrato utilizado e a origem da enzima a ser caracterizada.

#### **3.14.1. Determinação da Temperatura e pH Ótimos**

Para a avaliação da temperatura ótima, a atividade da PGA foi determinada usando-se penicilina G potássica, PenG, (4% p/v diluída em tampão fosfato 100 mM, pH 8,0) como substrato a diferentes temperaturas de hidrólise (25-60°C).

O valor ótimo para pH foi determinado usando soluções de penG preparadas em diferentes tampões 100 mM: tampão citrato (pHs 5,0 e 6,0); tampão fosfato (pH 7,0 e 8,0) e tampão borato (pHs 9,0 e 10,0). Todas as reações foram processadas a 37°C.

Os valores ótimos de pH e temperatura foram determinados para a enzima solúvel, utilizando para quantificação da atividade enzimática o método espectrofotométrico PDAB, descrito anteriormente.

#### **3.14.2. Estabilidade Térmica e Alcalina da PGA de *Bacillus megaterium***

A enzima foi diluída em tampão borato 100mM, pH 8,0, e sua atividade inicial foi determinada. A seguir, amostras foram armazenadas em frascos plásticos e acondicionadas em banho seco a 60°C, equipamento que possibilita a incubação de amostras em altas temperaturas por períodos prolongados de tempo. Em intervalos determinados, alíquotas foram retiradas e resfriadas para dosagem da atividade residual até total inativação pela temperatura.

A inativação da enzima foi investigada incubando-se o extrato enzimático em tampão bicarbonato sódico 50 mM, pH 11,0 a 25°C. O decaimento da atividade das amostras foi acompanhado através de medidas de atividade enzimática pelo método PDAB das alíquotas retiradas em intervalos de tempo estabelecidos.

### 3.14.3. Determinação dos Parâmetros Cinéticos - $V_{\text{máx}}$ e $K_m$

A influência da concentração de substrato na atividade da PGA de *Bacillus megaterium* foi investigada tomando-se as velocidades iniciais da reação de penicilina G a diferentes concentrações (0,5-10,0 mM), mantendo-se o pH 8,0 e 37°C. A escolha do tempo reacional foi feita de modo que apenas conversões menores que 10% ocorressem. 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-Mentem aos pontos experimentais obtidos do gráfico de velocidades iniciais versus concentrações de penicilina G forneceu os parâmetros  $V_{\text{máx}}$  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 de substrato.

### 3.14.4. Determinação da Energia de Ativação – $E_a$

A energia de ativação foi estimada pela equação de Arrhenius (Equação 3.10).

$$k = k_0 \cdot e^{\frac{E_a}{RT}} \quad (3.10)$$

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

$$E_0 \cdot k = E_0 \cdot k_0 \cdot e^{\frac{E_a}{RT}} \quad (3.11)$$

Aplicando-se logaritmo neperiano:

$$\ln E_0 \cdot k = \ln E_0 \cdot k_0 - \frac{E_a}{R.T} \quad (3.12)$$

Sabendo-se que:  $V_{\text{máx}} = E_0 \cdot k \quad (3.13)$

Tem-se:

$$\ln(V_{m\acute{a}x}) = \ln(V_0) - \left(\frac{E_a}{R}\right) \cdot \left(\frac{1}{T}\right) \quad (3.14)$$

Assim, utilizou-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  $\alpha$ :

$$\alpha = -\frac{E_a}{R} \quad (3.17)$$



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O cultivo de *Bacillus megaterium* para produção extracelular de penicilina G acilase, que vem sendo há tempos estudado pelo grupo de pesquisa do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, tem evoluído muito no que diz respeito à produção da PGA, entenda-se metabolismo do microrganismo e determinação de condições operacionais do processo que conduzam à máxima produção da enzima.

A busca por meios de cultivo mais simplificados e que promovessem maior produção da enzima tem incentivado a continuação deste trabalho e aberto um leque de variáveis a serem estudadas para se alcançar esse objetivo.

A padronização do inóculo, a otimização do meio de cultivo e das condições operacionais dos ensaios em biorreator, em especial temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e forma de alimentação, abrangendo estudo comparativo com uma diferente linhagem do microrganismo, estudos de concentração/purificação da enzima, incluindo pré-tratamentos do soro de queijo para facilitar a recuperação da enzima e, finalmente, caracterização cinética da enzima produzida foram os tópicos fundamentais estudados neste projeto e cujos resultados obtidos serão a seguir apresentados.

Devido ao grande volume de informações, ao final de cada tópico, estão apresentadas as principais conclusões obtidas nos diferentes estudos realizados.

### 4.1. Padronização do Inóculo

O ponto de partida é a padronização do inóculo, estudo que envolveu os seguintes aspectos: 1) variabilidade do inóculo com respeito à produção da enzima e crescimento celular; 2) determinação da estratégia de armazenamento mais adequada para preservação da linhagem de *B. megaterium*; 3) estudo da cinética de crescimento do microrganismo e 4) influência do tempo de inóculo na produção da enzima.

#### 4.1.1. Determinação da Variabilidade do Inóculo

Inicialmente, trabalhou-se com microrganismo conservado como células dormentes (esporos) congeladas em criotubos a  $-70^{\circ}\text{C}$  na presença de solução crioprotetora – glicerol 20% v/v, conforme recomendado por Pinotti *et al.*, 2007 (no prelo). Contudo, a atenuação do inóculo, ou seja, a perda de sua capacidade de síntese e/ou expressão da enzima

destacou-se como um fator relevante para o andamento do trabalho, já que por mais de uma vez fez-se necessária a preparação de um novo lote de criotubos para a continuidade dos estudos.

A Tabela 4.1 mostra a concentração de células e enzima obtidas nos cultivos de *Bacillus megaterium* em ensaios padrão em frascos agitados partindo de microrganismos conservados em dois diferentes lotes de criotubos - Lote I e Lote II, com diferentes inóculos escolhidos aleatoriamente.

**Tabela 4.1:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos após 24 horas de cultivo de *Bacillus megaterium* nos ensaios padrão em cinco replicatas em frascos agitados partindo de diferentes criotubos escolhidos aleatoriamente dos Lotes I e II.

Ensaio		pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	
Lote I	Criotubo A	8,62	3,47	187	
	Criotubo B	8,65	3,83	210	
	Criotubo C	9,27	3,91	222	
	Criotubo D	8,54	3,67	219	
	Criotubo E	8,43	3,72	256	
	Média			3,72	219
	Desvio Padrão			0,17	25
Lote II	Criotubo A	8,63	3,76	509	
	Criotubo B	8,61	3,25	481	
	Criotubo C	9,29	3,54	499	
	Criotubo D	8,58	3,714	536	
	Criotubo E	8,47	3,81	513	
	Média			3,62	508
	Desvio Padrão			0,23	20

Os resultados apresentados na Tabela 4.1 mostram um expressivo aumento na atividade enzimática dos ensaios realizados com criotubos do Lote II, passando de 219 UI/L para 508 UI/L, indicando a seleção natural de uma colônia mais produtora durante a preparação desse novo lote de criotubos. Medidas da atividade enzimática e concentração celular após 24 horas de cultivo mostraram uma variação em torno de 25 UI/L e 0,23 g/L, respectivamente para o Lote I e 20 UI/L e 0,17 g/L para o Lote II. Esses valores foram

adotados como padrão para comparação da viabilidade do microrganismo e produtividade da enzima em diferentes ensaios.

No estudo realizado Pinotti e colaboradores, 2007, foi verificado que após dois anos de armazenamento, esporos congelados em glicerol 10% v/v atenuavam. Os autores recomendaram aumento do glicerol para 20% v/v, mas não acompanharam por quanto tempo o microrganismo seria capaz de produzir a enzima com os níveis iniciais de atividade enzimática.

Decidiu-se, assim, dar continuidade ao trabalho realizado por Pinotti *et al.*, 2007, efetuando um estudo sistemático a fim de comparar a eficiência de três formas de preservação do microrganismo no que diz respeito à reprodutibilidade do inóculo e estabilidade da cultura para expressão da enzima após períodos prolongados de armazenamento.

#### 4.1.2. Estratégias de Conservação/Reativação da Cultura

As linhagens de *Bacillus megaterium* foram conservadas como:

- Células dormentes (endosporos) mantidas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em solução crioprotetora glicerol 20% v/v - “criotubos”;
- Esporos armazenados em meio sólido a  $4^{\circ}\text{C}$  e repicados mensalmente - “slants”;
- Células vegetativas congeladas em ultrafreezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  em glicerol 8% v/v - “eppendorfs”.

Os detalhes da preparação de cada estratégia de conservação foram descritas anteriormente no capítulo 3 – Materiais e Métodos. A avaliação da eficácia dos métodos de preservação do microrganismo baseou-se na manutenção da capacidade de expressão da enzima, ou seja, manutenção nos níveis de atividade enzimática.

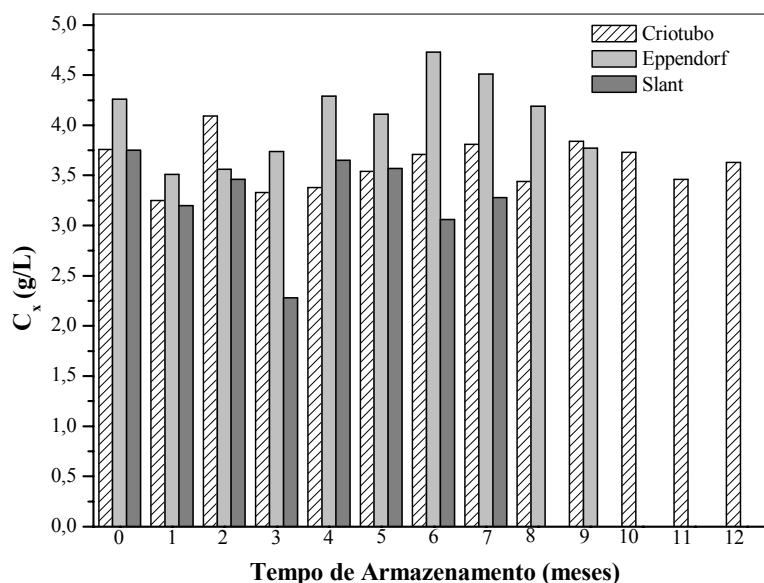
Cada uma das formas de armazenamento foi também caracterizada com respeito à concentração de microrganismos nas formas vegetativas e esporos através da utilização do Método  $\text{TCID}_{50}$  descrito por Reed e Muench, 1938.

A concentração de esporos para criotubos armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  em glicerol 20% v/v se mostrou significativamente superior à de células vegetativas, apresentando para cada mL de suspensão,  $3,07 \times 10^9$  endósporos e  $5,00 \times 10^6$  células vegetativas. Cada um dos ensaios partindo de criotubos realizados mensalmente foi inoculado com células crescidas por 12 horas a  $30^{\circ}\text{C}$  e 300 rpm, cuja concentração celular era da ordem de  $1,53 \pm 0,18$  g/L.

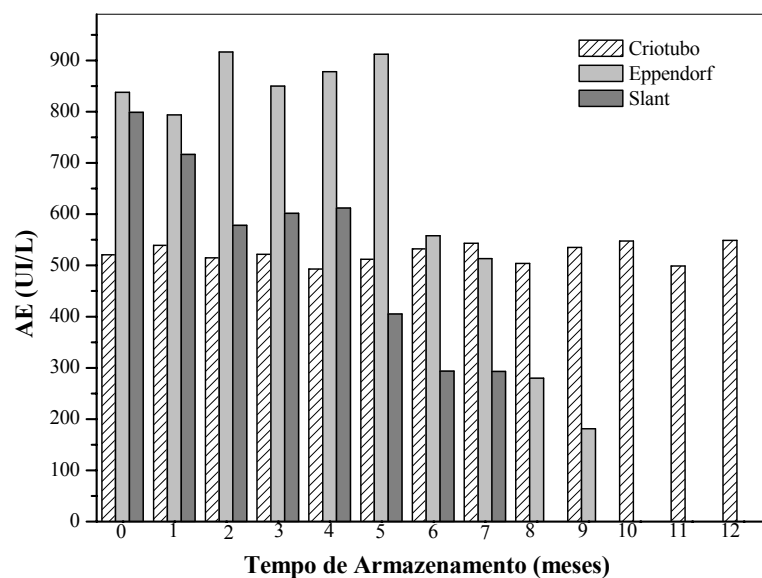
Endoesporos de *B. megaterium* foram também armazenados em meio sólido, mantidos a 4°C (“slant”). Para cada mL da suspensão de células conservadas em “slants”, a concentração de células dormentes e vegetativas estava em torno de  $1,53 \times 10^9$  e  $7,30 \times 10^7$ , respectivamente. A concentração de células após incubação por 12 horas em meio de crescimento era em torno de  $1,22 \pm 0,27$  g/L.

Outra forma de conservação do microrganismo estudada foi o armazenamento de células vegetativas, provenientes de cultivos em frascos agitados, em solução crioprotetora glicerol 8% v/v, congeladas a  $-70^\circ\text{C}$  (“eppendorfs”). O procedimento para contagem de bactérias mostrou a presença maciça de células vegetativas,  $1,01 \times 10^9$  por mL de inóculo, cujo crescimento em meio padrão por 12 horas conduziu a uma concentração celular de  $1,82 \pm 0,23$  g/L.

As Figuras 4.1 e 4.2 mostram, respectivamente, os valores das concentrações de células e enzima ao longo do tempo de armazenamento do microrganismo nas diferentes formas de preservação. Os acompanhamentos individuais para cada uma das estratégias de conservação de *Bacillus megaterium* estão apresentados no Anexo 2.



**Figura 4.1:** Acompanhamento da concentração celular ( $C_x$ ) de *Bacillus megaterium* ao longo do tempo de armazenamento, obtida após 24 horas de cultivo partindo de microrganismos nas diferentes formas de conservação.



**Figura 4.2:** Acompanhamento da atividade enzimática (AE) obtida após 24 horas de cultivo de *Bacillus megaterium* ao longo do tempo de armazenamento do microrganismo nas diferentes formas de conservação.

A observação dos resultados mostra que o tempo de armazenamento da linhagem de *B. megaterium* armazenada como esporos em glicerol 20% v/v a  $-70^{\circ}\text{C}$  não interferiu na produção da enzima obtida em cultivos mensais, sendo a máxima variação para a atividade enzimática de apenas 5%, comparada ao valor inicial, 521 UI/L. Pode-se considerar que as concentrações de enzimas alcançadas nesses cultivos são praticamente constantes, já que ensaios em cinco replicatas mostraram uma variação de  $\pm 20$  UI/L frente a cada inóculo utilizado. Com respeito ao crescimento do microrganismo, todos os cultivos apresentaram concentrações celulares superiores a 3,25 g/L mostrando que células dormentes armazenadas em criotubos a  $-70^{\circ}\text{C}$  é uma forma adequada para preservação e conservação do microrganismo, confirmando resultados anteriores de Pinotti *et al*, 2007 (no prelo).

O crescimento celular nos cultivos com células dormentes conservadas em meio sólido a  $4^{\circ}\text{C}$ , “slants”, alcançou o mesmo patamar que o apresentado nos cultivos com criotubos, com exceção do ensaio realizado com endoesporos armazenados há três meses, onde se verificou uma queda na concentração celular, 2,28 g/L. No entanto, essa desaceleração do crescimento do microrganismo não foi significativa para a produção da enzima, já que se alcançou uma atividade enzimática de 602 UI/L, valor superior ao que se obteve quando a massa de células foi de 3,46 g/L, originando uma concentração de enzimas

de 578 UI/L, o que indica que essa menor concentração celular pode se dever a erro experimental. Quanto ao tempo de armazenamento, pode-se concluir que embora a concentração celular atingida após 24 horas de cultivo tenha se mostrado estável ao longo dos meses, ocorre sistemática e significativa atenuação na produção da enzima com o tempo, observando-se uma perda de mais de 63% da concentração inicial de enzima após sete meses de conservação da linhagem. Conservação do microrganismo como células dormentes em meio sólido (“slants”) não é, portanto, uma estratégia adequada para preservação da expressão de PGA pelo microrganismo.

A conservação do microrganismo como células vegetativas preservadas em glicerol 8% v/v a -70°C conduziu a um aumento na produção da enzima quando comparado aos cultivos iniciais inoculados com endoesporos de *B. megaterium* conservados “slants e criotubos. Isso possivelmente se deve ao fato das células vegetativas já estarem adaptadas ao meio de cultura, num estado metabólico já favorável à expressão da enzima. Contudo, essa alta atividade só se manteve por cinco meses, sendo esse, portanto o tempo máximo para utilização de um mesmo lote de “eppendorfs”. A partir de seis meses de armazenamento observou-se significativa atenuação na produção da enzima, chegando após nove meses a 181 UI/L, quando a concentração de enzima obtida em cinco replicatas de cultivos iniciais era de  $799 \pm 45$  UI/L, tal como apresentado na Tabela 2.1 do Anexo 2.

A estrutura dos esporos é completamente diferente das células vegetativas, apresentando uma morfologia e composição química que lhes conferem resistência às condições pouco propícias ao crescimento vegetativo e uma baixa atividade metabólica. Em condições favoráveis, um esporo desenvolve uma célula vegetativa, num processo chamado de germinação, que ocorre em três estágios.

O primeiro estágio, que é a ativação, usualmente requer algum agente traumático, tais como baixo pH ou calor. O segundo estágio, que é a germinação propriamente dita, requer água e um agente de germinação, como alanina ou certos íons inorgânicos. E, finalmente, o crescimento em meio com nutrientes adequados. A célula agora é uma célula vegetativa e sofre divisão binária (Black, 1966). Apenas nesse estágio é que o microrganismo está apto a acionar o seu mecanismo de síntese e expressão de enzimas, sendo, portanto, necessária, uma fase de adaptação às novas condições nutricionais. Contudo, a conservação das células na forma vegetativa (eppendorfs) torna dispensável a fase de germinação, pois estão armazenadas na presença dos mesmos nutrientes utilizados na fase de crescimento celular e produção da enzima, indicando uma possível razão para as variações nos níveis de atividade enzimática, observadas para os diferentes métodos de conservação. Além disso,

podem já conter alguma molécula sinalizadora necessária para a expressão da enzima que é secretada pela célula durante o estado de transição que antecede à esporulação. Conforme discutido em López e de La Torre, 2005, em experimentos realizados com *Bacillus thuringiensis*, houve indícios de que um fator solúvel secretado pela célula durante o estado de transição (no qual a célula expressa todas as funções disponíveis) bloqueia a esporulação.

Dentre as formas de preservação estudadas, somente células dormentes conservadas em criotubos a  $-70^{\circ}\text{C}$  na presença de solução crioprotetora glicerol 20% v/v mostrou considerável reprodutibilidade do inóculo e manutenção dos níveis de atividade enzimática após cinco meses.

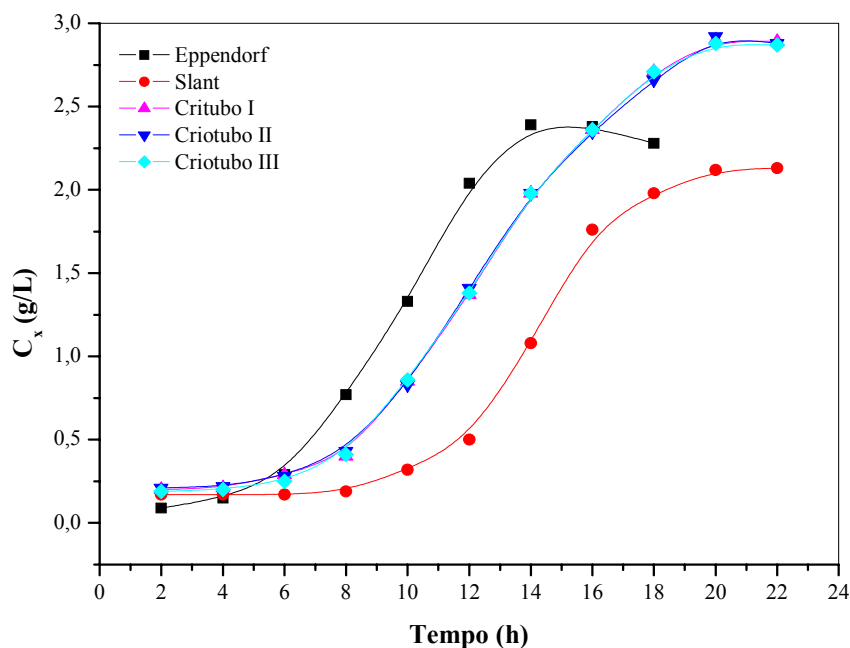
A conservação como células vegetativas congeladas (eppendorff), conduziu a maiores valores de atividade enzimática no cultivo e se mantém estável por cinco meses. Assim, uma vez que as condições operacionais de produção da enzima já forem otimizadas, recomenda-se que se utilize conservação do microrganismo como células vegetativas congeladas, com renovação do estoque a cada cultivo e/ou com utilização de estoque até no máximo em três meses. Conservação como “slants” mostrou grande variabilidade não sendo confiável para estudo da influência de uma variável.

#### **4.1.3. Cinética de Crescimento de *B. megaterium* para Microrganismos Conservados em Diferentes Formas de Preservação**

Foi também avaliada a cinética de crescimento do microrganismo para cada uma das formas de conservação. As concentrações de células nos meios de crescimento incubados com esporos conservados em glicerol 20% v/v a  $-70^{\circ}\text{C}$  (criotubos), em meio sólido a  $4^{\circ}\text{C}$  (slants) e células vegetativas a  $-70^{\circ}\text{C}$  na presença de solução crioprotetora (eppendorfs) foram acompanhadas em intervalos de 2 horas.

Após 12 horas de crescimento a  $30^{\circ}\text{C}$  e 300 rpm, 5,0 mL de cada um dos meios de cultura inoculados com células nas diferentes formas de conservação foram transferidos para frascos agitados contendo 45,0 mL de meios de produção. As concentrações de células e enzima foram obtidas após 24 horas de incubação nos meios de produção.

Os resultados apresentados na Figura 4.3 e Tabela 4.2 mostram diferentes velocidades de crescimento do microrganismo para as diferentes formas de armazenamento: células vegetativas congeladas (eppendorf) > esporos congelados (criotubos) > esporos em geladeira (slant).



**Figura 4.3:** Concentração celular ( $C_x$ ) em função do tempo durante a fase de crescimento (germinação e/ou propagação), no cultivo de *Bacillus megaterium* conservado de três diferentes formas: esporos/glicerol congelados em ultrafreezer (criotubo), células vegetativas/glicerol congeladas em ultrafreezer (eppendorf) e esporos conservados em meio sólido (slant).

**Tabela 4.2:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) após 24 horas de cultivo de *B. megaterium*, e máxima velocidade específica de crescimento ( $\mu_{m\acute{a}x}$ ) para microrganismo conservado sob diferentes formas, com inóculo colhido após 12 horas de germinação e/ou propagação.

Formas de Conservação	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$\mu_{m\acute{a}x}$ ( $h^{-1}$ )
Eppendorf	4,29	588	0,36
Slant	3,95	457	0,26
Criotubo I	4,17	503	0,26
Criotubo II	4,14	516	0,29
Criotubo III	4,14	557	0,29



#### 4.1.4. Estudo da Influência do Tempo de Crescimento Durante a Fase de Germinação e/ou Propagação do Inóculo na Produção de PGA por *B. megaterium*.

Uma vez que os experimentos eram iniciados com inóculos colhidos após 12 horas de crescimento, independente da forma de conservação é evidente que estamos inoculando microrganismos em diferentes fases de crescimento e em diferentes concentrações. Assim, ensaios foram realizados para estudar a influência do tempo de inóculo na produção da enzima com microrganismos armazenados nas diferentes formas de conservação. Células eram colhidas a cada duas horas até 12 horas de cultivo e inoculadas em meio de produção da enzima. As concentrações de células dos inóculos de 2 e 4 horas estavam muito baixas e não foram testadas na fase de produção, as demais estão apresentadas na Tabela 4.3 juntamente com os valores de atividade enzimática e máxima velocidade específica de crescimento determinados entre 6 e 12 horas de cultivo.

Os resultados mostram que para esporos armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  – criotubos, concentrações de inóculo cerca de três vezes maior, comparação entre as células colhidas em 12 e 8 horas de crescimento, atingem-se níveis similares de concentração celular e atividade enzimática. O mesmo comportamento pode ser observado para células vegetativas – eppendorf. No entanto, esporos conservados em meio sólido a  $4^{\circ}\text{C}$ , requerem um tempo de incubação de pelo menos 12 horas, pois a concentração de enzima aumentou gradativamente com o tempo de inóculo.

Como o crescimento das células conservadas em “slant” é mais lento, as células devem necessitar de um tempo maior para entrar na mesma fase de crescimento dos colhidos após 8 horas das células vegetativas e esporos congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$ , cujo crescimento é mais rápido, alcançando velocidades de crescimento específico de 0,44 e  $0,35\text{ h}^{-1}$ , respectivamente.

Outra observação importante é que as máximas atividades enzimáticas foram obtidas quando a concentração celular estava em torno de  $0,50\text{ g/L}$ , mostrando uma concordância para todas as formas de preservação do microrganismo, mas que para cada um dos inóculos, esse crescimento foi atingido após diferentes períodos de incubação no meio de germinação/propagação.

Esses resultados indicam que a padronização do inóculo em 12 horas de cultivo ao invés do acompanhamento da densidade ótica para inoculação em uma absorbância padrão não está afetando a produção da enzima.

**Tabela 4.3:** Influência do tempo de crescimento do inóculo durante a fase de germinação e/ou crescimento do microrganismo, armazenado sob diferentes formas de conservação na produção de PGA por *B. megaterium*.  $C_{x \text{ inóculo}}$  = concentração celular no meio de crescimento após diferentes tempos de incubação,  $C_{x \text{ produção}}$  = concentração de células e (AE) = atividade enzimática após 24 horas de cultivo na fase de produção.

Forma de Conservação	Tempo de incubação (h)	$C_{x \text{ inóculo}}$ (g/L)	$C_{x \text{ produção}}$ (g/L)	AE (UI/L)
Criotubo $\mu_{\text{máx}} = 0,35 \text{ h}^{-1}$	6	0,12	3,88	454
	8	0,23	4,18	508
	10	0,46	4,22	565
	12	0,95	4,11	549
Eppendorf $\mu_{\text{máx}} = 0,44 \text{ h}^{-1}$	6	0,14	3,84	590
	8	0,53	4,01	643
	10	1,30	4,05	641
	12	1,89	4,19	661
Slant $\mu_{\text{máx}} = 0,27 \text{ h}^{-1}$	6	0,10	3,22	286
	8	0,13	3,55	275
	10	0,25	3,51	452
	12	0,49	3,55	626

Lopes-y-Lopes e De La Torre, 2005, realizaram diferentes experimentos em batelada alimentada com diferentes composições de meio, visando aumento da densidade celular e eficiência de esporulação (para produção das proteínas inseticidas). Quando utilizaram meio contendo proteínas submetidas à prévia hidrólise ácida a massa celular chegou a triplicar, mas a eficiência de esporulação reduziu, sem aumento também da expressão da enzima  $\beta$ -galactosidase. Seus resultados mostraram que o estado de transição surgiu mesmo na presença de altas concentrações de nutrientes. Esse estado de transição bloqueia a esporulação e a expressão da proteína inseticida desejada pelos autores. Contudo, a expressão de PGA, tal como a de  $\beta$ -galactosidase deve ocorrer quando se estabelece esse estado. Os autores suspeitaram que o surgimento desse estado metabólico fosse regulado pela densidade celular e pela secreção de alguma molécula sinalizadora para o meio. Fizeram, portanto experimentos adicionando água (controle) ou filtrados de cultivo em batelada de diferentes tempos (3 horas, 5 horas e 7 horas), num experimento similar ao efetuado por nós com o estudo da influência do tempo de inóculo na produção de PGA. Observaram que o

filtrado de 5 horas tinha um efeito agudo, atrasando esporulação, expressão da proteína inseticida, com máxima atividade  $\beta$ -galactosidase 6 horas depois e esporulação 10 horas depois, em relação ao controle. Os autores acreditam que um fator solúvel – oligopeptídeos, por exemplo, seja secretado no estado de transição e reconhecido pelas células ao atingirem certo limiar de concentração, bloqueando a esporulação.

Parece possível que também exista esse fator e que ele pode estar inclusive presente no soro de queijo, nutriente que se revelou ser essencial para a produção de PGA em nossas condições de cultivo, conforme será discutido posteriormente. Isso explicaria a não influência do tempo de crescimento do inóculo no valor máximo de PGA produzida em nossos cultivos.

#### **4.1.5. Conclusões do Item 4.1: Padronização do Inóculo**

A forma de conservação que preserva os níveis de produção da enzima por mais tempo (12 meses) é o congelamento de esporos em glicerol 20% v/v (criotubos), com grande reprodutibilidade. Conservação como “slants” além de mostrar variabilidade ao longo dos meses, apresenta queda acentuada desde o primeiro mês de conservação. Congelamento de células vegetativas conduz a níveis mais altos de produção da enzima, mas preservou atividade apenas durante cinco meses. Se o protocolo de produção da enzima já estiver definido, recomenda-se utilizar microrganismo conservado como células vegetativas congeladas (“eppendorfs”), com renovação de estoque em tempo menor que cinco meses. Para estudo de influência de variáveis, recomenda-se preservação do microrganismo como endoesporos congelados (criotubos).

As velocidades de crescimento dos microrganismos variaram com a forma de conservação, com  $\mu_{\text{máx}}$  “eppendorfs” > “criotubos” > “slant”. A incubação dos meios de produção com células crescidas por 12 horas de germinação e/ou propagação conduzia a diferentes concentrações iniciais de células, além de inoculação do microrganismo em diferentes fases do crescimento. Estudo da influência do tempo de crescimento na produção da enzima mostrou que, para as três formas de conservação estudadas, a utilização de células mantidas em meio de crescimento entre 8 e 12 horas de cultivo conduzia a produções de enzima e concentração do microrganismo similares após 24 horas de produção. O procedimento de inoculação após 12 horas de cultivo, com inoculação de 10% de volume de células no meio de produção, mostrou-se assim um bom critério para padronização do inóculo.

#### 4.2. Estudo do Meio de Cultivo para Produção de PGA por *B. megaterium*

Nos estudos iniciais da produção de PGA no DEQ/UFSCar, Hojo, 1997 e Visnardi, 1997, utilizava-se meio contendo glicose (7,0 g/L) e uma alta concentração de caseína hidrolizada enzimaticamente (50,0 g/L). Berazaín, 1997, substituiu a glicose por soro de queijo, pretendendo utilizar lactose como fonte de carbono, e mantendo a alta concentração de caseína hidrolizada.

Ao longo dos anos que se seguiram nesta pesquisa, verificou-se que: 1) só ocorria produção da enzima quando *B. megaterium* estava consumindo os aminoácidos e pequenos peptídeos presentes no hidrolisado de caseína como fonte de carbono e nitrogênio; 2) na presença de glicose e outras fontes de fácil assimilação ocorre expressivo crescimento, mas não produção de PGA; 3) a produção da enzima aumenta ao se utilizar aminoácidos livres como fonte de carbono e nitrogênio ao invés de caseína hidrolizada; 4) havia consumo inexpressivo de lactose; 5) que a presença de soro de queijo era muito importante (Pinotti *et al.*, 2007).

Foram também realizados vários ensaios utilizando uma mistura de dezoito aminoácidos (simulando a composição de caseína, ver Tabela 3.2 neste trabalho) em batelada e batelada alimentada. Verificou-se que a alimentação de meio com composição similar à inicial permitia prolongar o crescimento do microrganismo, mas não a produção da enzima, que era reprimida pelo acúmulo de um ou mais aminoácidos inibidores (Souza, 2003, Silva *et al.*, 2006). Foi também conclusão dos dois trabalhos, que havia um consumo preferencial de alguns dos 18 aminoácidos e verificou-se que ao substituir esses 18 aminoácidos apenas pelos preferencialmente consumidos: Ala, Asp, Arg, Glu, Lys, Ser e Thr, ocorria produção de níveis similares de PGA.

Esta tese se insere numa linha de pesquisa bastante ampla, sendo na verdade uma continuação do projeto de mestrado finalizado em março de 2003. Uma das vertentes iniciada no mestrado e que foi intensamente investigada neste trabalho foi a utilização de aminoácidos livres como fonte de carbono e nitrogênio na produção da PGA. A partir dos resultados anteriores adotou-se, neste projeto de doutorado, a utilização dos sete aminoácidos consumidos preferencialmente como padrão.

A continuidade do estudo do meio de cultivo pretendeu então não só achar a mínima composição de aminoácidos que conduzisse à máxima produção da enzima, visando simplificação do meio de cultivo, como também a substituição dos aminoácidos livres por

outra fonte complexa que contivesse também aminoácidos e que fosse economicamente mais acessível.

Finalmente, soro de queijo mostrou-se como nutriente essencial ao crescimento do microrganismo e produção da enzima, mas sua presença adicionava ao meio de cultivo cerca de 2,0 g/L de proteínas, o que dificultava os procedimentos de recuperação da enzima. Investiu-se, assim, grande esforço no sentido não só de se entender o papel desse nutriente na produção da PGA, mas também de minimizar o problema criado por ele na recuperação da enzima secretada.

O item 4.2 desta tese abrangeu assim as seguintes etapas: influência de diferentes composições da solução de aminoácidos, estudo de diferentes fontes de carbono e nitrogênio e influência do soro de queijo na produção da enzima.

#### **4.2.1. Estudo de Diferentes Composições da Solução de Aminoácidos na Produção de PGA por *B. megaterium***

Em trabalhos anteriores, Pinotti, *et al.*, 2007, ao substituir caseína hidrolisada enzimaticamente por Alcalase<sup>®</sup> por aminoácidos livres como fonte de carbono e nitrogênio, verificaram que 10,0 g/L era a concentração ótima para a produção da enzima e que 20,0 g/L apresentava um forte efeito inibidor com respeito à atividade, enzimática, com queda em torno de 50% na produção de PGA.

Ao simplificar a composição da solução de aminoácidos, eliminando 11 dos 18 constituintes, poderíamos estar também eliminando algum ou alguns dos aminoácidos responsáveis pelo efeito inibidor na concentração de 20,0 g/L. Assim, o estudo de diferentes composições da solução de aminoácidos inicia-se com a realização de um ensaio contendo sete aminoácidos na concentração total de 20,0 g/L.

Cabe ressaltar que nesses estudos foram utilizados criotubos do Lote II, cujas concentrações de células e enzima estão em torno de  $3,61 \pm 0,23$  g/L e  $508 \pm 20$  UI/L.

**Tabela 4.4:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo em frascos agitados com concentração de aminoácidos total ( $C_{aa}$ ) de 20,0 g/L, partindo de criotubos – Lote II.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	12	7,99	1,74	-
$C_{aa}$ = 20,0 g/L	0	8,03	0,16	0
	24	8,41	4,08	399
	36	8,99	3,64	417
<b>Padrão</b> $C_{aa}$ = 10,0 g/L	0	7,92	0,17	0
	24	8,43	3,81	443

A utilização de 20,0 g/L de aminoácidos conduziu a uma produção de enzima semelhante à obtida em ensaio controle, indicando que um ou mais dos 11 aminoácidos omitidos, nas concentrações utilizadas na solução composta por 18 aminoácidos, seriam responsáveis pela inibição da expressão da PGA. Contudo, não se verificou aumento na atividade enzimática, acompanhando o aumento da concentração de aminoácidos, possivelmente porque ao redistribuir a contribuição dos aminoácidos omitidos nos restantes, algum dos que na concentração de 10,0 g/L não se apresentava como inibidor, ao ter sua concentração aumentada poderia estar atuando, ainda que em menor proporção que a verificada com a utilização dos 18 aminoácidos, com concentrações excessivas de carbono e nitrogênio.

Optou-se, pois, por investigar qual dos aminoácidos presentes poderia estar atuando como inibidor/repressor na produção da enzima através da técnica da omissão individual dos aminoácidos presentes na solução.

A técnica da omissão simples consistia em omitir um dos aminoácidos de cada vez, sendo que a contribuição omitida era redistribuída proporcionalmente aos aminoácidos restantes, de forma a manter a concentração original inalterada, ou seja, sempre totalizando 10,0 g/L. As composições de cada uma dessas soluções, estão descritas na Tabela 3.1 do Anexo 3.

**Tabela 4.5:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados com omissão individual de aminoácidos.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	12	8,23	1,47	-
<b>Padrão</b>	0	8,27	0,12	0
	24	8,78	3,27	486
Omissão de Ala	0	8,23	0,14	0
	24	8,67	3,13	430
Omissão de Arg	0	8,26	0,12	0
	24	8,72	3,48	468
Omissão de Asp	0	8,19	0,13	0
	24	8,58	3,26	326
Omissão de Glu	0	8,13	0,15	0
	24	8,57	3,89	341
Omissão de Lys	0	8,18	0,15	0
	24	8,88	3,18	455
Omissão de Ser	0	8,12	0,14	0
	24	8,72	3,01	401
Omissão de Thr	0	8,15	0,12	0
	24	8,74	3,29	495

A omissão individual de nenhum aminoácido apresentou efeito negativo com respeito à massa celular, sempre alcançando concentrações de células acima de 3,0 g/L. No entanto, as ausências de Asp e Glu, conduziram a uma queda de 30% na atividade enzimática comparando-se com ensaio padrão, sugerindo uma limitação pelas fontes de carbono e nitrogênio, pois esses dois aminoácidos estão presentes em maior concentração no meio de cultivo. Já a omissão de Arg e Lys parece não interferir na produção da PGA, chegando a valores bastante próximos do padrão, levando-se em consideração a variação de  $\pm 20$  UI/L.

A omissão de Thr conduziu a concentração de enzimas superior àquela obtida com a solução padrão, indicando ser esse aminoácido um inibidor na produção da PGA, sendo possível eliminá-lo do meio de cultivo, assim como Arg e Lys.

Para confirmar a exclusão desses aminoácidos, reproduzimos ensaios de omissão individual e combinada.

A Tabela 4.6 apresenta os resultados para os cultivos em frascos agitados com omissão individual e combinada de Arg, Lys e Thr, cujas composições das soluções de aminoácidos estão descritas na Tabela 3.2 do Anexo 3.

**Tabela 4.6:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE) e concentração de aminoácidos totais ( $C_{aa\ total}$ ) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados com omissão individual e combinada dos aminoácidos Arg, Lys e Thr.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{aa\ total}$ (g/L)
Inóculo	12	8,02	1,74	-	-
Padrão	0	7,98	0,16	0	9,45
	24	8,99	3,44	504	2,43
Omissão de Arg	0	8,03	0,14	0	9,51
	24	8,78	3,25	438	2,92
Omissão de Lys	0	7,96	0,17	0	9,50
	24	8,65	3,38	431	2,49
Omissão de Thr	0	8,01	0,15	0	9,49
	24	8,87	3,29	537	2,75
Omissão de Arg e Thr	0	8,03	0,16	0	9,47
	24	8,78	3,47	391	2,93
Omissão de Lys e Thr	0	7,98	0,18	0	9,61
	24	8,59	3,02	473	3,00
Omissão de Arg, Lys e Thr	0	7,97	0,14	0	-
	24	8,62	2,97	405	-

Os resultados apresentados na Tabela 4.6 confirmam que a exclusão de Thr conduziu a níveis de atividade enzimática superiores ao padrão, podendo assim ser eliminada



do meio de cultivo. As omissões de Arg e Lys se mostraram menos irrelevante do que no ensaio anterior, onde se alcançou uma concentração de enzimas em torno de 95% do padrão, e para este último, esse valor diminuiu para 87%.

O consumo de aminoácidos parece ter sido semelhante para todos os ensaios, sempre restando após 24 horas de cultivo concentrações acima de 2,0 g/L decorrentes da presença de Asp e Glu. Os consumos individuais de todos os aminoácidos estão detalhados na Tabela 4.1 do Anexo 4.

Como em todos os ensaios Asp e Glu contribuíam com mais de 60% da composição total, passou-se a investigar variações na solução de aminoácidos com a presença de apenas esses dois componentes.

Segundo Lehninger, 1991, não é necessário que o meio de cultivo forneça todos os aminoácidos, pois existem vias biossintetizantes que levam aos 20 aminoácidos. Por exemplo, a *E. coli* pode sintetizar todos os aminoácidos necessários para a síntese de proteínas, a partir de precursores simples. Em tese, na presença dos ácidos aspártico e glutâmico, não seriam necessários nem os outros cinco aminoácidos para que o microorganismo sintetizasse os demais aminoácidos requeridos à síntese das proteínas.

**Tabela 4.7:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados com diferentes combinações de Asp e Glu.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	12	7,88	1,67	-
<b>Padrão</b> $C_{Asp}=2,3$ g/L $C_{Glu}= 4,0$ g/L	0	7,85	0,17	0
	24	8,50	3,34	499
$C_{Asp}=3,7$ g/L $C_{Glu}= 6,3$ g/L	0	8,03	0,15	0
	24	8,55	2,48	163
$C_{Asp}=6,3$ g/L $C_{Glu}= 3,7$ g/L	0	7,94	0,15	0
	24	8,52	1,94	130
$C_{Asp}=5,0$ g/L $C_{Glu}= 5,0$ g/L	0	7,91	0,14	0
	24	8,76	2,53	147

A primeira das composições de Asp e Glu foi definida de modo a totalizar 10,0 g/L, omitindo-se os demais aminoácidos e redistribuindo proporcionalmente suas concentrações. A segunda composição nada mais é que uma inversão dessas concentrações e a última, uma proporção equivalente entre Asp e Glu.

Todas as combinações testadas foram desfavoráveis à produção da PGA, com máxima atividade enzimática alcançando apenas 33% do valor obtido em ensaio padrão.

Analisando-se a concentração de aminoácidos apresentada na Tabela 4.1 do Anexo 4, nota-se que todos os ensaios apresentavam concentrações de Asp e Glu abaixo de 3,0 e 4,6 g/L, respectivamente, e mesmo assim após 24 horas de cultivo cada um deles apresentava uma concentração remanescente de pelo menos 1,0 g/L. Por sua vez, ao utilizar Asp e Glu nas composições acima descritas, as concentrações seriam superiores àquelas requeridas para crescimento celular e expressão da enzima, conduzindo a efeitos inibitórios.

Uma vez que aproximadamente 50% da concentração de Asp e Glu continuam presentes após 24 horas de cultivo, optou-se por acompanhar o consumo desses e dos demais aminoácidos em composições cujas concentrações iniciais de Asp e Glu foram reduzidas à metade.

Foi investigada a redistribuição proporcional das massas omitidas nos cinco aminoácidos restantes e também sem redistribuí-las na Arg, por ser um forte inibidor, tal como verificado em trabalho anterior quando na presença de concentrações acima daquela utilizada na solução de 10,0 g/L de aminoácidos totais, apresentava um efeito significativamente negativo na produção de PGA.

A eliminação de metade das concentrações de Asp e Glu, sem redistribuí-las aos demais aminoácidos, ou seja, a utilização de 7,0 g/L de aminoácidos totais também foi estudada. A Tabela 3.3 do Anexo 3 descreve as composições dessas soluções e a Tabela 4.8 apresenta os resultados dos ensaios utilizando essas composições.

Os resultados apresentados na Tabela 4.8 confirmam que existe uma concentração excedente de Asp e Glu no meio de cultivo padrão que totaliza mais de 3,5 g/L após 24 horas de cultivo, no entanto, ao reduzi-lá a metade, com redistribuição proporcional aos aminoácidos restantes, a produção da PGA não foi favorecida, alcançando níveis inferiores aos do ensaio padrão, indicando inibição por excesso de algum aminoácidos, possivelmente pela Arg, já que no ensaio em que sua contribuição não foi acrescida com a redistribuição das massas omitidas a concentração de enzimas atingiu 371 UI/L.

No entanto, ao se observar o consumo individual de cada aminoácido, apresentado na Tabela 4.2 do Anexo 4, verifica-se que Arg foi exaurida já nas primeiras 12 horas de cultivo, não sendo, pois, responsável pela inibição.

**Tabela 4.8:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE) e concentração de aminoácidos totais ( $C_{aa\ total}$ ) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados com redução da concentração de Asp e Glu.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{aa\ total}$ (g/L)
Inóculo	12	8,00	1,98	-	-
<b>Padrão</b>	0	7,94	0,19	0	9,67
$C_{Asp}=2,3$ g/L	12	7,95	2,75	334	4,52
$C_{Glu}= 4,0$ g/L	24	8,31	3,66	385	3,82
$C_{aa}= 10,0$ g/L	0	7,93	0,17	0	9,79
$C_{Asp}=1,2$ g/L	12	8,02	3,13	285	2,59
$C_{Glu}= 2,0$ g/L	24	8,36	3,05	303	1,71
$C_{aa}= 10,0$ g/L	0	7,96	0,16	0	9,68
$C_{Asp}=1,2$ g/L	12	7,99	2,89	241	1,64
$C_{Glu}= 2,0$ g/L	24	8,40	3,30	371	1,21
*Arg					
$C_{aa}= 7,0$ g/L	0	7,93	0,17	0	6,59
$C_{Asp}=1,2$ g/L	12	7,99	2,98	395	1,59
$C_{Glu}= 2,0$ g/L	24	8,32	3,27	433	1,22

\*Nesse ensaio as concentrações omitidas de Asp e Glu não foram redistribuídas na Arg.

A redução na concentração total de 10,0 para 7,0 g/L de aminoácidos totais, parece favorecer a produção da enzima, conduzindo a 433 UI/L. Deve-se notar que mesmo ao eliminar 3,0 g/L de Asp e Glu, ao final do cultivo restavam mais de 1,0 g/L desses aminoácidos, evidenciando o excesso nas concentrações desses aminoácidos.

Para confirmar a redução na concentração de aminoácidos de 10,0 para 7,0 g/L, reproduzimos este ensaio com microrganismos crescendo em meio de germinação padrão e também na presença de 7,0 g/L de aminoácidos, tal como o meio de produção.

A omissão de Thr também foi investigada, já que na ausência desse aminoácido a concentração de enzimas, nos ensaios anteriormente realizados, alcançava níveis superiores aos obtidos nos ensaios padrão.

A Tabela 4.9 mostra os valores de concentração celular e atividade enzimática nos cultivos em frascos agitados com as composições de meio de crescimento e produção acima descritos.

**Tabela 4.9:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados com concentração total de aminoácidos igual a 7,0 g/L, inoculados com microrganismo crescendo em meio padrão ou modificado.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo (MC Padrão)	12	7,88	2,00	-
Inóculo (MC Modificado)	12	7,90	2,05	-
MP Padrão	0	8,02	0,19	0
MC Padrão	24	8,66	3,83	569
MP Padrão	0	8,05	0,19	0
MC Modificado	24	8,58	3,82	585
aa= 7,0 g/L	0	8,03	0,20	0
MC Padrão	24	8,86	3,59	555
aa= 7,0 g/L	0	8,07	0,18	0
MC Modificado	24	8,76	3,61	508
aa= 7,0 g/L Sem Thr	0	8,05	0,19	0
MC Padrão	24	8,83	3,24	614
aa= 7,0 g/L Sem Thr	0	8,02	0,18	0
MC Modificado	24	8,80	3,39	616

MC= meio de crescimento e MP = meio de produção

Os resultados confirmam que a redução nas concentrações de Asp e Glu conduziu a níveis de enzima bastante próximos ao padrão.

A solução de aminoácidos modificada também se mostrou adequada para o crescimento do microrganismo alcançando massa celular semelhante ao meio de germinação padrão, 2,0 g/L. Essa semelhança refletiu nos meios de produção, conduzindo a concentrações de enzima similares ao utilizar os diferentes inóculos, em todos os ensaios.

A omissão de Thr, mesmo na presença de 7,0 g/L de aminoácidos totais, mais uma vez se mostrou favorável à produção da PGA, sendo, pois, factível sua eliminação dos meios de cultivo.

Pode-se então concluir que a redução na concentração total de aminoácidos, de 10,0 para 7,0 g/L e a eliminação de Thr é um grande passo para a otimização do meio de cultivo para a produção de PGA por *Bacillus megaterium*.

Estudos anteriores na presença de 18 aminoácidos livres a uma concentração total de 10,0 g/L, mostravam que após 24 horas de cultivo, todos os aminoácidos eram completamente exauridos ou no máximo totalizavam uma concentração em torno de 1,0 g/L (Silva, *et al.*, 2005).

Nessa tese, nenhum dos ensaios utilizando os sete aminoácidos preferencialmente consumidos pelo microrganismo apresentou consumo total de aminoácidos, com concentrações remanescentes sempre superiores a 2,0 g/L. Esse fato nos levou a reavaliar a composição da solução de aminoácidos utilizada nos meios de cultivo e detectamos que as concentrações não conferiam em proporcionalidade com a solução contendo os 18 aminoácidos.

Assim, reformulamos a composição da solução de modo a manter a concentração total em 10,0 g/L, sendo que cada um dos sete aminoácidos presentes tivessem suas massas acrescidas pelas concentrações dos 11 aminoácidos omitidos. Esta composição está descrita detalhadamente na Tabela 3.4 do Anexo 3 e os valores de concentração celular, atividade enzimática e concentração de aminoácidos totais estão apresentados na Tabela 4.10.

A observação dos resultados mostra que nos cultivos padrões, onde se esperava uma atividade enzimática da ordem de  $508 \pm 20$  UI/L, houve uma queda bastante acentuada na produção de PGA, atingindo apenas 283 e 328 UI/L, nos meios incubados respectivamente com células crescendo em meio de germinação padrão e reformulado.

**Tabela 4.10:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE), concentrações de aminoácidos total ( $C_{aa\ total}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados com reformulação da composição de aminoácidos.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{aa\ total}$ (g/L)	$C_{indutor}$ (g/L)
Inóculo (MC Padrão)	12	7,77	0,27	-	-	-
Inóculo (MC Reformulado)	12	7,79	0,89	-	-	-
MP Padrão	0	7,97	0,07	0	9,77	3,41
MC Padrão	24	8,09	3,65	283	2,58	0,00
MP Padrão	0	7,95	0,10	0	9,70	3,39
MC Reformulado	24	8,54	3,36	328	2,17	0,00
MP Reformulado MC Padrão	0	7,98	0,03	0	8,93	3,45
	6	7,87	0,36	33	7,05	3,41
	12	7,69	2,59	41	3,00	3,03
	18	7,96	4,01	161	1,97	2,10
	24	8,25	4,08	350	1,01	0,35
MP Reformulado MC Reformulado	0	7,95	0,10	0	8,56	3,35
	6	7,98	1,34	10	6,03	3,26
	12	8,15	3,28	100	2,45	2,83
	18	8,10	3,59	219	1,77	2,18
	24	8,30	3,68	336	0,76	0,00

As baixas concentrações de células após 12 horas de crescimento na fase de germinação em meios padrão e reformulado, 0,27 e 0,89 g/L, respectivamente, embora tenham conduzido a crescimento celular razoável, parecem ter sido o fator responsável pela baixa produção de PGA, sugerindo uma possível atenuação desse lote de criotubos.

Um novo ensaio padrão foi realizado para avaliar a possível atenuação do microrganismo armazenado nesse lote de criotubos (Lote II), no entanto, medidas de atividade enzimática após 24 horas de cultivo apresentaram valores na ordem de 510 UI/L, indicando que a baixa concentração de enzimas deve estar mais relacionada com algum problema

pontual com o inóculo do que com atenuação da bactéria. De qualquer modo, optou-se por reproduzir esses ensaios com vegetativas conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  (eppendorfs), cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.11.

**Tabela 4.11:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE), concentrações de aminoácidos total ( $C_{aa\ total}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados com composição de aminoácidos reformulada incubados com células vegetativas armazenadas em eppendorfs contendo glicerol 8% v/v.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{aa\ total}$ (g/L)	$C_{indutor}$ (g/L)
Inóculo (MC Padrão)	12	8,03	2,38	-	-	-
Inóculo (MC Reformulado)	12	7,80	1,97	-	-	-
MP Padrão	0	7,94	0,23	0	9,84	3,37
MC Padrão	24	8,60	3,99	655	2,31	0,00
MP Padrão	0	7,98	0,21	0	9,77	3,46
MC Reformulado	24	8,60	4,05	666	2,33	0,00
MP Reformulado MC Padrão	0	7,87	0,26	0	9,03	3,46
	6	7,83	1,28	0	5,73	2,71
	12	8,06	3,48	292	1,91	1,58
	24	8,53	4,02	700	0,66	0,00
MP Reformulado MC Reformulado	0	7,86	0,24	0	8,82	3,39
	6	7,83	1,42	0	5,73	2,57
	12	8,08	3,72	323	1,6	1,95
	24	8,50	3,96	753	0,64	0,00

A nova composição de aminoácidos conduziu a concentrações de enzima na mesma ordem que a composição padrão, considerando-se a variação de  $\pm 45$  UI/L, tanto para células crescidas em meios de germinação padrão quanto no reformulado.

No meio padrão as concentrações de Asp e Glu somadas contribuíam com 63% do total, nesta, somam 40%. Essa diferença pode ser notada no consumo dos aminoácidos que

agora permanecem remanescentes ao final do cultivo a uma concentração de 0,64 g/L, sendo 0,14 g/L de Asp e 0,50 g/L de Glu, valor pelo menos três vezes inferior ao que se observava na composição antiga.

Essa formulação respeita o critério de redistribuição proporcional das massas omitidas de uma solução composta por 18 aminoácidos cujas soma das concentrações totaliza 10,0 g/L, apresentado, pois, um perfil mais aproximado aquele observado em estudos anteriores (Silva, *et al.*, 2005) com respeito ao consumo dos aminoácidos.

#### **4.2.2. Estudo de Diferentes Fontes de Carbono e Nitrogênio na Produção de PGA por *Bacillus megaterium***

Este tópico dedica-se a estudar diferentes fontes de carbono e nitrogênio como alternativa à utilização dos aminoácidos livres na produção da PGA, promovendo concentrações de enzima maior ou pelo menos semelhante à obtida em ensaio padrão, com um custo mais acessível.

Nessa primeira bateria de ensaios, as composições dos meios de produção tomaram por base a concentração da caseína hidrolisada enzimaticamente por Alcalase<sup>®</sup>, utilizada no trabalho de Pinotti, 2003, de modo que cada nutriente contribuísse com uma concentração inicial de proteínas de 51,4 g/L, mantendo-se as concentrações dos demais nutrientes tal qual nos ensaios padrão: soro de queijo (19,6 g/L), sais (0,3 g/L) e indutor fenilacetato de potássio (3,5 g/L). Nesse estudo, foram utilizados criotubos do Lote I, cujas concentrações características de células e enzima estão em torno de  $3,72 \pm 0,17$  g/L e  $219 \pm 25$  UI/L. Os substratos escolhidos foram fontes de carbono e nitrogênio disponíveis em nosso laboratório e comumente utilizadas em cultivos de diferentes microrganismos para a produção de PGA reportada em literatura: triptona, peptona e extrato de levedura.

Outra fonte complexa utilizada foi água de maceração de milho (AMM) amplamente reportada na literatura como substrato para produção de PGA (Savidge e Cole, 1975; Sobotková, *et al.*, 1996; Shewale *et al.*, 1997; Parmar *et al.*, 2000). A concentração deste nutriente foi baseada na contribuição de nitrogênio (17%) presente em 10,0 g/L de aminoácidos. Considerando-se que AMM contém 3,5% de nitrogênio em sua composição, tal como descrito por Calderbank e Moo Young, 1959 (Tabela 3.5 do Anexo 3), a concentração desse substrato no meio de cultura foi de 47,0 g/L.

A Tabela 4.12 apresenta além dos valores de pH, concentração celular, atividade enzimática e o conteúdo protéico para cada um dos nutrientes utilizado no cultivo de



*B. megaterium* para produção de PGA, determinados através de dosagem do nitrogênio total pelo método de Kjeldahl.

**Tabela 4.12:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE) e concentração de proteínas (medida por Lowry) obtidos no cultivo de *B. megaterium* utilizando diferentes fontes de nitrogênio com concentrações baseadas na caseína hidrolisada enzimaticamente com Alcalase®.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{\text{proteínas}}$ (g/L)
Inóculo	12	7,98	2,16	-	-
Padrão	0	7,86	0,21	0	-
	24	8,66	3,46	178	-
Caseína (51,4 g/L)	0	8,22	0,19	0	39,5
	24	8,22	3,20	67	34,7
	48	9,00	3,34	11	26,2
Peptona (58,4 g/L) (62,5% proteína)	0	7,82	0,17	0	33,0
	24	8,41	2,54	50	30,4
	48	9,08	2,45	55	21,7
Tryptona (62,3 g/L) (80,0% proteína)	0	7,99	0,19	0	33,4
	24	8,30	3,40	73	31,0
	48	9,04	2,38	59	24,6
Extrato de Levedura (82,2 g/L) (88,1% proteína)	0	7,78	0,17	0	24,4
	24	8,46	2,30	0	24,2
	48	9,03	2,29	35	22,5
Água de maceração de milho (47,0 g/L)	0	7,53	0,22	0	-
	12	7,89	1,59	0	-
	24	8,43	1,95	74	-
	48	9,28	2,03	18	-

O uso de fontes de nitrogênio protéicas não favoreceu o crescimento do microrganismo e produção da enzima, obtendo-se valores para concentração celular e atividade enzimática inferiores aos do ensaio padrão. O baixo consumo de proteínas sugere uma repressão na produção de PGA provocada pelo excesso de nitrogênio.

O uso de água de maceração de milho parece conduzir a resultados semelhantes aos obtidos com os demais nutrientes, com máxima atividade enzimática de 74 UI/L, em 24 horas de cultivo.

Ensaio utilizando extrato de levedura parece requerer um tempo de cultivo mais prolongado, já que somente após 48 horas, o microrganismo começou a expressar PGA, estando ainda em fase de crescimento, tal como pode ser verificado pela concentração celular que em 24 horas era de 2,3 g/L, permanecendo assim até o final do cultivo. A utilização de extrato de levedura na maioria dos estudos de produção de PGA reportados em literatura (When, *et al.*, 2004; De Leon, *et al.*, 2006; Cheng, *et al.*, 2007) e a presença de 27% de aminoácidos em sua composição nos motivou a realizar novos ensaios utilizando concentrações menores desse nutriente (10,0–40,0 g/L).

#### **4.2.2.1. Influência da Concentração de Extrato de Levedura**

O uso de extrato de levedura como fonte de nitrogênio conduziu a aumento pronunciado da concentração celular e prolongamento da fase exponencial de crescimento do microrganismo para as concentrações de 20,0-40,0 g/L, mas não se observou aumento na expressão da enzima, comparando-se com o meio padrão de aminoácidos, resultados apresentados na Tabela 4.13. Possivelmente, deve ter ocorrido repressão da síntese da enzima provocada pela presença marcante de carboidratos na composição do extrato de levedura, 11% de seu conteúdo.

Ao contrário do que se pode observar nos ensaios com as maiores concentrações de extrato de levedura, quando se utilizou 10,0 g/L, não houve um decréscimo significativo na produção de PGA, mantendo-se os níveis de atividade enzimática praticamente constante até o final do cultivo, com máxima concentração de enzimas alcançando 146 UI/L, 66% do valor obtido em ensaio padrão.

Outra observação a se considerar é que a máxima produção da enzima não coincidiu com a máxima concentração de células, sugerindo que condições muito favoráveis ao crescimento celular, ou seja, nutrientes de fácil assimilação pelo microrganismo, reprimam a síntese da PGA.

**Tabela 4.13:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos de cultivo de *B. megaterium* utilizando extrato de levedura a diferentes concentrações.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	12	8,03	1,71	-
Padrão	0	7,96	0,15	0
	24	8,64	3,488	221
Extrato de levedura (10,0 g/L)	0	7,47	0,18	0
	24	8,63	4,27	35
	36	9,02	4,66	146
	48	9,31	4,38	138
	60	9,38	4,25	129
Extrato de levedura (20,0 g/L)	0	7,69	0,15	0
	24	8,44	5,35	45
	36	9,16	5,16	53
	48	9,27	5,67	70
	60	9,38	5,38	67
Extrato de levedura (30,0 g/L)	0	7,68	0,16	0
	24	8,55	5,25	53
	36	8,76	6,18	55
	48	9,03	5,92	50
	60	9,24	6,04	38
Extrato de levedura (40,0 g/L)	0	7,89	0,16	0
	24	8,66	5,36	21
	36	8,57	6,08	21
	48	9,13	6,23	14
	60	9,35	5,46	13

Ao investigar a influência da concentração de extrato de levedura no cultivo de *Bacillus* sp para produção da enzima  $\alpha$ -amilase, Santos e Martins, 2003, verificaram que existe uma concentração ótima, entre 2,0 e 5,0 g/L, acima da qual se observa um forte efeito repressor na produção da enzima. Assim, optou-se por testar essa faixa de concentrações e reproduzir o ensaio utilizando extrato de levedura a 10,0 g/L, contudo, com microrganismos

crescendo na presença de aminoácidos livres, tal como o inóculo que deu origem ao ensaio padrão.

Realizou-se também um ensaio em pulso, que consistia em suplementar o meio com uma concentração de 5,0 g/L de extrato de levedura. Foi escolhido o tempo de 36 horas para a alimentação, pois após esse período, no ensaio com 10,0 g/L de extrato de levedura, tanto a concentração de células quanto de enzimas já tinham atingido seus máximos e mantinham-se praticamente constantes até o final do cultivo. A Tabela 4.14 apresenta os resultados dos cultivos utilizando concentrações de extrato de levedura na faixa de 2,5-10,0 g/L.

**Tabela 4.14:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) no cultivo de *B. megaterium* para produção de PGA em diferentes concentrações de extrato de levedura.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	12	7,98	1,91	-
Padrão	0	7,96	0,20	0
	24	8,45	3,36	206
Extrato de levedura (2,5 g/L)	0	7,48	0,21	0
	12	7,82	1,38	46
	24	8,84	2,83	77
	36	8,91	2,64	83
Extrato de levedura (5,0 g/L)	0	7,35	0,20	0
	12	8,06	1,42	28
	24	8,87	3,56	72
	36	9,18	3,58	66
Extrato de levedura (5,0 g/L) Pulso em 36 h	48	8,82	3,74	66
	60	9,15	3,92	84
	72	9,23	3,58	64
Extrato de levedura (10,0 g/L)	0	7,57	0,24	0
	12	8,13	3,64	44
	24	8,28	5,07	147
	36	9,12	4,48	123

Assim como nos ensaios anteriores, o crescimento do microrganismo se mostrou associado à concentração de extrato de levedura, com maiores concentrações desse nutriente conduzindo a maiores níveis de massa celular. Para todos os casos, máxima concentração de células aconteceu após 24 horas de cultivo, mantendo-se nesse patamar ao longo do processo fermentativo.

A repetição do ensaio com 10,0 g/L de extrato de levedura confirmou ser esta a concentração ótima para a produção de PGA, atingindo uma atividade enzimática de 147 UI/L, 71% do valor obtido em ensaio padrão.

As menores concentrações de extrato de levedura, 2,5 e 5,0 g/L, conduziram a atividades enzimáticas 40% do padrão, 82 UI/L, sendo que para 5,0 g/L esse nível de PGA só foi atingido após a suplementação do meio.

A adição de 5,0 g/L extrato de levedura em 36 horas permitiu uma leve retomada no crescimento celular e mesmo na atividade enzimática, sugerindo que estratégias de alimentação seriam uma alternativa para prolongamento da fase exponencial de crescimento do microrganismo com produção associada de enzima. Essas observações nos levaram à realização de ensaios em biorreator, onde se pode ter um melhor entendimento do comportamento do microrganismo frente às variações na concentração do substrato.

Foram realizados dois ensaios em biorreator: 1) batelada convencional com 10,0 g/L de extrato de levedura; e 2) batelada alimentada, com pulso de 5,0 g/L de extrato de levedura após 24 horas de cultivo. Ensaios em frascos agitados nas mesmas condições do biorreator e um ensaio padrão foram realizados simultaneamente, para controle da viabilidade do microrganismo.

Cabe ressaltar que no decorrer do desenvolvimento desse trabalho, um estudo em paralelo de acompanhamento das formas de conservação e manutenção do microrganismo vinha sendo realizado e revelou uma produção de enzima significativamente mais expressiva, alcançando  $799 \pm 45$  UI/L, ao se utilizar como inóculo células vegetativas preservadas em glicerol 8% v/v a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Como o objetivo deste trabalho é maximizar a produção da enzima, optou-se por utilizar esse microrganismo nos ensaios em biorreator.

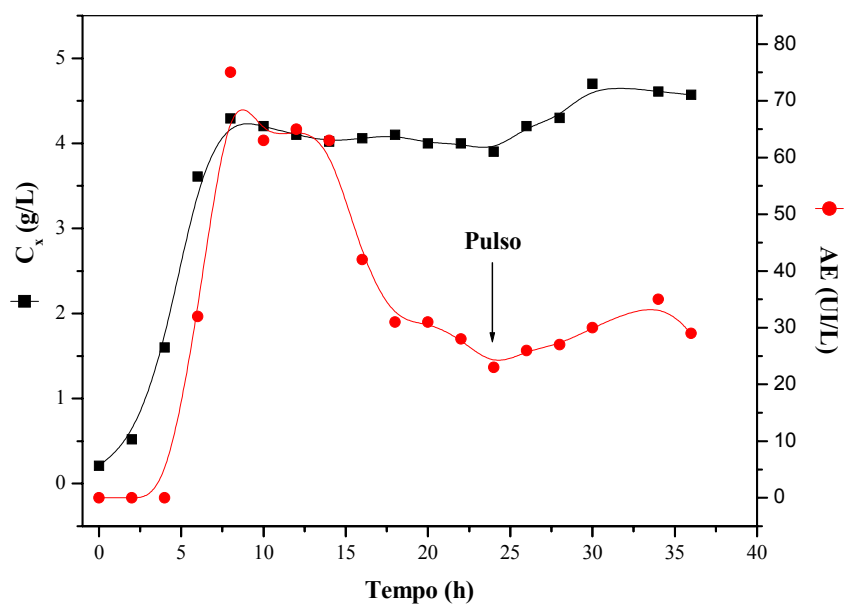
**Tabela 4.15:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) no cultivo de *B. megaterium* para produção de PGA com diferentes concentrações de extrato de levedura em frascos agitados partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Pré-inóculo	12	7,97	1,32	-
Inóculo	12	8,33	2,00	-
Padrão	0	8,14	0,18	0
	24	8,87	3,74	850
Extrato de levedura (5,0 g/L)	0	8,26	0,18	0
	12	8,45	3,63	36
	24	9,21	3,72	41
	36	9,33	3,28	86
Extrato de levedura (5,0 g/L) Pulso em 24 h	24	8,56	4,11	97
	36	9,07	4,46	93
Extrato de levedura (10,0 g/L)	0	7,94	0,15	0
	12	8,18	4,37	37
	24	9,12	5,12	77
	36	9,33	4,68	102

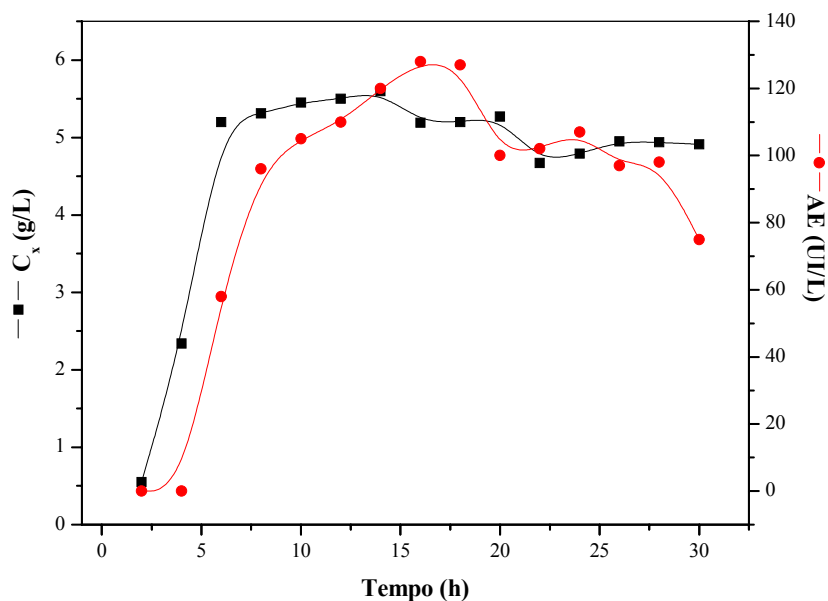
Observa-se pelos resultados apresentados na Tabela 4.15 que a nova cepa de microrganismos, armazenados como células vegetativas em solução crioprotetora, embora tenha conduzido a altos níveis de atividade enzimática (850 UI/L) em cultivos contendo aminoácidos livres como fonte de carbono e nitrogênio (ensaio padrão), na presença de extrato de levedura atingiu apenas 12% da concentração de enzima, em torno de 100 UI/L, obtida em ensaio controle. Parece que o microrganismo conservado na forma vegetativa, ao mesmo tempo em que se torna melhor produtor da enzima, se torna também mais sensível ao efeito repressor dos carboidratos do extrato de levedura que os conservados como esporos.

As Figuras 4.4 (A) e (B) mostram os resultados obtidos nos cultivos de *B. megaterium* para produção de PGA na presença de extrato de levedura a 5,0 e 10,0 g/L, respectivamente, com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da

saturação durante todo cultivo, temperatura de 30°C, pH inicial 8,0 e vazão de ar 2,0 L/minuto (21,1°C e 1 atm).



(A)



(B)

**Figura 4.4:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo de *B. megaterium* em biorreator partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a -70°C: (A) concentração de extrato de levedura= 5,0 g/L e (B) concentração de extrato de levedura= 10,0 g/L.

Ensaio realizado em biorreator contendo 5,0 g/L de extrato de levedura apresentou um pico de concentração celular, 4,3 g/L, em 8 horas de cultivo. Após esse período, observou-se uma ligeira queda na concentração de células, permanecendo em torno de 4,0 g/L até a suplementação do meio em 24 horas, onde se pode observar uma retomada no crescimento do microrganismo, atingindo máxima concentração de células (4,70 g/L) em 30 horas de cultivo. Contudo, esse comportamento não foi observado para a produção da enzima, que atingiu máxima atividade enzimática, 75 UI/L, também em 8 horas, apresentando um decréscimo mesmo após o pulso de alimentação.

A suplementação do cultivo logo que o crescimento celular atingisse a fase estacionária seria uma melhor estratégia de alimentação, pois permitiria prolongamento dessa fase de crescimento, onde ocorre a expressão da enzima.

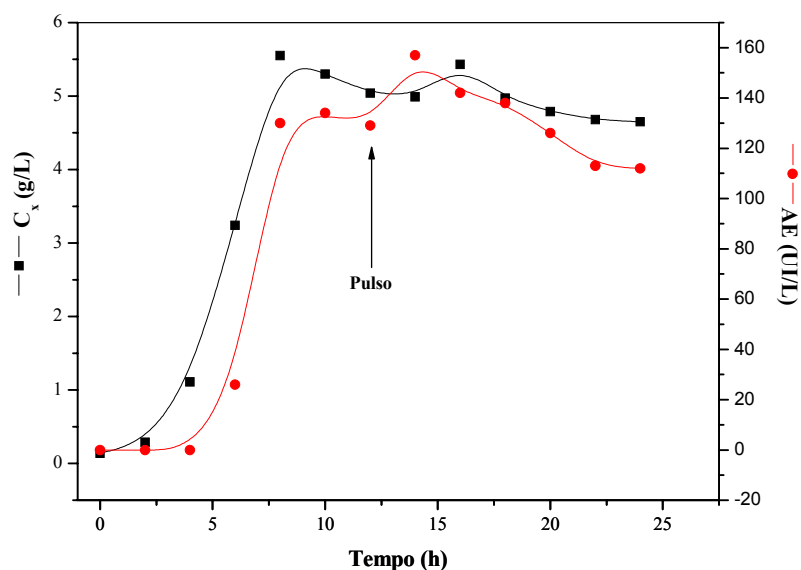
Análises para determinação da concentração de aminoácidos mostraram que após 8 horas de cultivo todos os aminoácidos já tinham sido completamente consumidos, indicando que a expressão da enzima está diretamente ligada a esse nutriente. Contudo, mesmo com a retomada no crescimento celular após a suplementação do meio, a síntese da enzima continuou reprimida.

Para o ensaio com 10,0 g/L de extrato de levedura, observa-se que a máxima concentração de células, 5,6 g/L e de enzima, 128 UI/L foram significativamente maiores e tiveram atraso em relação aos valores máximos em pelo menos 4 horas quando comparadas ao ensaio com extrato de levedura a 5,0 g/L.

O consumo de aminoácidos foi mais lento, com exaustão após 12 horas de cultivo, momento em que ocorre a máxima produção de enzima, permanecendo nesse patamar até o fim do cultivo. Novamente, a presença de carboidratos favorece o crescimento celular, mas reprime a síntese da PGA. Os valores inferiores de atividade enzimática para os cultivos com extrato de levedura em biorreator comparados com o ensaio padrão foram mais influenciados pelo microrganismo do que pelas diferentes concentrações desse nutriente, já que a cepa utilizada nos cultivos é resultado de um microrganismo armazenado e conservado na forma de células vegetativas em meio de cultura em que já estava adaptado.

Foram, pois, realizados novos ensaios em biorreator, contudo inoculados com células armazenadas como esporos em glicerol 20% v/v a  $-70^{\circ}\text{C}$  (criotubos – Lote II), cuja concentração de enzima esperada era da ordem de  $508 \pm 20$  UI/L. A Figura 4.5 e Tabela 4.16 mostram os resultados dos cultivos em frascos agitados e biorreator com 10,0 g/L de extrato de levedura.





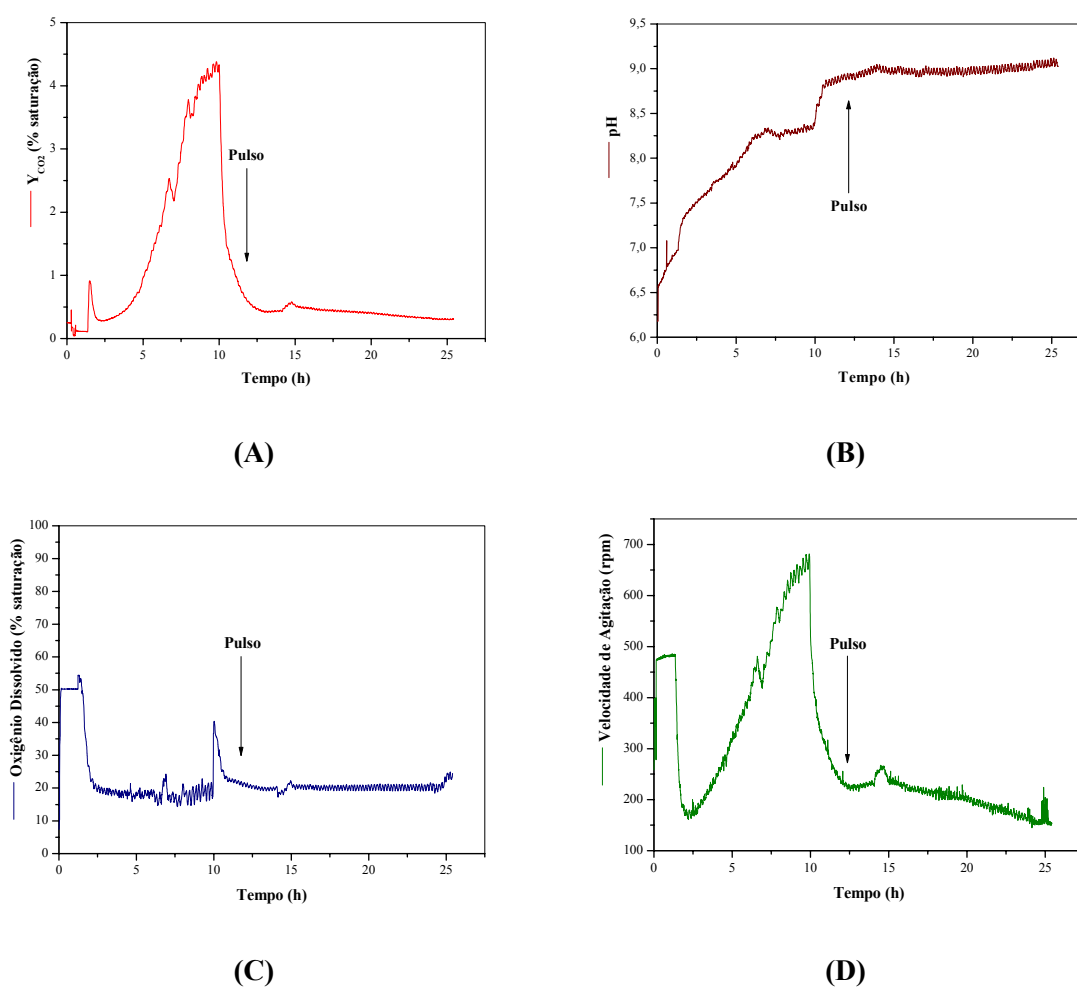
**Figura 4.5:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo de *B. megaterium* em biorreator inoculado com células armazenadas como esporos em glicerol 20% v/v a  $-70^\circ\text{C}$  com 10,0 g/L de extrato de levedura.

**Tabela 4.16:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) nos cultivos de *B. megaterium* para produção de PGA com extrato de levedura a 10,0 g/L em frascos agitados realizados em paralelo ao ensaio em biorreator inoculados com células armazenadas como esporos em glicerol 20% v/v a  $-70^\circ\text{C}$ .

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Pré-inóculo	12	8,12	1,47	-
Inóculo	12	8,54	2,59	-
Padrão	0	7,84	0,25	0
	24	9,23	3,68	464
Extrato de levedura (5,0 g/L) Pulso em 24 h	0	7,77	0,26	0
	12	8,61	3,53	81
	24	9,63	3,56	115
Extrato de levedura (10,0 g/L)	0	7,84	0,29	0
	12	8,69	4,49	107
	24	9,55	4,65	98

Os resultados mostram que a máxima concentração de enzimas no cultivo em biorreator, 157 UI/L foi superior à obtida em frascos agitados, 115 UI/L, porém alcançando níveis bem inferiores ao padrão, 464 UI/L.

A massa celular também foi maior em biorreator, com máxima concentração de células, 5,55 g/L, após 8 horas de cultivo, decrescendo a partir desse ponto até a suplementação do meio com um pulso de 10,0 g/L de extrato de levedura às 12 horas de cultivo, onde se pode observar uma leve retomada na concentração celular com pico de atividade enzimática em 14 horas e manutenção nesse patamar até o final do cultivo.



**Figura 4.6:** Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de  $\text{CO}_2$  ( $Y_{\text{CO}_2}$ ), (B) pH, (C) concentração de oxigênio dissolvido e (D) velocidade de agitação.

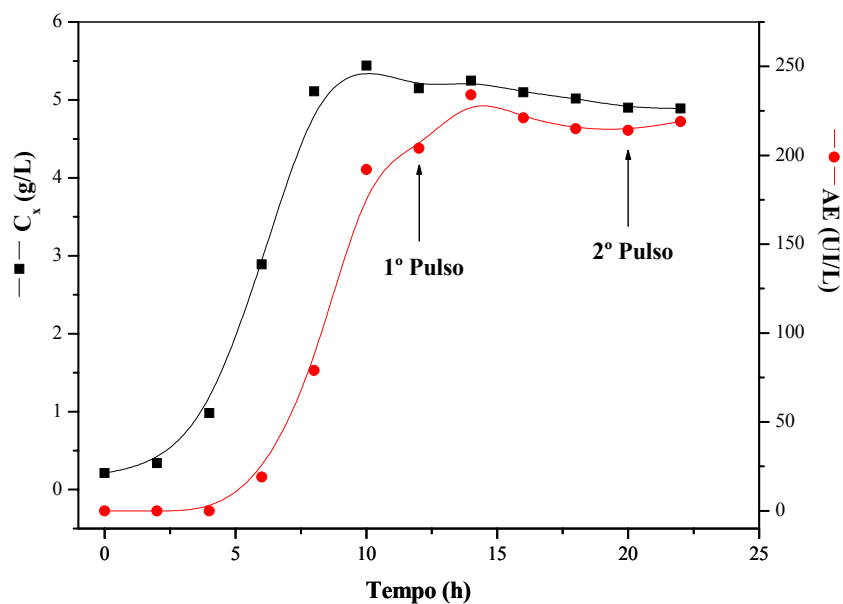
A estratégia de suplementação do cultivo parece não ter sido suficiente para resgatar o crescimento do microrganismo, o que pode ser verificado pela queda na fração

molar de CO<sub>2</sub>, e diminuição da velocidade de agitação, pois para controlar a concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação, deve ocorrer aumento da velocidade de agitação, se houver aumento na concentração celular e conseqüentemente da demanda de oxigênio dissolvido (Figura 4.6).

Esse comportamento evidencia que o microrganismo requer uma maior quantidade de extrato de levedura para aumento da massa celular. Contudo, para evitar repressão pela presença de carboidratos a concentração desse nutriente no meio deve ser mantida baixa. Como alternativa, decidiu-se fornecer pulsos de extrato de levedura cada vez que uma queda na concentração celular fosse detectada através das medidas de densidade óptica do caldo de cultura. Os resultados para os cultivos em biorreator e em frascos agitados estão apresentados na Tabela 4.17 e Figura 4.7.

**Tabela 4.17:** Valores de pH, concentração celular (C<sub>x</sub>) e atividade enzimática (AE) nos cultivos de *B. megaterium* para produção de PGA com extrato de levedura a 10,0 g/L em frascos agitados inoculados com células armazenadas como esporos a -70°C realizados em paralelo ao ensaio em biorreator.

Ensaio	Tempo (h)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	AE (UI/L)
Pré-inóculo	12	8,40	1,30	-
Inóculo	12	8,92	2,87	-
Padrão	0	7,97	0,23	0
	24	9,22	3,84	535
Extrato de levedura (10,0 g/L)	0	7,84	0,29	0
	12	8,74	4,30	70
	24	8,89	5,13	95

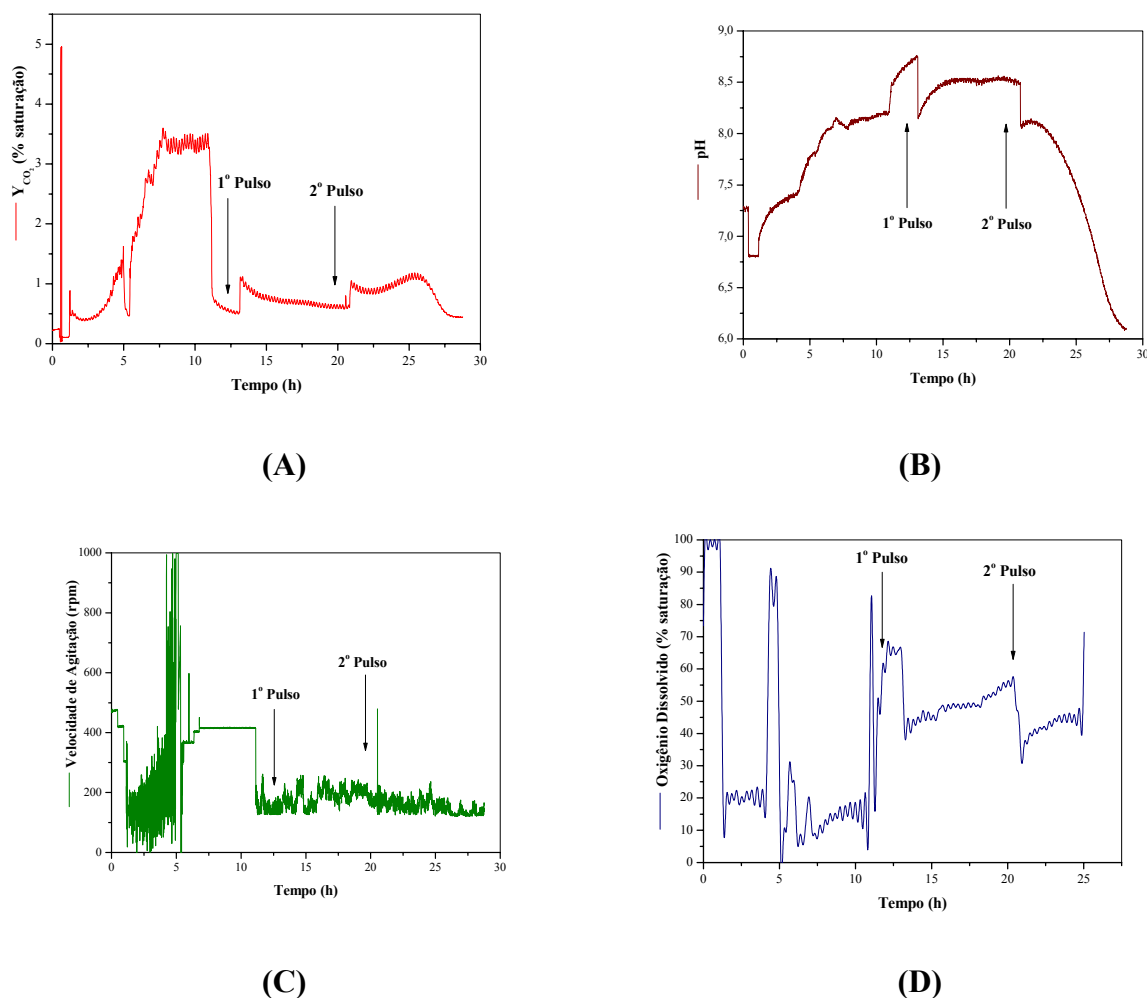


**Figura 4.7:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do tempo de cultivo de *B. megaterium* em biorreator com 10,0 g/L de extrato de levedura inoculado com células armazenadas a  $-70^\circ\text{C}$  (criotubos) e adição de pulsos.

Novamente, os valores de atividade enzimática obtidos em biorreator superaram os dos frascos agitados, mas alcançando apenas 44% da concentração de enzimas padrão, 535 UI/L. A máxima atividade enzimática obtida nesse cultivo foi superior às obtidas nos demais ensaios com extrato de levedura.

A suplementação do cultivo em biorreator com pulso de extrato de levedura assim que fosse verificada diminuição na concentração celular permitiu manutenção do crescimento do microrganismo com produção associada da enzima, com picos de 5,44 g/L e 234 UI/L para as concentrações de células e enzimas, respectivamente. A retomada no crescimento celular do microrganismo está evidenciada no perfil da fração molar de  $\text{CO}_2$ , que apresenta um aumento a cada nova suplementação do meio com extrato de levedura.

Um fato que chamou a atenção nesse cultivo foi a queda do valor de pH. Uma justificativa seria referente ao pulso adicionado ao reator após 20 h de cultivo, mesmo tendo ajustado o mesmo para pH= 8,0 antes da esterilização. A instabilidade nas medidas da concentração de oxigênio dissolvido pode ser explicada por problemas na calibração do sensor antes do início do cultivo.



**Figura 4.8:** Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de  $CO_2$  ( $Y_{CO_2}$ ), (B) pH, (C) velocidade de agitação e (D) concentração de oxigênio dissolvido.

Com respeito à utilização de extrato de levedura como fonte de nitrogênio para a produção da enzima pode-se concluir que a presença de 27,3% de aminoácidos em sua composição, contribuindo apenas com 2,73 g/L de aminoácidos quando a concentração padrão que vinha sendo utilizada era de 10,0 g/L, limita o crescimento do microrganismo e, consequentemente a produção da enzima.

Todos os ensaios realizados até agora mostram que é possível ocorrer crescimento do microrganismo sem expressão da enzima, mas o contrário nunca acontece. Confirmando essa observação, a utilização de concentrações maiores de extrato de levedura, tal como foi testado nos ensaios apresentados anteriormente, aumentou a massa celular, mas não promoveu aumento na atividade enzimática, o que nos leva a crer que a presença marcante de carboidratos, 11% da composição total reprima a síntese e/ou expressão da

enzima, pois o microrganismo que cresce consumindo carboidratos não produz PGA, conforme amplamente verificado nos trabalhos realizados neste grupo de pesquisa e por outros autores, por exemplo, Illanes, *et al.*, 1994, ao estudar a utilização de glicose como fonte de carbono na produção da enzima por *Bacillus megaterium*.

Já que no caso do extrato de levedura existe uma relação de compromisso entre a concentração ótima de nitrogênio (aminoácidos) e repressão por excesso de carboidratos, uma alternativa ao uso de aminoácidos livres seria a utilização de fontes individuais de nitrogênio, ou seja, algum nutriente que tenha sua composição livre de carbonos, para que não ocorra repressão por altas concentrações dessa fonte, nem tão pouca limitação por nitrogênio. Assim, passou-se a estudar fontes individuais de carbono e nitrogênio para melhor entendimento do metabolismo do microrganismo para a produção da enzima.

#### **4.2.2.3. Estudo de Fontes Individuais de Carbono e Nitrogênio**

Como foi observada nos ensaios anterior, a utilização de nutrientes como extrato de levedura, cuja composição elementar divide-se entre carbono e nitrogênio, dificulta o estabelecimento de uma concentração 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, foram realizados ensaios com fontes individuais de carbono e nitrogênio, visando melhor entendimento dos fenômenos de indução e repressão.

Fenilacetato de potássio foi utilizado como fonte de carbono, uréia ou sulfato de amônio, como fontes de nitrogênio. Suas concentrações foram baseadas na composição da solução de 10,0 g/L de aminoácidos, onde carbono e nitrogênio contribuíam com 41% e 17%, respectivamente.

Em todos os ensaios, além da adição dos 3,5 g/L de fenilacetato de potássio utilizadas como indutor na produção da enzima, adicionava-se uma outra quantidade desse nutriente correspondente ao carbono presente nos aminoácidos. A adição de carbonato de cálcio buscava impedir queda do pH no decorrer do cultivo. Assim foi realizado também um ensaio na ausência desse componente, onde se pretendia investigar se variações no pH alterariam o crescimento do microrganismo e/ou produção da enzima e um outro ensaio com uréia e fenilacetato de potássio presentes em concentrações estimadas a partir da composição elementar de uma célula de *E. coli* (46% de carbono e 12,5% de nitrogênio). Os resultados para essa bateria de ensaios estão apresentados na Tabela 4.21

**Tabela 4.18:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (A.E.) obtidos de cultivo de *B. megaterium* utilizando fontes individuais de carbono e nitrogênio.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	12	7,86	1,47	-
Padrão $C_{aa} = 10,0$ g/L	0	7,64	0,16	0
	24	8,62	3,58	222
Uréia (3,61 g/L) Fenilacetato de potássio (3,5 + 7,4 g/L) Carbonato de cálcio (4,13 g/L)	0	7,67	0,15	0
	24	8,53	4,10	99
	48	9,08	4,66	131
Sulfato de amônio (8,0 g/L) Fenilacetato de potássio (3,5 + 7,4 g/L) Carbonato de cálcio (4,13 g/L)	0	7,81	0,18	0
	24	8,35	3,43	179
	48	8,50	5,65	257
Uréia (3,61 g/L) Fenilacetato de potássio (3,5 + 7,4 g/L)	0	7,73	0,19	0
	24	8,31	3,84	76
	48	9,04	4,07	104
Uréia (1,51 g/L) Fenilacetato de potássio (3,5 + 4,5 g/L) Carbonato de cálcio (4,13 g/L)	0	7,67	0,18	0
	24	8,44	2,86	42
	48	8,95	4,17	100

A utilização de uréia e fenilacetato de potássio, embora tenha permitido crescimento do microrganismo, conduziu apenas a 50% da atividade enzimática atingida em ensaio padrão. Quanto ao sulfato de amônio, seu uso como fonte de nitrogênio parece promissor, já que conduziu a uma concentração de enzimas (257 UI/L) acima daquela obtida em ensaio controle, sugerindo preferência deste nutriente pelo microrganismo se comparado à uréia.

A presença de carbonato de cálcio parece não interferir nem no crescimento celular nem na atividade enzimática, já que sua omissão não provocou quedas significativas na produção de PGA. Foram realizados novos ensaios com sulfato de amônio e fenilacetato de potássio como fontes de nitrogênio e carbono investigando diferentes concentrações desses nutrientes, cujos resultados estão apresentados na Tabela 4.19.

**Tabela 4.19:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos de cultivo de *B. megaterium* utilizando fenilacetato de potássio e sulfato de amônio como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	12	8,01	1,59	-
Padrão	0	8,01	0,16	0
	24	8,69	3,71	220
Sulfato de amônio (8,0 g/L) Fenilacetato de potássio (3,5 + 7,4 g/L) Carbonato de cálcio (4,13 g/L)	0	8,01	0,16	0
	24	8,23	3,49	127
	36	8,36	3,92	251
	48	8,84	4,58	317
Sulfato de amônio (4,0 g/L) Fenilacetato de potássio (3,5 g/L) Carbonato de cálcio (4,13 g/L)	0	8,07	0,18	0
	12	8,46	3,18	203
	24	8,39	3,52	246
	36	8,46	3,59	203
	48	8,70	3,81	202
Sulfato de amônio (4,0 g/L) Fenilacetato de potássio (3,5 g/L) Carbonato de cálcio (4,13 g/L) Pulso em 12, 24 e 36 h	24*	8,03	3,23	204
	36*	8,10	3,79	240
	48*	8,85	4,03	220

Os resultados apresentados confirmam que a substituição de aminoácidos livres por fenilacetato de potássio e sulfato de amônio favoreceu a produção da PGA, alcançando, ainda que com atraso de 12 horas, valores superiores de atividade enzimática, com máxima concentração de enzimas, 317 UI/L após 48 horas de cultivo.

Foram também testadas a suplementação do meio com pulsos de sulfato de amônio a cada 12 horas de cultivo, contudo, nem a concentração de células, nem de enzimas parece responder positivamente a essa estratégia de alimentação, ambas alcançando os mesmos níveis que os obtidos nos ensaios em batelada.

No ensaio similar sem pulsos, pode-se verificar que ainda ocorre crescimento e produção da enzima após 12 horas, mas como a velocidade de consumo nessa fase já é baixa pode ter



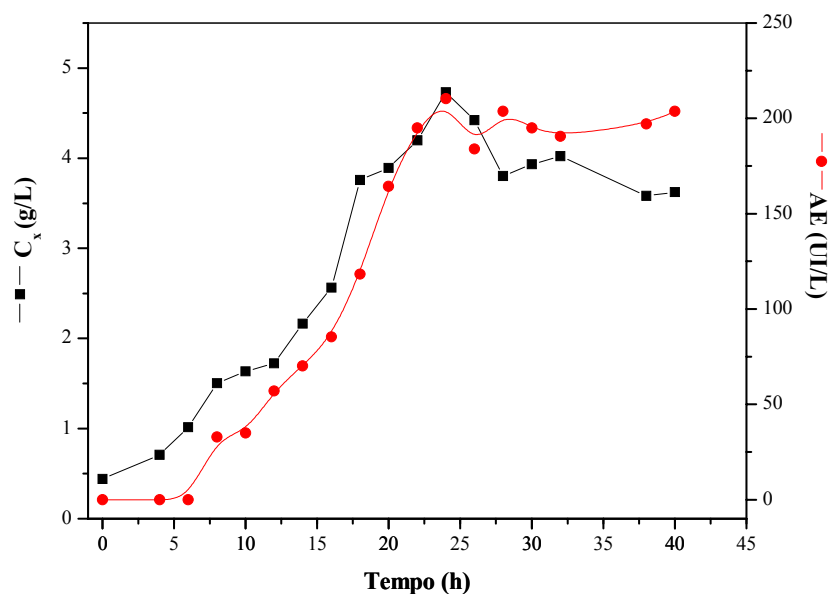
ocorrido excesso de substrato. Parece que a produção da enzima é regulada de forma complexa requerendo um delicado balanço entre os nutrientes para manter a expressão desreprimida, já que continuou ocorrendo crescimento celular, aparentemente com a velocidade de crescimento para a qual há produção da enzima.

Uma outra observação relevante é que todos os cultivos foram finalizados enquanto o microrganismo estava em fase de crescimento, o que pode ser verificado pela manutenção da concentração celular.

Estas constatações motivaram à realização de ensaios em biorreator onde sulfato de amônio foi utilizado como fonte de nitrogênio e fenilacetato de potássio, como fonte de carbono. Esse tipo de cultivo permite obtenção de informações mais consistentes sobre o comportamento do microrganismo frente aos nutrientes através do acompanhamento de seu crescimento celular. Assim, uma discussão mais detalhada sobre sua utilização como fonte de nitrogênio será apresentada nos resultados obtidos em biorreator.

A composição do meio de cultivo tendo sulfato de amônio e fenilacetato de potássio como fontes individuais de nitrogênio e carbono, foi reproduzida em biorreator a 30°C, 20% de oxigênio dissolvido e aeração com 2,0 L/min. Paralelamente, foram realizados ensaios em frascos agitados com a mesma composição e ensaio padrão para controle da viabilidade do microrganismo, e os resultados estão apresentados na Figura 4.9 e Tabela 4.20.

Os resultados mostram claramente que a produção da enzima está diretamente associada ao crescimento do microrganismo, quando a fonte de carbono é apenas fenilacetato de potássio. O ponto de máxima atividade apresenta um atraso de aproximadamente 6 horas em comparação aos cultivos padrão em frascos agitados, que também é observado no cultivo em paralelo com a mesma composição. No entanto, a concentração de enzima no biorreator foi inferior à obtida nos ensaios paralelos em câmara rotativa indicando que há alguma condição em frascos agitados que favorece a produção da enzima, possivelmente limitação por oxigênio.

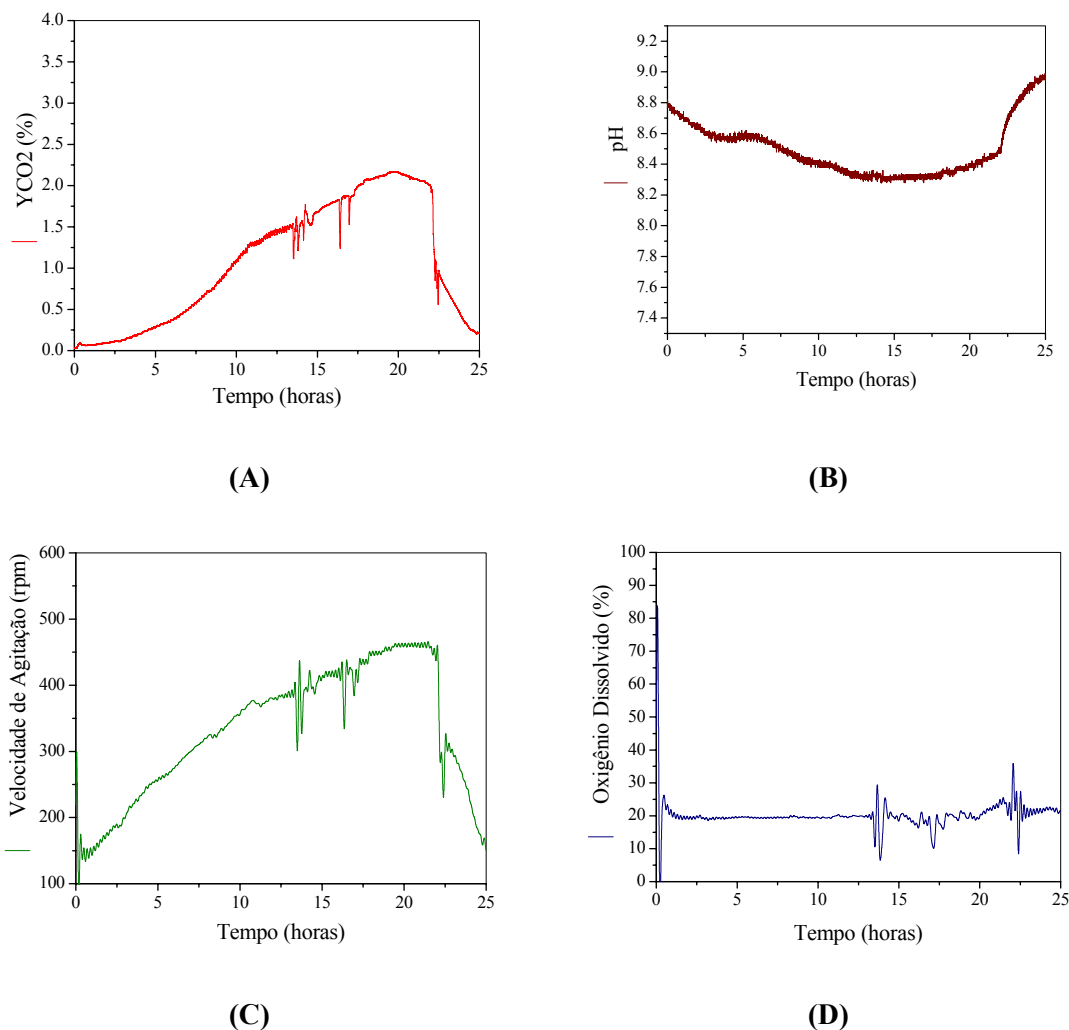


**Figura 4.9:** Valores de concentração celular e atividade enzimática ao longo do cultivo de *B. megaterium* em biorreator utilizando sulfato de amônio e fenilacetato de potássio como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente, a 20% de oxigênio dissolvido e 30°C.

**Tabela 4.20:** Valores de pH, concentração celular (C<sub>x</sub>) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados realizados em paralelo ao cultivo em biorreator com sulfato de amônio e fenilacetato de potássio como fonte de nitrogênio e carbono, respectivamente.

Ensaio	Tempo (h)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	12	8,12	2,06	-
Sulfato de amônio (8,0 g/L) Fenilacetato de potássio (3,5 + 7,4 g/L)	0	8,2	0,36	0
	18	7,8	2,69	133
	24	7,7	2,23	137
	36	7,9	3,55	305
	48	7,9	3,51	283
Padrão	0	7,9	0,82	0
	18	8,4	3,17	335
	24	8,6	3,91	268

A máxima concentração de enzima ocorre em 24 horas, quando a concentração celular começa a decrescer, acompanhada por uma queda na fração molar de  $\text{CO}_2$  (Figura 4.10 (A)).



**Figura 4.10:** Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de  $\text{CO}_2$  ( $Y_{\text{CO}_2}$ ), (B) pH, (C) velocidade de agitação e (D) Concentração de oxigênio dissolvido.

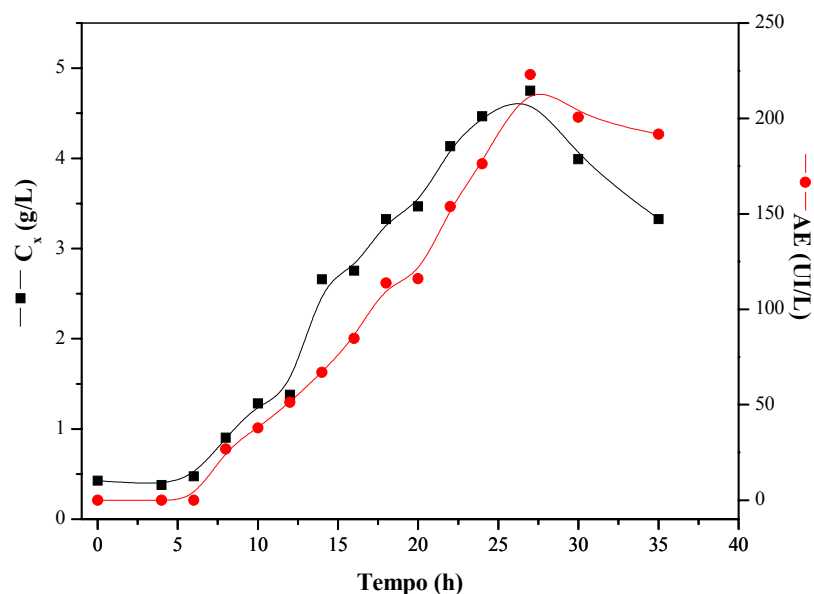
Uma característica diferenciada verificada neste ensaio foi o perfil do pH, Figura 4.10 (B), que apresentou inicialmente um valor elevado, decrescendo em seguida e voltando a subir após 20 horas de cultivo. Uma justificativa para tal acontecimento foi a falta de ajuste no valor inicial de pH, que deveria ser em torno de 8,0. Com respeito a Figuras 4.10 (C), o perfil de agitação acompanha a diminuição da concentração celular e da fração molar

de CO<sub>2</sub>, decrescendo após 22 horas de cultivo, para manter a concentração de oxigênio dissolvido em torno de 20% da saturação, tal como pode ser observado na Figura 4.10 (D).

A utilização do sulfato de amônio e fenilacetato de potássio como fontes individuais de nitrogênio e carbono, parece ser uma alternativa promissora para um se obter uma máxima produção de enzima semelhante à obtida por Souza, 2003, em que uma concentração de 313 UI/L foi atingida ao se limitar a concentração de oxigênio dissolvido de 20 para 5% do valor da saturação após 12 horas de cultivo, utilizando meio padrão: solução de 18 aminoácidos (10,0 g/L), soro de queijo (20,0 g/L), sais(0,3 g/L) e indutor ácido fenilacético (2,7 g/L). Assim, optou-se por aplicar a mesma estratégia num ensaio com as fontes individuais de carbono e nitrogênio.

**Tabela 4.21:** Valores de pH, concentração celular (C<sub>x</sub>) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados realizados em paralelo ao cultivo em biorreator com sulfato de amônio e fenilacetato de potássio a 30°C e limitação de oxigênio dissolvido de 20 para 5% da saturação após 12 horas.

Ensaio	Tempo (h)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	12	8,15	1,62	-
Sulfato de amônio (8,0 g/L) Fenilacetato de potássio (3,5 + 7,4 g/L)	0	7,93	0,11	0
	18	7,88	2,41	114
	24	7,89	3,75	181
	36	7,93	3,83	243
	48	8,05	3,79	243
Padrão	0	7,96	0,29	0
	18	8,37	3,03	200
	24	8,53	2,97	179
	36	8,96	2,55	187
	48	9,02	2,43	190



**Figura 4.11:** Valores de concentração celular e atividade enzimática ao longo do cultivo de *B. megaterium* em biorreator utilizando sulfato de amônio e fenilacetato de potássio como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente, a 30°C e limitação de oxigênio dissolvido de 20 para 5% da saturação após 12 horas de cultivo.

Problemas no sistema de aquisição de dados não permitiram obter as variáveis adquiridas em tempo real (pH, oxigênio dissolvido, fração molar de  $\text{CO}_2$  e agitação).

Os resultados apresentados na Tabela 4.24 e Figura 4.13 mostram que o cultivo em biorreator alcançou valores de atividade enzimática bem próximos àqueles obtidos em frascos agitados, tanto para meio similar quanto para o meio padrão. A estratégia de limitação da concentração de oxigênio dissolvido em 5% , após 12 horas de cultivo, parece assim ter resultado em sucesso com respeito à produção da enzima. O ponto de máxima atividade (223 UI/L) aconteceu após 27 horas de cultivo, permanecendo estacionado nesse patamar, o que nos leva a crer que talvez uma inibição por excesso de nutrientes, tal como foi discutido nos ensaios em câmara rotativa, esteja reprimindo a expressão da enzima.

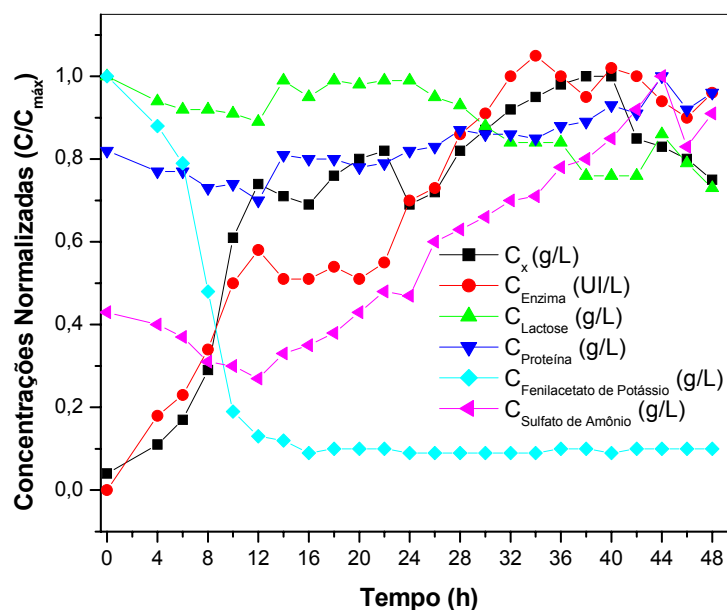
Uma alternativa para promover produção da enzima a níveis mais elevados, sem inibição na síntese por excesso de nutrientes, seria fornecer esses nutrientes em concentrações em que fossem exauridos pelo microrganismo assim que adicionados ao meio, favorecendo um aumento da fase exponencial de crescimento e produção associada da enzima.

Esse tipo de comportamento pode ser proporcionado com adição de um meio suplementar em uma vazão tal que mantenha a concentração dos nutrientes baixa durante o cultivo. Assim, foi realizado um ensaio em que sulfato de amônio e fenilacetato de potássio tiveram suas concentrações iniciais reduzidas à metade e com adição suplementar desses dois nutrientes. A composição inicial do meio apresentava as seguintes concentrações: 4,0 g/L de sulfato de amônia, 20,0 g/L de soro de queijo, 0,3 g/L de sais e 3,5 g/L de fenilacetato de potássio. Nesta concentração, fenilacetato de potássio está sendo considerado somente como indutor, a contribuição desse nutriente como fonte de carbono será dada somente pela sua adição no meio suplementar após 12 horas de cultivo, final da fase exponencial de crescimento. O meio suplementar era composto por 190 g/L de sulfato de amônio, 183 g/L de fenilacetato de potássio, 19,6 g/L de soro de queijo e 0,3 g/L de sais, adicionados ao meio a uma vazão de 15 mL/h.

Os resultados para os ensaios em biorreator e em frascos agitados com meio similar e meio padrão estão apresentados respectivamente na Tabela 4.22 e Figura 4.12.

**Tabela 4.22:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados com sulfato de amônio e fenilacetato de potássio realizados em paralelo ao cultivo em biorreator.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	12	8,32	1,87	-
Sulfato de amônio (8,0 g/L) Fenilacetato de potássio (3,5 + 7,4 g/L)	0	8,11	0,24	0
	24	8,43	2,07	132
	36	8,72	2,01	164
	48	8,78	1,75	226
	60	8,83	1,32	255
Padrão	0	7,79	0,15	0
	24	8,81	2,89	186
	36	9,12	3,11	185



**Figura 4.12:** Valores de concentração celular ( $C_x = 5,48$  g/L), atividade enzimática ( $AE = 255$  U/L), concentração de lactose ( $C_{lactose} = 14,0$  g/L), concentração de proteínas ( $C_{proteínas} = 3,07$  g/L), concentração de fenilacetato de potássio ( $C_{indutor} = 3,06$  g/L) e concentração de sulfato de amônio ( $C_{sulfato} = 8,16$  g/L) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em biorreator em batelada alimentada utilizando sulfato de amônio e fenilacetato de potássio e 20% de oxigênio dissolvido durante todo o cultivo.

A observação dos resultados mostra que os ensaios em biorreator alcançaram o mesmo patamar na produção de enzima que o obtido no ensaio em frascos agitados com meio similar (255 UI/L), um aumento significativo em relação ao meio padrão, onde a máxima atividade enzimática atingiu 186 UI/L.

Com respeito à concentração celular, nota-se que o crescimento do microrganismo em frascos agitados, na presença de sulfato de amônio e fenilacetato de potássio, parece ter sido limitado por alguma condição, atingindo valores bastante inferiores àqueles obtidos em biorreator. Neste último, os nutrientes fornecidos durante a alimentação conduziram ao prolongamento do crescimento celular com máxima concentração de células, 5,48 g/L, em 38 horas de cultivo. Fenilacetato de potássio inicialmente presente no meio como indutor foi exaurido. Sua adição, após as 12 horas de cultivo, suplementava o meio com concentrações limitantes, pois não se observa acúmulo desse nutriente ao decorrer da alimentação, sendo toda a quantidade fornecida consumida pelo microrganismo. Sulfato de amônio mostrou ser uma fonte de nitrogênio bastante assimilável pelo microrganismo, pois

este vinha sendo consumido a uma taxa de 0,1 g/L\*h, mas deverá ser suplementado a vazões ainda menores, já que essa velocidade de alimentação apresentou acúmulo do nutriente.

Um importante resultado desse ensaio é que se pode observar claramente que ocorre consumo de lactose como fonte de carbono, mas esse consumo só é evidenciado durante a expressão concomitante de PGA, indicando que genes das enzimas necessárias ao seu consumo (permease, por exemplo) devem estar dentro do mesmo “cluster” onde está PGA, o que explica a expressão conjunta delas.

#### 4.2.2.4. Influência de Diferentes Concentrações de Fenilacetato de Potássio na Produção de PGA

Uma vez que fenilacetato de potássio foi utilizado como fonte de carbono, buscou-se investigar se concentrações diferentes daquela em que o consideram apenas como indutor (3,5 g/L) teriam efeito negativo na produção da enzima.

**Tabela 4.23:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados utilizando diferentes concentrações de fenilacetato de potássio.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	12	8,00	1,71	-
Fenilacetato de potássio (2,5 g/L)	0	7,86	0,17	0
	24	8,28	2,48	81
	36	8,91	3,52	173
<b>Padrão</b> Fenilacetato de potássio (3,5 g/L)	0	7,92	0,17	0
	24	8,43	3,26	216
Fenilacetato de potássio (4,5 g/L)	0	7,79	0,18	0
	24	8,17	3,77	173
	36	8,82	3,35	215

Os resultados apresentados na Tabela 4.23 indicam que fenilacetato de potássio a 3,5 g/L é a concentração mais favorável à produção da PGA, conduzindo a 216 UI/L em 24



horas, enquanto que para 4,5 g/L essa mesma concentração de enzimas é alcançada com um atraso de 12 horas, indicando que existe realmente uma inibição por excesso de carbono.

#### 4.2.2.5. Utilização de Amido para Aumentar a Produção de PGA

**Tabela 4.24:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE) e concentração de amido obtidos no cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados acrescidos de diferentes concentrações de amido solúvel.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{\text{amido}}$ (g/L)
Inóculo	12	8,02	1,79	-	-
Padrão	0	8,03	0,15	0	-
	24	8,53	3,62	647	-
Amido (5,0 g/L)	0	8,01	0,17	0	5,56
	24	8,51	4,62	688	5,73
Amido (10,0 g/L)	0	8,06	0,14	0	11,40
	24	8,72	4,22	672	12,00
Amido (15,0 g/L)	0	8,03	0,17	0	16,04
	24	8,48	4,10	686	16,24
Amido (20,0 g/L)	0	8,05	0,15	0	22,48
	24	8,55	4,03	639	22,68
Amido (25,0 g/L)	0	8,03	0,16	0	27,32
	24	8,65	3,92	624	26,31

Zhang e colaboradores, 2005 ao estudar a produção de PGA de *B. megaterium* expressada por *Bacillus subtilis* recombinante suplementaram o meio LB (extrato de leveduras e tripton) com 25g/L de amido solúvel e observaram um acréscimo de 45% na concentração de PGA. Segundo Vary, 1994. *B. megaterium* produz uma exo-amilase que potencialmente poderia também fornecer glicose para crescimento do microrganismo sem reprimir a expressão da enzima. Foram, então, realizados cultivos em meio padrão acrescidos de diferentes concentrações de amido, 5,0 a 25,0 g/L, cujos resultados estão apresentados na

Tabela 4.24. Nesses ensaios, utilizou-se como inóculo células vegetativas preservadas em glicerol 8% v/v a -70°C.

Nenhuma das concentrações estudadas parece favorecer significativamente a produção da enzima, indicando que *B. megaterium* não consegue processar o amido, tal como pode ser verificado pela ausência de consumo desse substrato.

No trabalho de Zhang, *et al.*, 2005, os autores encontraram dificuldade em trabalhar com o amido devido a sua insolubilidade em água e alta viscosidade, dificultando o processo de suplementação do meio através de bomba peristáltica.

Como alternativa, submeteram o amido à hidrólise com pequenas concentrações de  $\alpha$ -amilase. A solubilidade e fluidez foram significativamente melhoradas e apenas 5,0 g/L de glicose foram liberadas. Por outro lado, uma vez que a literatura reporta que amilase produzida por *B. megaterium* é uma exoamilase, a hidrólise prévia do amido aumentaria a concentração de substrato para a amilase.

Assim, a estratégia de Zhang, *et al.*, 2005, foi aqui reproduzida, usando amido a uma concentração de 15,0 g/L, hidrolisado por 5 e 180 minutos na presença de 1,0 e 2,0 mL/L de  $\alpha$ -amilase.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.25, amido hidrolisado, nas três diferentes condições estudadas, não promoveu aumento significativo na concentração de enzima se comparado ao ensaio padrão. Determinação das concentrações iniciais e finais de amido, obtidas como glicose após hidrólise total das amostras, mostra que não houve consumo desse substrato em nenhum dos ensaios, indicando que o microrganismo consumiu preferencialmente aminoácidos e fenilacetato de potássio como fonte de carbono, comportamento semelhante ao do ensaio padrão.

Uma vez que se houvesse glicose certamente o microrganismo iria consumi-la preferencialmente, não deve estar ocorrendo liberação desse nutriente ou porque as condições operacionais não são favoráveis à produção da amilase ou por que o microrganismo não consegue assimilar o produto da ação da amilase, maltose, por exemplo. Considerando-se não haver consumo do amido, descartou-se a sua utilização.

**Tabela 4.25:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE) e concentrações de amido ( $C_{\text{amido}}$ ) e aminoácidos ( $C_{\text{aa totais}}$ ) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados acrescidos de amido hidrolisado.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{\text{amido}}$ (g/L)	$C_{\text{aa totais}}$ (g/L)
Inóculo	12	8,08	2,04	-	-	-
Padrão	0	8,07	0,21	0	-	9,28
	24	8,58	3,51	606	-	2,92
Amido (15,0 g/L)	0	8,11	0,19	0	17,08	9,20
	24	8,39	4,45	630	15,93	3,17
Hidrolisado (15,0 g/L) 5 minutos $C_{\text{enzima}} = 1,0 \text{ mL/L}$	0	8,04	0,20	0	15,03	9,21
	24	8,53	3,65	611	14,12	3,55
Hidrolisado (15,0 g/L) 5 minutos $C_{\text{enzima}} = 2,0 \text{ mL/L}$	0	8,07	0,19	0	14,83	9,11
	24	8,50	3,84	645	14,32	3,10
Hidrolisado (15,0 g/L) 180 minutos $C_{\text{enzima}} = 1,0 \text{ mL/L}$	0	8,08	0,18	0	15,53	9,38
	24	8,33	4,14	652	14,82	2,84

#### 4.2.3. Influência do Soro de Queijo na Produção da Enzima

Soro de queijo, um abundante subproduto da indústria de laticínios, se descartado diretamente em rios é um potente agente poluidor devido à sua alta demanda bioquímica de oxigênio. Contudo, seu alto conteúdo orgânico o qualifica também como fonte nutritiva voltada à alimentação humana ou meio de cultura de microrganismos. Um soro de queijo típico contém 5-6% de lactose, 0,8-1% de proteínas, 0,1% de gordura (Ozmihci e Kargi, 2006).

O cultivo de *Bacillus megaterium* para a produção de PGA tem se mostrado fortemente dependente da presença de soro de queijo no meio de cultura (Silva *et al.*, 2005, Pinotti *et al.*, 2000 e 2007; Berazain *et al.*, 1997). A presença desse nutriente, contudo, implica adição ao meio de cultivo de aproximadamente 2,0 g/L de proteínas contidas no soro de queijo em pó, o que dificulta a separação da enzima produzida. Assim, embora houvesse

um interesse acadêmico em entender qual (ou quais) dos componentes do nutriente atuava na produção da enzima, a motivação maior da necessidade desse entendimento era facilitar a posterior separação/purificação da PGA.

Em trabalhos anteriores, Pinotti, 2003 e Souza, 2003 tentaram substituir o soro por seus componentes (lactose, proteínas, vitaminas e sais), individualmente ou combinados. Em todos os experimentos, a concentração da enzima produzida apresentava uma queda bastante acentuada, e em alguns casos era nula. Ainda na tentativa de entender qual ou quais dos nutrientes presentes no soro de queijo é o fator responsável por acionar o mecanismo de produção e expressão da enzima, foram realizados ensaios com soro de queijo processado de diferentes maneiras: soro de queijo em pó, “in natura”, fração retida na ultrafiltração (concentrado) e fração permeada na ultrafiltração (permeado) em membrana com curva de corte de 10 kDa.

O soro de queijo em pó, obtido pelo processamento do soro líquido “in natura” em evaporadores a vácuo seguidos por secagem por atomização (“spray drying”) onde a água é removida, contém cerca de 70% lactose, 12% proteínas e 15% minerais e foi adicionado ao meio de cultivo na concentração de 20,0 g/L.

Nos ensaios em frascos agitados, em que se substituiu soro de queijo em pó por soro de queijo “in natura”, utilizou-se como critério manter constante o conteúdo de lactose presente no soro de queijo em pó, (cerca de 70%). Sendo 20,0 g/L a concentração do soro em pó utilizada no meio de cultivo, a lactose presente nesse meio é da ordem de 14,0 g/L. Como o soro “in natura” apresentava em torno de 50,0 g/L de lactose, adicionou-se 14 mL num total de 50 mL de meio de cultivo.

A ultrafiltração do soro de queijo “in natura” em membrana de 10 kDa, originou duas frações distintas: 1) soro permeado, onde lactose está presente numa concentração de 43,0 g/L, na ausência de proteínas com massa molecular acima de 10 kDa, e 2) soro concentrado, fração retida pela membrana, com alto conteúdo de proteínas e 34,0 g/L de lactose. Ambas as frações foram utilizadas na composição de meios de cultivo, sendo adicionadas de modo a reproduzir a concentração de lactose presente no soro em pó (14,0 g/L). Dessa forma o volume de soro “in natura” permeado e concentrado, foram iguais a 16,0 e 21,0 mL, respectivamente. Soro de queijo em pó na concentração de 20,0 g/L foi também submetido à ultrafiltração em membrana de 10 kDa e a fração permeada foi também utilizada na composição do meio.

A observação da Tabela 4.26 mostra que o ensaio padrão típico (soro de queijo em pó) apresenta um pico de atividade enzimática em 24 horas de 508 UI/L.

A utilização de soro “in natura” embora tenha permitido crescimento celular semelhante ao obtido com soro em pó, acima de 4,0 g/L de células, não alcançou os mesmos níveis de atividade enzimática, atingindo apenas 55% da produção de enzimas.

**Tabela 4.26:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos do cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados com soro de queijo em diferentes configurações.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
<b>Padrão</b> Soro de queijo em pó $C_{\text{soro}} = 20,0$ g/L $C_{\text{lactose}} = 14,0$ g/L	0	7,7	0,27	0
	12	8,1	3,14	189
	24	8,4	4,16	508
	36	8,9	3,97	356
	48	9,5	3,25	205
Soro de queijo “in natura” $C_{\text{lactose}} = 50,0$ g/L	0	7,7	0,17	0
	24	8,6	4,45	281
	36	9,3	3,67	276
	48	9,3	3,43	174
Permeado do soro “in natura” $C_{\text{lactose}} = 43,0$ g/L	0	8,1	0,20	0
	24	8,6	3,63	107
	36	8,8	4,00	116
	48	9,2	3,96	44
Concentrado do soro “in natura” $C_{\text{lactose}} = 34,0$ g/L	0	7,3	0,23	0
	12	8,0	3,07	169
	24	8,5	3,68	399
	36	8,7	3,37	439
	48	8,8	3,13	503
Permeado do soro em pó $C_{\text{soro}} = 20,0$ g/L	0	8,1	0,17	0
	24	8,6	1,95	62
	36	8,8	1,88	149
	48	8,8	1,76	120

Sabe-se que diferentes tipos de queijo dão origem a diferentes tipos de soro de queijo, implicando diferenças na composição de cada um deles. É possível que seja essa a explicação para a variação na produção da enzima ao se utilizar os soros em pó e “in natura”, pois essa comparação já foi feita por Pinotti *et al.*, (2000), mostrando desempenho inclusive superior para o soro “in natura”. Contudo, a fonte de nitrogênio utilizada por Pinotti era caseína hidrolisada enzimaticamente ao invés de aminoácidos livres. O conteúdo de proteínas e polipeptídeos presentes no meio de cultivo de Pinotti *et al.*, era muito maior que no estudo atual. Essa explicação é reforçada pelo fato de que: 1) a fração concentrada da ultrafiltração conduziu a resultados similares aos obtidos com soro em pó integral e 2) a fração permeada conduziu a uma produção de enzima inferior ao obtido com soro “in natura”, conforme discutido a seguir. A produção da enzima parece estar assim relacionada com a concentração de proteínas no meio.

A ultrafiltração do soro de queijo em membrana parece ter retido o nutriente-chave para a produção da PGA, já que em cultivos realizados com a fração permeada não se observam níveis expressivos de atividade enzimática, atingindo apenas 116 e 149 UI/L nos ensaios com permeado de soro em pó e “in natura”, respectivamente. No entanto, o soro concentrado, ainda que com um atraso de 24 horas, alcançou concentração de enzima semelhante àquela obtida com soro em pó integral, 503 UI/L, reforçando a hipótese de que o nutriente essencial está presente na fração retida pela ultrafiltração.

Ao se submeter o soro de queijo ao processo de ultrafiltração em membrana de corte 10 kDa é gerada uma fração concentrada com moléculas de tamanho molecular acima desse valor, constituída de proteínas e possivelmente algum outro nutriente que interaja com elas. Embora a substituição do soro por proteínas presentes nesse material ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina e soroalbumina) já tenha sido testada anteriormente, tendo-se concluído que não substituíam o soro, diante dos resultados obtidos, decidiu-se investigar novamente a produção da enzima num meio que reconstituísse a presença das proteínas do soro, cuja composição protéica está descrita na Tabela 3.6 do Anexo 3.

Sabendo-se que a concentração total de proteínas no soro corresponde aproximadamente a 12% da composição total e tomando como padrão a concentração de soro de queijo como 20,0 g/L, realizaram-se, então, ensaios em que soro de queijo foi substituído pelas proteínas constituintes disponíveis no laboratório ( $\beta$ -lactoglobulina,  $\alpha$ -lactoalbumina e soro albumina), seguindo a composição descrita em anexo. Foi também testada a adição dessas proteínas ao permeado, numa tentativa de reconstituição do soro “in natura”. A Tabela

4.27 traz os resultados desses ensaios, realizados em paralelo a um ensaio padrão com soro de queijo em pó.

**Tabela 4.27:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos do cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados com proteínas individuais na ausência e presença de lactose (na forma de permeado de soro “in natura”).

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Proteínas $\beta$ -lactoglobulina (1,1 g/L) $\alpha$ -lactoalbumina (0,34 g/L) Soro albumina (0,11 g/L)	0	8,0	0,15	0
	24	8,6	0,39	0
	36	8,7	0,44	0
	48	8,8	0,44	0
	60	9,0	0,46	0
Proteínas e permeado $\beta$ -lactoglobulina (1,1 g/L) $\alpha$ -lactoalbumina (0,34 g/L) Soro albumina (0,11 g/L) $V_{\text{permeado}} = 16,0 \text{ mL}$	0	8,1	0,17	0
	24	8,4	3,97	276
	36	9,1	3,90	335
	48	9,4	3,96	349
	60	9,6	3,95	360
<b>Padrão</b> $C_{\text{soro}} = 20,0 \text{ g/L}$	0	7,9	0,21	0
	24	8,9	3,34	499

Novamente, a concentração de lactose baseou-se na composição do meio padrão, onde estão presentes 14,0 g/L desse nutriente (70% da composição do soro em pó). Portanto, utilizou-se para um volume total de 50 mL de meio de cultura, um volume de 16,0 mL de permeado do soro “in natura” ultrafiltrado em membrana de corte de 10 kDa, cuja concentração de lactose é aproximadamente 43,0 g/L.

Pode-se observar que não ocorre nem crescimento nem produção da enzima quando se substitui o soro por algumas das proteínas presentes nesse nutriente. Há realmente um fator-chave no soro de queijo de massa molecular menor que 10 kDa (pois está presente também na fração permeada), necessário para o crescimento do microrganismo. Contudo, as proteínas também estimulam a produção da enzima. Valores bastante significativos de atividade enzimática foram obtidos com uso do permeado adicionado de proteínas, 360 UI/L,

72% do valor obtido em ensaio padrão, 499 UI/L. Esses resultados sugerem que há algum fator essencial presente no permeado que junto com as proteínas acionam a síntese e expressão da enzima.

Parece claro, pois, que há no soro alguma molécula de baixa massa molecular necessária para o crescimento do microrganismo. Ainda, a presença de proteínas e/ou oligopetídeos estimula a produção da enzima, não sendo possível eliminá-las totalmente do meio. A técnica de purificação da enzima por ultra/diafiltração em membrana de 50 kDa já foi anteriormente utilizada e mostrou-se eficiente para concentração do caldo. Contudo, ainda permanece uma grande quantidade de proteínas no caldo diafiltrado, dificultando a posterior imobilização da enzima. Como alternativa, buscou-se utilizar diferentes manipulações do soro de queijo, de modo a fornecer os fatores essenciais à produção da enzima, mas minimizando a presença das proteínas remanescentes.

#### **4.2.3.1. Estratégias para Minimizar a Presença das Proteínas do Soro de Queijo: Otimização da Concentração do Soro de Queijo**

Na tentativa de diminuir a concentração do soro de queijo e conseqüentemente minimizar a presença de proteínas sem, contudo, diminuir a produção da enzima, foram inicialmente realizados cultivos em frascos agitados com concentrações variadas de soro de queijo em pó (5,0-20,0 g/L) na presença de aminoácidos livres (10,0 g/L), sais minerais (0,3 g/L) e indutor fenilacetato de potássio (3,5 g/L). Os resultados estão apresentados na Tabela 4.28.

Pode-se observar que a produção da enzima é diretamente proporcional à concentração de soro de queijo, atingindo 482 UI/L em 36 horas de cultivo com 15,0 g/L de soro e 496 UI/L após 24 horas com 20,0 g/L.

Embora se tenha alcançado com 15 g/L de soro de queijo níveis de enzima similares aos obtidos com 20,0 g/L, o pico da produção ocorreu com atraso de 12 horas para a menor concentração. Dessa forma, confirma-se 20,0 g/L como a concentração mais adequada para o soro de queijo na produção da enzima.



**Tabela 4.28:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos do cultivo de *B. megaterium* com diferentes concentrações de soro de queijo em pó (5,0-20,0 g/L).

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
$C_{\text{soro}} = 5,0$ g/L	0	8,0	0,21	0
	12	8,1	1,58	0
	24	8,4	2,04	94
	36	8,4	2,13	85
$C_{\text{soro}} = 10,0$ g/L	0	7,9	0,22	0
	12	8,1	2,07	87
	24	8,5	2,79	258
	36	8,7	2,64	293
$C_{\text{soro}} = 15,0$ g/L	0	7,8	0,20	0
	12	7,9	2,74	183
	24	8,6	2,99	406
	36	8,7	2,86	482
<b>Padrão</b> $C_{\text{soro}} = 20,0$ g/L	0	7,9	0,17	0
	12	8,2	2,06	389
	24	8,5	3,54	496
	36	8,6	2,98	405

Buscou-se então, diminuir a quantidade de proteínas presentes através da coagulação térmica do soro de queijo em pó. O processo consistia em aquecer uma solução de 20,0 g/L de soro de queijo em pó a 90°C e ao se atingir essa temperatura adicionar-se 1% v/v de ácido clorídrico.

O soro coagulado era submetido à centrifugação a 11000 rpm e 4°C por 5 minutos e o sobrenadante resultante era assim utilizado na preparação dos meios de cultivo. Os resultados de concentração celular e atividade enzimática nos cultivos com soro de queijo coagulado estão apresentados na Tabela 4.29.

Embora o crescimento celular tenha sido semelhante ao alcançado no ensaio padrão, com o soro coagulado atingiu-se apenas 385 UI/L, enquanto que a concentração de

enzima obtida no meio com soro integral foi 539UI/L. A produção parece ter sido afetada pela diminuição da concentração da proteína ou pela degradação de outro nutriente presente.

**Tabela 4.29:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (A.E.) obtidos do cultivo de *B. megaterium* com soro de queijo desproteínizado por coagulação térmica a 90°C.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Soro em pó desproteínizado $C_{\text{soro}} = 20,0$ g/L	0	8,1	0,41	0
	12	8,7	2,12	170
	24	9,0	3,87	385
	36	9,5	3,40	335
	48	9,5	3,05	290
Padrão $C_{\text{soro}} = 20,0$ g/L	0	7,9	0,23	0
	24	9,1	3,62	539

A última estratégia estudada foi a hidrólise do soro de queijo com proteases, na tentativa de minimizar a presença de proteínas com alta massa molecular, facilitando assim a sua remoção durante a ultra/diafiltração sem, contudo, remover ou degradar nenhum dos nutrientes presentes no soro.

Soluções de soro de queijo em pó foram submetidas a dois diferentes graus de hidrólise, 3,0 e 6,2%, com tripsina imobilizada em quitosana, seguindo o protocolo descrito no capítulo 3: Materiais e Métodos.

Cromatografias por exclusão de tamanho das amostras de soro de queijo integral e hidrolisado, na concentração de 20,0 g/L, acusaram a presença de 1,90 e 1,42 g/L de proteínas, respectivamente, com uma distribuição de massas moleculares tal como pode ser observada na Tabela 4.30.

A hidrólise do soro de queijo permitiu uma diminuição na concentração das proteínas de mais alta massa molecular ( $14 < kDa < 67$ ), sendo compensada pelo aumento na concentração de proteínas de baixa massa molecular e pequenos peptídeos.

Medidas da concentração de nitrogênio total determinadas pelo método de Kjeldahl confirmaram os resultados para as concentrações totais de proteínas no soro de queijo integral e hidrolisado, com 2,05 e 1,64 g/L, respectivamente.

**Tabela 4.30:** Distribuição de massa molecular das amostras de soro de queijo integral e hidrolisado na concentração de 19,6 g/L obtidas pela cromatografia por exclusão de tamanho.

Amostra	Distribuição de Massa Molecular (g/L)			
	14<kDa<67	14<kDa<0,5	kDa<0,5	Total
Soro de queijo integral	1,38	0,41	0,065	1,86
Soro de queijo hidrolisado (GH= 6,2%)	0,84	0,53	0,063	1,43

A Tabela 4.31 mostra que os ensaios com soro de queijo submetido aos diferentes graus de hidrólise, reproduziram o crescimento celular e atividade enzimática do ensaio padrão, com picos de 4,12 g/L de células e 467 UI/L e 4,31 g/L e 477 UI/L para graus de hidrólise de 3,0 e 6,2%, respectivamente.

**Tabela 4.31:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (A.E.) obtidos do cultivo de *B. megaterium* com soro em pó submetidos a dois graus de hidrólise: 3,0 e 6,2%.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
<b>Esterilizado a 120°C</b> GH=3,0%	0	7,6	0,15	0
	24	8,9	4,12	467
	36	9,2	3,52	422
	48	9,4	3,36	399
Esterilizado em membrana 0,22 $\mu$ m GH=3,0%	0	8,1	0,21	0
	24	8,4	1,60	0
	36	8,6	1,95	0
	48	8,7	1,73	0
Esterilizado a 120°C GH=6,2%	0	7,8	0,23	0
	24	8,8	4,31	477
	36	9,1	3,79	434
	48	9,4	3,45	433
<b>Padrão</b>	0	7,6	0,21	0
	24	8,6	4,38	481

Como a esterilização do soro de queijo hidrolisado a 120°C (autoclave) poderia provocar uma possível ocorrência da reação de Maillard devido à presença simultânea de aminoácidos livres e lactose optou-se por esterilizar o soro hidrolisado em membrana de 0,22 µm, Contudo, a filtração do hidrolisado conduziu a níveis bastante inferiores de concentração celular e nenhuma atividade enzimática, indicando retenção do fator essencial ao crescimento do microrganismo no processo de filtração, possivelmente pela adsorção na membrana ou pela presença de sólidos em suspensão na solução de soro de queijo hidrolisado. Por outro lado, não deve ter ocorrido reação de Maillard na esterilização e se houve não prejudicou significativamente a expressão da enzima.

A hidrólise do soro de queijo em pó mostrou ser a melhor estratégia para produção da PGA, pois permitiu crescimento celular e altas concentrações de enzima em um caldo fermentativo com um teor reduzido de proteínas de alta massa molecular, facilitando etapas de separação/concentração, tal como será discutida posteriormente no item pertinente a purificação da enzima.

Esses ensaios foram reproduzidos em frascos agitados inoculados com células vegetativas armazenadas em glicerol 8% v/v a -70°C para confirmação dos resultados e novamente as concentrações de enzimas em cultivos com soro hidrolisado se igualaram ao cultivo padrão. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.32.

**Tabela 4.32:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos do cultivo de *B. megaterium* em frascos agitados partindo de células vegetativas armazenadas em glicerol 8% v/v a -70°C com soro de queijo hidrolisado.

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Soro Hidrolisado GH= 6,0%	0	7,67	0,18	0
	24	8,69	4,03	606
Padrão	0	7,63	0,17	0
	24	8,67	3,81	661

Meios de cultura composto por soro de queijo hidrolisado foram também utilizados nos cultivos em biorreator a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido. Esses ensaios serão posteriormente apresentados e discutidos no estudo das condições operacionais para produção de PGA por *Bacillus megaterium*.

#### **4.2.4. Conclusões do Item 4.2.: Estudo do Meio de Cultivo**

Estudo da composição de aminoácidos preferenciais permitiu mostrar que níveis de produção de PGA similares aos obtidos com 10,0 g/L de sete aminoácidos preferenciais puderam ser obtidos com 7,0 g/L de seis aminoácidos, com eliminação de treonina. Presença residual de 1,2 g/L de Asp e Glu nesse meio indicava que o meio poderia ainda ser mais otimizado utilizando 6,0 g/L dos seis aminoácidos, após redução em 1,0 g/L da soma de Asp e Glu.

A substituição de aminoácidos por diferentes concentrações de extrato de levedura foi estudada em frascos agitados e bioreator, com variação da forma de alimentação. O uso desse nutriente não permitiu atingir os mesmos níveis de produção de PGA que os obtidos com aminoácidos, devido, possivelmente, ao efeito repressor dos carboidratos presentes e/ou à composição dos aminoácidos presentes no extrato de levedura. Ensaio em biorreator com 10 g/L, seguido de pulsos desse nutriente, permitiu atingir 44% da atividade enzimática obtida com aminoácidos em frascos agitados. Substituição de aminoácidos por água de maceração de milho conduziu a resultados similares aos apresentados por extrato de levedura em frascos agitados e não foi testado em biorreator. Adição de amido, integral e hidrolisado, ao meio não conduziu a aumento na produção da enzima, pois não houve consumo de amido pelo microrganismo nas condições operacionais testadas neste trabalho.

O uso de fenilacetato de potássio de potássio, o indutor, como fonte de carbono e de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, na presença de soro de queijo, conduziu a níveis similares e até um pouco maiores de PGA. Esse nutriente pode assim substituir os aminoácidos na produção da enzima e a decisão de qual fonte de carbono usar parece ser apenas baseada no custo desses nutrientes. Ensaio com fenilacetato de potássio e sulfato de amônio mostrou claramente que somente ocorre consumo de lactose quando há expressão de PGA, o que indica que as enzimas necessárias ao consumo de lactose estão dentro do mesmo “cluster” de genes para expressão de PGA.

Extenso estudo com soro de queijo mostrou que há um fator ainda não identificado presente no permeado necessário para a expressão da enzima, mas que a presença de proteínas também estimula a produção da PGA. Dentre as diversas tentativas de minimização do conteúdo das proteínas presentes do soro, a abordagem que teve mais sucesso foi a hidrólise dessas proteínas com tripsina. O uso de soro hidrolisado conduziu aos mesmos níveis de produção que o soro integral em estudos realizados em frascos agitados e, conforme será discutido adiante, facilitou o processo de recuperação da enzima.

### 4.3. Estudos das Condições Operacionais na Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium*

As principais variáveis operacionais no processo de cultivo aeróbico de microrganismos são a temperatura, o pH e a concentração de oxigênio dissolvido. Neste item serão apresentados resultados pertinentes ao estudo da influência da temperatura e da concentração de oxigênio dissolvido no cultivo de *Bacillus megaterium* para a produção de PGA.

Estudos controlando o pH no meio de cultivo não foram realizados, pois ao longo dos anos todas as tentativas efetuadas no grupo confirmaram a conclusão inicial de Hojo, 1997, de que esse controle conduz a uma produção inferior de enzima, quando comparado com ensaios onde o pH varia livremente. O pH inicial ótimo de cultivo havia sido já determinado ser pH 8,0, valor utilizado na maioria dos ensaios que serão apresentados. O surgimento de uma segunda linhagem de *Bacillus megaterium*, conforme será descrito em detalhes no decorrer deste item, nos motivou a testar novamente essa variável, confirmando que pH 8,0 era o melhor para a linhagem tradicional, embora para a nova linhagem o pH inicial 7,0 conduzisse as mais altas produções de enzima. Deve-se ressaltar que, independente do pH inicial, todos os ensaios convergiam para um pH final próximo de 9,0.

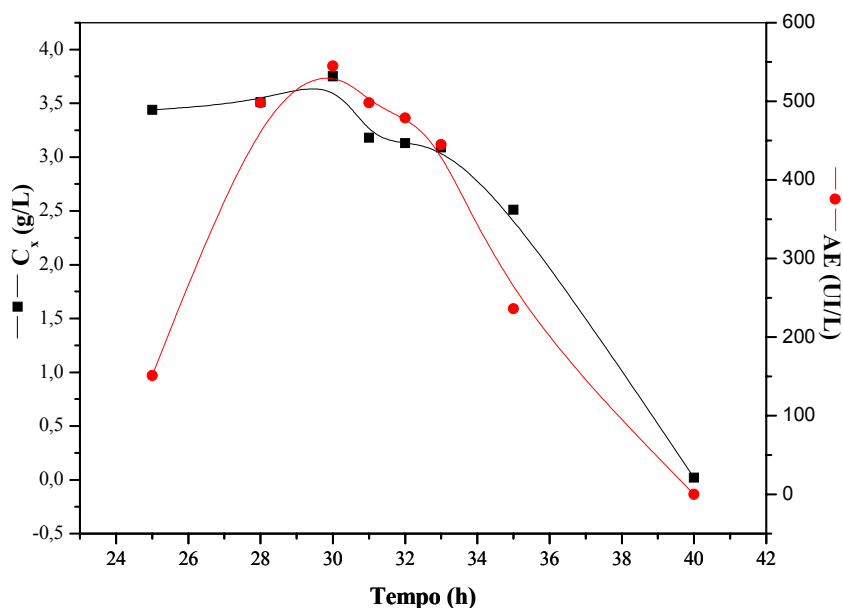
#### 4.3.1. Influência da Temperatura na Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium*

Durante a realização de ensaios sob idênticas condições operacionais, em frascos agitados em duas diferentes câmaras rotativas, ambas com temperatura controlada a 30°C, notou-se que um dos “shakers” apresentava uma variação bastante considerável na temperatura, atingindo valores acima de 35°C. A concentração de enzimas obtida no ensaio padrão realizado na câmara rotativa que teve sua temperatura desregulada, atingiu apenas 250 UI/L, 50% do valor esperado, já que para o lote de criotubos utilizados no decorrer deste trabalho, tem-se obtido valores de atividade enzimática em torno de  $508 \pm 20$  UI/L.

A temperatura afeta consideravelmente a produção da enzima, conforme já sabido e a temperatura de 30°C que vem sendo usada está reportada na literatura como a condição ótima para produção da enzima. Contudo, a significativa influência dessa variável nos induziu a confirmar esse valor ótimo. Dessa forma, investigou-se o efeito da temperatura na produção e expressão da enzima em frascos agitados na faixa de 25 a 40°C inoculados com

células dormentes congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em glicerol 20% v/v provenientes de um único criotubo.

A Figura 4.13 apresenta a influência da temperatura no crescimento celular produção da enzima após 24 horas de cultivo em frascos agitados com meio padrão.



**Figura 4.13:** Influência da temperatura na concentração celular de *Bacillus megaterium* ( $C_x$ ) e produção de penicilina G acilase (AE) em frascos agitados com meio padrão.

Os resultados mostram que para temperaturas na faixa de  $25-33^{\circ}\text{C}$  a concentração de células é bastante semelhante, atingindo sempre um patamar acima de 3,0 g/L após 24 horas de cultivo. Contudo, no que diz respeito à concentração de enzima, pode-se observar um efeito bastante significativo da temperatura nessa variável, como nos casos dos cultivos realizados a 25 e  $35^{\circ}\text{C}$ , onde as atividades enzimáticas alcançaram apenas 151 e 236 UI/L, respectivamente, uma queda de mais de 50% em relação à concentração de enzima obtida no cultivo a  $30^{\circ}\text{C}$ , ou ainda no ensaio realizado a  $40^{\circ}\text{C}$ , onde não se verificou nenhum crescimento celular, nem tão pouco produção da enzima, evidenciando a necessidade de um controle rigoroso de temperatura para produção da PGA.

### 4.3.2. Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium*

Todos os nutrientes necessários aos microrganismos passam por etapas de degradação enzimática de suas moléculas, até chegarem às moléculas menores que possam ser absorvidas pelas células. Na respiração aeróbica, os hidrogênios e respectivos elétrons carregados de energia são retirados das moléculas e entregues para o oxigênio, o receptor final de elétrons nos microrganismos aeróbios, produzindo energia para a formação de ATP. A partir disso, torna-se evidente a importância do oxigênio no metabolismo celular e faz-se necessário o conhecimento aprofundado do papel por ele desempenhado nos cultivos de *B. megaterium* para a produção da enzima.

O estudo da influência da concentração de oxigênio dissolvido no crescimento do microrganismo e produção da PGA foi desenvolvido em biorreator de bancada com capacidade para 2,0 L – Applikon<sup>®</sup>. Foram cultivadas duas diferentes linhagens de *B. megaterium*, que serão denominadas de linhagem tradicional ou linhagem 1 e linhagem nova ou linhagem 2.

O surgimento da linhagem 2 foi fruto de um trabalho paralelo do grupo, que visava o estudo de produção da enzima por outros microrganismos e supunha-se estar cultivando a bactéria *Xanthomonas campestris*.

No andamento do trabalho, incluindo etapas de caracterização e identificação da linhagem, laudo da Fundação André Tosello concluiu que o microrganismo em questão era também *Bacillus megaterium*, uma linhagem diferente, surgida provavelmente de uma contaminação. Esse estudo está descrito detalhadamente na dissertação de Oguri, 2006. Uma vez que se acreditava estar trabalhando com outra espécie de bactéria, cabia investigar que condições operacionais eram as mais adequadas para produção de PGA por esse microrganismo.

#### 4.3.2.1. Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de PGA com a Nova Linhagem de *B. megaterium*

A Tabela 4.33 apresenta as diferentes estratégias utilizadas para o estudo da influência da concentração de oxigênio no cultivo da nova linhagem de *B. megaterium*. As composições dos meios suplementares estão descritas na discussão de cada ensaio.



**Tabela 4.33:** Descrição resumida dos ensaios realizados em biorreator de bancada para estudos da influência do oxigênio dissolvido na produção de PGA por *B. megaterium* 2 conservado em meio sólido a 4°C – “slants”.

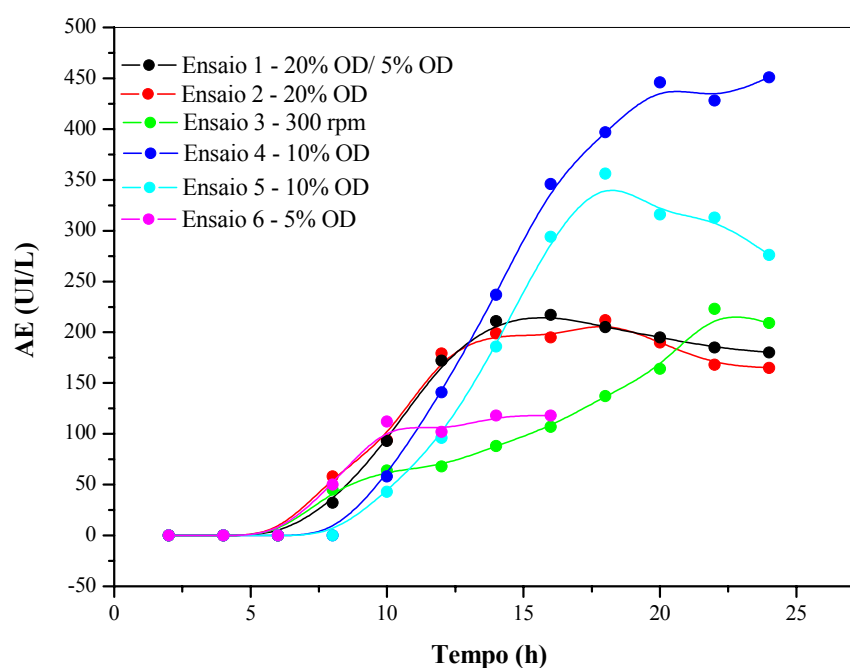
Ensaio	Concentração de Oxigênio Dissolvido (% saturação)	Velocidade de Agitação (rpm)	Meio de Produção
1	20 – 5 após 9 horas de cultivo	Variável	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 7,0
2	20%	Variável	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 7,0
3	Variável	300	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 7,0 Adição de 1 pulso de alimentação
4	10	Variável	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 7,0
5	10	Variável	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 7,0 Adição de 3 pulsos de alimentação
6	5 – 10 após 17 horas de cultivo	Variável	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 7,0 Adição de 5 pulsos de alimentação

As condições de processo fixadas para todos os ensaios em biorreator de 2,0 L com meio de cultivo padrão foram: aeração com 1,0 vvm, temperatura mantida a 30°C e ausência de controle de pH, ajustado inicialmente no valor de 7,0, diferentemente dos ensaios com a linhagem tradicional, cujo cultivo iniciava-se a pH 8,0.

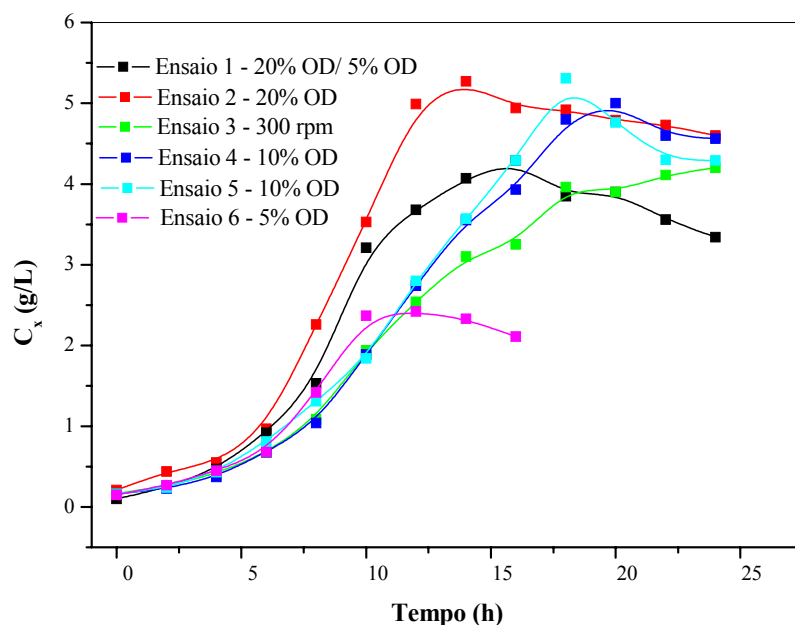
Paralelamente a cada cultivo realizado em biorreator foi feito um ensaio em shaker – com temperatura controlada em 30°C e agitação de 300 rpm - para verificar se haveria diferença na produção de PGA entre esses dois modos e também, para se ter um controle do nível máximo da atividade enzimática e da 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 após 24 horas de incubação.

As evoluções do crescimento do microrganismo e produção da enzima para cada diferente concentração de oxigênio dissolvido estudada estão ilustradas individualmente nas Figuras e Tabelas apresentadas no Anexo 4.

A seguir a Figura 4.14 A e B apresenta um comparativo entre os ensaios realizados em biorreator para investigar a influência das diferentes concentrações de oxigênio dissolvido na produção da enzima (A) e crescimento do microrganismo (B), partindo de células dormentes da nova linhagem de *B. megaterium* conservadas em meio sólido a 4°C.



(A)



(B)

**Figura 4.14:** Comparação entre os ensaios em biorreator a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido e inoculados com esporos da nova linhagem de *B. megaterium* conservadas em meio sólido a 4°C – (A) Valores de atividade enzimática (AE) e (B) concentração celular (C<sub>x</sub>).

Limitar a concentração de oxigênio dissolvido de 20 para 5% da saturação, Ensaio 1, havia se mostrado como a melhor estratégia no trabalho de Visnardi, 1997, contudo, para a nova linhagem de *B. megaterium*, embora se tenha uma massa celular pronunciada, com pico de 4,29 g/L e velocidade específica de crescimento de 0,34 h<sup>-1</sup>, essa condição conduziu a concentração de enzima inferior à dos frascos agitados, alcançando 217 UI/L, apenas 66% do valor obtido em câmara rotativa, 331 UI/L. A atividade específica máxima para este ensaio foi de 54,0 UI/g<sub>célula</sub>.

Para o ensaio com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20 % da saturação durante todo cultivo, Ensaio 2, novamente observa-se que a máxima concentração de enzima em frascos agitados, 427 UI/L, foi maior que a máxima atividade enzimática alcançada em biorreator, 212 UI/L. No entanto, o crescimento celular parece ter sido favorecido nessa condição, atingindo 5,27 g/L com células crescendo a uma velocidade específica de 0,32 h<sup>-1</sup> e máxima atividade específica ainda menor se comparada ao ensaio anterior, 43,09 UI/g<sub>célula</sub>.

Uma vez que a maior produção de enzima vinha sendo observada em frascos agitados, decidiu-se reproduzir em biorreator a condição de agitação fixada em mesa incubadora, velocidade de agitação controlada em 300 rpm, Ensaio 3. Analisando-se os resultados até 24 horas (momento em que foi adicionado o pulso de nutrientes), verifica-se uma velocidade específica de crescimento igual a  $0,24 \text{ h}^{-1}$  com uma concentração celular máxima igual a  $4,20 \text{ g/L}$  em 24 horas de cultivo, e um pico de atividade enzimática,  $223 \text{ UI/L}$ , em 22 horas. Após 24 horas de cultivo, observa-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, cuja composição era semelhante à do meio de produção. Após a suplementação do cultivo ocorre um pico na atividade da enzima, chegando a  $247 \text{ UI/L}$ , mas ainda não alcançando a produção em frascos agitados,  $407 \text{ UI/L}$ . A adição de nutrientes na forma de pulso conduziu a um aumento na atividade específica máxima, passando de  $54,26 \text{ UI/g}_{\text{célula}}$  para  $64,80 \text{ UI/g}_{\text{célula}}$ .

A observação da Figura 4.14 (A) mostra que nos cultivos com oxigênio dissolvido em 10% da saturação, Ensaios 4 e 5, a produção da PGA foi a mais elevada comparando-se todas as concentrações estudadas, chegando em torno de 450 e 360 UI/L, respectivamente. Além disso, a concentração de enzima em biorreator, alcançou valores semelhantes ou superiores aos obtidos em ensaios padrão em frascos agitados. Essa estratégia parece assim ser a mais adequada para promover um crescimento satisfatório do microrganismo, a uma velocidade específica de  $0,26 \text{ h}^{-1}$ , e conduzir no Ensaio 5 a uma atividade específica de  $98,90 \text{ UI/g}_{\text{célula}}$ , a mais alta produtividade da enzima obtida nesse estudo.

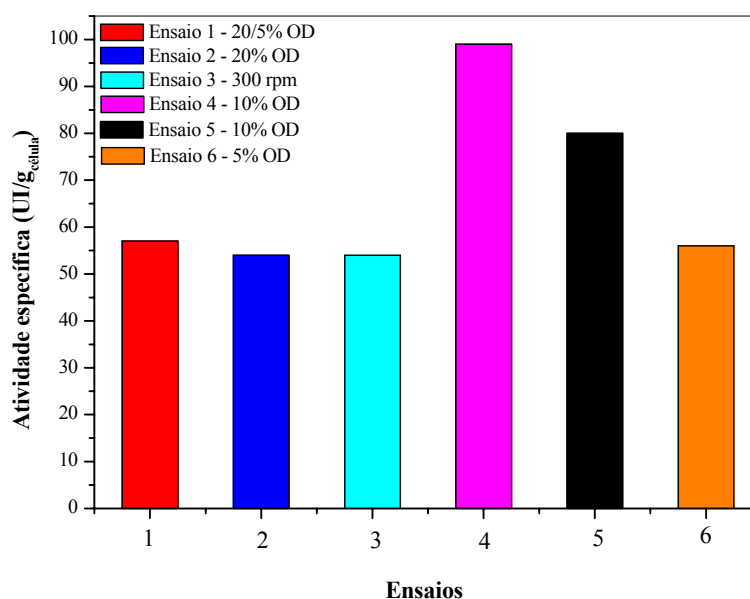
Além de confirmar os resultados do Ensaio 4, no Ensaio 5 investigou-se também a adição de pulsos de alimentação, de forma a acrescentar possíveis nutrientes esgotados no decorrer do cultivo. Esses pulsos tinham composição e concentração semelhante ao meio inicial de produção e foram adicionados em três etapas de 100 mL a 24, 30 e 40 horas de cultivo. A suplementação era feita quando se observava uma queda na concentração celular, sinal que algum nutriente importante para o crescimento do microrganismo havia se exaurido. O efeito da adição de pulso sobre o crescimento do microrganismo e produção da enzima está ilustrado no Anexo 5a. A estratégia mostrou-se bastante eficiente, pois a cada pulso adicionado houve uma elevação nos níveis de crescimento celular e atividade enzimática, que permaneceram praticamente constantes, em torno de  $490 \text{ UI/L}$ , em 42 horas de cultivo.

Limitando-se a concentração de oxigênio dissolvido em 5% de saturação, Ensaio 6, provocou-se uma restrição no crescimento do microrganismo, com células crescendo a uma velocidade de  $0,12 \text{ h}^{-1}$ , enquanto que a velocidade de crescimento característica de *Bacillus megaterium* 2 é em torno de  $0,30 \text{ h}^{-1}$ . A observação da Figura 4.14 (B) mostra que após 12 horas de cultivo, os níveis de crescimento celular diminuem após alcançarem apenas  $2,42 \text{ g/L}$ , enquanto se esperava uma concentração de células em torno de  $3,50 \text{ g/L}$ , tal como nos demais ensaios. A produção da enzima foi também afetada negativamente por essa limitação. A concentração de oxigênio dissolvido foi então aumentada para 10% da saturação após 17 horas de cultivo, conduzindo a uma retomada no crescimento celular, chegando  $4,34 \text{ g/L}$  de células e  $202 \text{ UI/L}$  de enzimas. Essa menor produção quando comparada ao ensaio com manutenção da concentração de oxigênio em 10% da saturação desde o início do cultivo, mostra que embora do ponto de vista do crescimento do microrganismo tenha ocorrido apenas um pequeno atraso, houve uma perda irrecuperável na síntese e expressão da enzima com a limitação de oxigênio em 5% da saturação. A adição de pulsos foi também investigada nesse ensaio como uma tentativa de favorecer a produção da PGA. Foram adicionados cinco pulsos, sendo que os quatro primeiros, de  $100 \text{ mL}$ , tinham composição e concentração iguais ao meio de produção inicial e foram adicionados em 30, 42, 50 e 54 horas de cultivo. O último pulso, de  $300 \text{ mL}$ , por sua vez, era composto por  $2,0 \text{ g/L}$  de sulfato de amônio e  $3,5 \text{ g/L}$  de fenilacetato de potássio, adicionada ao meio após 56 horas de cultivo.

A adição dos 4 pulsos (30, 42, 50 e 54 horas), de composição semelhante ao meio padrão, permitiram a manutenção do crescimento celular e aumento na produção da enzima, que alcançou o pico ( $252 \text{ UI/L}$ ) em 56 horas, resultados apresentados no Anexo 5a. Uma última tentativa de favorecimento da produção da PGA foi realizada adicionando-se, em 56 horas de cultivo, um pulso de  $300 \text{ mL}$  composto por sulfato de amônio  $2,0 \text{ g/L}$  e fenilacetato de potássio  $3,5 \text{ g/L}$  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,  $250 \text{ UI/L}$ , em 62 horas de cultivo, valor este praticamente igual ao alcançado com os primeiros pulsos. A baixa concentração de enzimas nesse cultivo, mesmo após a adição dos pulsos parece estar mais relacionada com a limitação na concentração de oxigênio na fase de crescimento exponencial do microrganismo do que com os requerimentos nutricionais, pois a cada suplementação do meio observava-se uma retomada na concentração de células.

É interessante notar, pela observação das Figuras 4.14 (A) e 4.14 (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 4 e 5 apresentarem maior produção da enzima, os Ensaios 1 e 2 com oxigênio dissolvido em 20% na fase exponencial, mostraram crescimento celular mais acentuado neste período.

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* 2 armazenado como células dormentes em meio sólido a 4°C. Resultado este que pode ser também confirmado comparando-se as atividades específicas, em UI/g<sub>célula</sub>, apresentadas na Figura 4.15.



**Figura 4.15:** Valores máximos de atividade específica nos ensaios com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em biorreator inoculados com células dormentes da nova linhagem de *Bacillus megaterium* conservadas em meio sólido a 4°C – slants.

#### 4.3.2.2. Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de PGA com a Linhagem Tradicional de *B. megaterium*

A influência da concentração de oxigênio dissolvido na produção da enzima foi também investigada em ensaios com a linhagem tradicional de *Bacillus megaterium*. Duas

diferentes composições de meio de cultivo foram investigadas: a) meio padrão, com soro de queijo integral e b) soro de queijo hidrolisado.

#### **4.3.2.2.a. Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de PGA por *B. megaterium* 1 em Meio de Cultivo Padrão – Soro de Queijo Integral**

Ao se obter o laudo de que o microrganismo que acreditávamos ser *X. campestris* era na verdade *B. megaterium* tentou-se estender para a linhagem tradicional as conclusões já obtidas com a nova linhagem, cujos resultados foram apresentados no item anterior.

O estudo anterior havia mostrado claramente que manter a concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação era a melhor condição para a produção de enzima. Foram, pois, realizados dois ensaios mantendo 10% de oxigênio dissolvido no meio, um com pH inicial 7,0 e outro com pH 8,0, pois estudos específicos sobre a influência do pH inicial de cultivo mostraram que para as linhagens nova e tradicional o pH ótimo para produção da enzima era 7,0 e 8,0, respectivamente. (Oguri, 2006).

Deve-se ressaltar que a nova linhagem vinha sendo conservada como células dormentes em meio sólido a 4°C, e que por esse motivo, os ensaios realizados com oxigênio dissolvido a 10% da saturação, Ensaios 7 e 8, foram também inoculados com esporos provenientes de “slants”. Esporos conservados em meio sólido a 4°C provenientes da linhagem tradicional de *B. megaterium* permaneceram incubados a 30°C e 300 rpm por um período de aproximadamente 12 horas para que se alcançassem concentrações de células em torno de  $1,53 \pm 0,12$  g/L, enquanto que para a nova linhagem o tempo de inóculo estava em torno de 24 horas.

Na seqüência, realizaram-se, ainda com células dormentes, dois ensaios com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido a 20% da saturação, com pH iniciais de 7,0 e 8,0 (Ensaios 9 e 10). No entanto, para este último ensaio, ao se iniciar o cultivo detectou-se uma falha no sensor de oxigênio impossibilitando a calibração do eletrodo e, conseqüentemente a leitura da concentração real no meio de cultura. Para que se pudesse aproveitar esse ensaio, optou-se por utilizar um perfil crescente de agitação, visando reproduzir um ensaio anterior em que a concentração de oxigênio dissolvido foi controlada em 20% durante todo cultivo.

A partir desse último cultivo pode-se estabelecer uma condição ótima de aeração e esta foi investigada em diferentes cultivos partindo de células vegetativas

congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  (Ensaio 11, 12 e 13). A única diferença entre os Ensaio 11 e 12 foi o pH do meio de cultura, inicialmente ajustado para 9,0 e 8,0, respectivamente. Já o Ensaio 13 trata-se de uma batelada alimentada, reproduzindo o perfil crescente de agitação, a pH inicial 8,0. Foi também investigada a limitação na concentração de oxigênio dissolvido de 20 para 5% da saturação após 8 horas de cultivo, Ensaio 14. A descrição dos ensaios com a linhagem tradicional de *B. megaterium* em biorreator utilizando meio de cultivo padrão estão apresentadas na Tabela 4.34.

**Tabela 4.34:** Descrição resumida dos ensaios realizados para estudos da influência do oxigênio dissolvido na produção de PGA em biorreator pela linhagem tradicional de *B. megaterium*

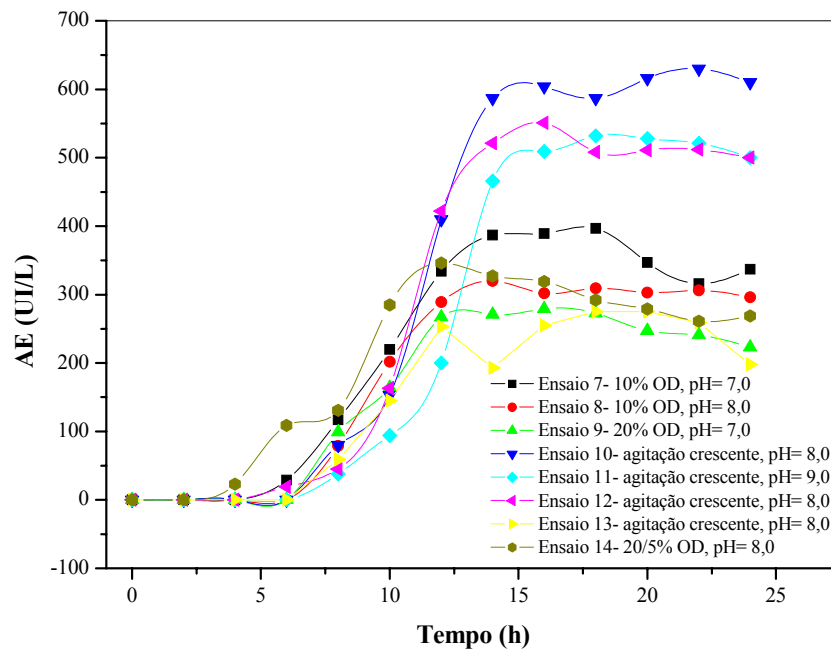
Ensaio	Oxigênio Dissolvido (% saturação)	Velocidade de Agitação (rpm)	Inóculo	Meio de Produção
7	10	Variável	slant	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 7,0
8	10	Variável	slant	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 8,0
9	20	Variável	slant	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 7,0
10	-	Perfil crescente	slant	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 8,0
11	Variável	Perfil crescente	eppendorf	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 9,0
12	Variável	Perfil crescente	eppendorf	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 8,0
13	Variável	Perfil crescente	eppendorf	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 8,0 Batelada alimentada
14	20 – 5 Após 8 h	Variável	eppendorf	Padrão pH <sub>inicial</sub> = 8,0

Cada ensaio em biorreator foi acompanhado por cultivos em frascos agitados para controle da máxima atividade enzimática e viabilidade do inóculo. Os valores de concentração celular e atividade enzimática ao longo dos cultivos em biorreator e seus respectivos ensaios em câmara rotativa estão apresentados nas Figuras e Tabelas do Anexo

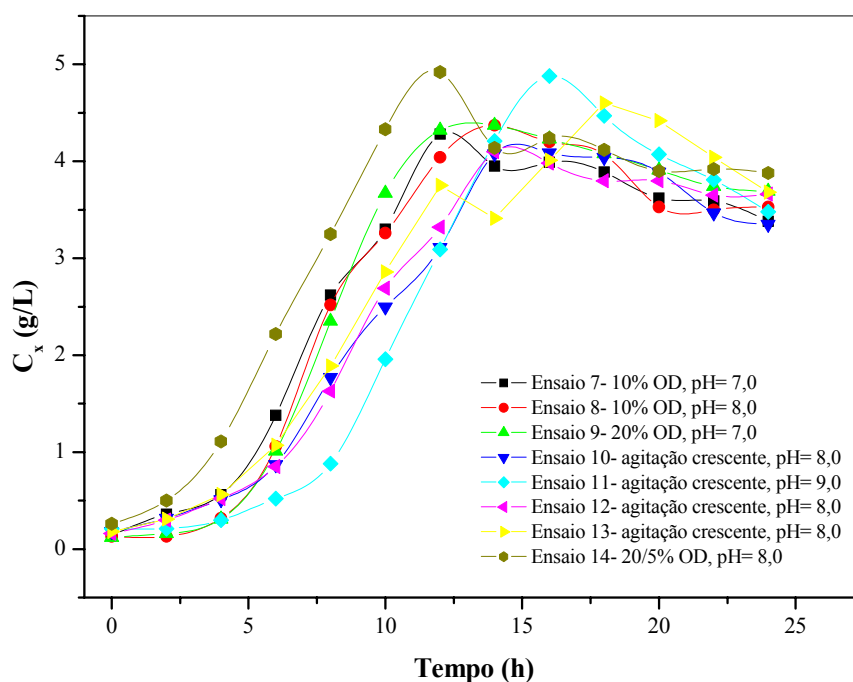


5b, juntamente com os perfis de consumo de substratos e acompanhamento das variáveis operacionais pelo sistema de aquisição de dados.

A Figura 4.16 apresenta uma comparação entre os ensaios realizados em biorreator para estudo da influência da concentração de oxigênio dissolvido na produção de PGA em cultivos com meio padrão inoculados com a linhagem tradicional de *Bacillus megaterium*.



(A)



(B)

**Figura 4.16:** Comparação entre os ensaios em biorreator a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em meio de cultivo padrão, com soro de queijo integral e inoculados com a linhagem tradicional de *Bacillus megaterium* – (A) Valores de atividade enzimática (AE) e (B) Valores de concentração celular ( $C_x$ ).

A concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação, embora tenha permitido satisfatório crescimento do microrganismo a velocidades específicas máximas  $0,36$  e  $0,51 \text{ h}^{-1}$ , para o Ensaio 7 e 8, respectivamente, não superou a produção de enzima obtida em frascos agitados, tal como foi verificado com a nova linhagem. As máximas atividades enzimáticas em biorreator alcançaram  $397$  e  $329 \text{ UI/L}$ , enquanto que em frascos agitados a concentração de enzima chegou em torno de  $550 \text{ UI/L}$ , indicando um requerimento de oxigênio diferente para as duas linhagens de *B. megaterium* estudadas. A manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação nos Ensaios 7 e 8 conduziu a máximas atividades específicas de  $102,06$  e  $87,43 \text{ UI/g}_{\text{célula}}$ .

Embora a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação, Ensaio 9, tenha conduzido a uma concentração celular de  $4,37 \text{ g/L}$ , com velocidade específica de crescimento igual a  $0,46 \text{ h}^{-1}$ , a atividade enzimática alcançou níveis bastante inferiores aos obtidos em frascos agitados,  $279 \text{ UI/L}$ , enquanto que em câmara rotativa a

produção de PGA chegou a 573 UI/L e 611 UI/L em meios de cultivo com pHs iniciais 7,0 e 8,0, respectivamente.

No Ensaio 10, o perfil crescente de agitação conduziu a um crescimento acentuado do microrganismo a uma velocidade específica de  $0,28 \text{ h}^{-1}$ , alcançando concentrações de células acima de 4,0 g/L e produção associada da enzima, com máxima atividade enzimática, 630 UI/L, níveis bastante próximos aos obtidos em frascos agitados e os mais elevados obtidos nesse trabalho, assim como a atividade específica,  $182,09 \text{ UI/g}_{\text{célula}}$ .

Essa condição foi reproduzida em outro cultivo, Ensaio 11, inoculado com células vegetativas provenientes de caldos de cultura armazenadas em glicerol 8% v/v a  $-70^{\circ}\text{C}$ , e agora com a leitura correta da concentração de oxigênio dissolvido, que na verdade acusavam concentrações em torno de 0% da saturação, contudo, essa condição limitada parece ter favorecido o crescimento do microrganismo, que alcançou uma concentração celular de 4,88 g/L, com células crescendo a uma velocidade específica de  $0,31 \text{ h}^{-1}$ , e a expressão da PGA, pois novamente, a produção de enzima foi bastante próxima à obtida em câmara rotativa, com máxima atividade enzimática, 532 UI/L. A máxima atividade específica para esse ensaio alcançou 143,68 UI/L.

Deve-se ressaltar que até as 2 horas de cultivo não houve nenhum crescimento celular, possivelmente pelo fato do pH inicial do meio de cultura erroneamente não ter sido ajustado para 8,0 e sim para 9,0. Ao detectar-se esta falha, adicionou-se ao cultivo uma solução estéril de HCl 1,0 M para ajuste do pH em 8,0, o valor ótimo observado para crescimento do microrganismo e produção da enzima por essa linhagem de *B. megaterium*. Essa estratégia mostrou-se adequada, pois já na análise de densidade ótica da amostra seguinte, retirada após 4 horas de cultivo, observou-se retomada no crescimento celular, confirmada pelo aumento na fração molar de  $\text{CO}_2$ , resultados apresentados nas Figuras do Anexo 5b, referentes ao Ensaio 11.

Com relação ao consumo de substratos, também ilustrados no Anexo 5b, após 14 horas de cultivo, todos os aminoácidos, com exceção de ácido glutâmico e ácido aspártico, já haviam sido completamente exauridos, restando ao final do cultivo uma concentração de 4,45 g/L de aminoácidos, sendo 1,68 g/L e 2,77 g/L de Asp e Glu, respectivamente, com consumo total de fenilacetato de potássio. A distribuição de massa molecular mostra aumento na concentração das proteínas menores ao longo do cultivo, que passou de 0,064 g/L para 0,19 g/L após 24 horas, indicando a produção de proteases. As análises tradicionais de detecção de atividade protease não indicaram formação destas, possivelmente por estarem em

níveis inferiores aos limites de detecção dos métodos anteriormente utilizados (hidrólise de caseína, azocaseína, gelatina).

O Ensaio 12 mostra que o microrganismo conservado como células vegetativas respondeu igualmente ao inoculado com esporos conservados em “slant” ao perfil crescente de agitação, crescendo a uma velocidade específica de  $0,28 \text{ h}^{-1}$  e alcançando uma concentração de enzima acima de 550 UI/L, para um padrão de 638 UI/L em frascos agitados. A queda na concentração de células coincide com a fase de desaceleração na respiração do microrganismo e aumento na concentração de oxigênio dissolvido no meio. Ao final do cultivo ainda restavam mais de 50% das concentrações iniciais dos ácidos aspártico e glutâmico, tendo os outros cinco aminoácidos e o indutor fenilacetato de potássio sido completamente exauridos após 18 horas. Ao se acompanhar a concentração de células vegetativas e de esporos, somente conseguiu-se detectar células dormentes em 24 horas ( $3,6 \times 10^6$  células/mL), em concentração cerca de 500 vezes menor que a de células vegetativas ( $1,60 \times 10^9$  células/mL). O meio de cultivo, rico em aminoácidos, pode inibir a esporulação, prolongando o estado de transição onde os controles estão afrouxados e a célula expressa todas as funções disponíveis de modo a permitir sobrevivência com o maior número de substratos possível. Há necessidade assim de acompanhamento dessa variável em mais ensaios para se verificar a sua possível relação com a produção da enzima.

No Ensaio 13, a evolução da concentração de células vegetativas e esporos foi acompanhada ao longo de uma batelada alimentada com uma solução de igual composição a do meio de cultura inicial, adicionada a uma vazão de 180 mL/h a partir de 8 horas de cultivo. Problemas operacionais com o sistema de alimentação, levaram a adição de um pulso de nutrientes de aproximadamente 800 mL após 13 horas de cultivo. Esse volume interferiu negativamente nas medidas de crescimento celular e atividade enzimática, mascarando os valores reais de concentrações de células e enzima apresentados na Figura 4.16. Os resultados mostram que a concentração de enzima vinha aumentando nos mesmos níveis que nos demais ensaios com perfil crescente de agitação, alcançando 253 UI/L em 12 horas de cultivo, no entanto, a amostra de 14 horas, onde esperava-se o dobro de enzimas teve sua atividade enzimática reduzida a 193 UI/L. Cabe ressaltar que esse ensaio foi iniciado com um volume de 1,2 L de meio de produção, com retirada de aproximadamente 60 mL de caldo a cada intervalo de duas horas, restando no momento da entrada do pulso um volume em torno de 900 mL, ou seja, a adição de 800 mL de solução praticamente reduziu praticamente à metade a concentração de enzimas e células, sendo que a diluição dessa última foi compensada pelo

aumento da absorvância decorrente da coloração escura do soro de queijo presente na solução de alimentação.

Com relação à formação de esporos observa-se que mesmo após 48 horas de cultivo, onde a concentração de células dormentes é máxima, a concentração de células vegetativas ainda é duzentas vezes maior, confirmando que a presença de aminoácidos no meio de cultivo inibe a formação acentuada de esporos.

A suplementação do cultivo iniciada após 8 horas a uma vazão de 180 mL/h parece ter sido uma boa estratégia para crescimento do microrganismo e produção associada da enzima, pois permitiu a adição de nutrientes em concentrações tais que fossem rapidamente assimiláveis pelo microrganismo e não causassem inibição na expressão da enzima, pois nota-se que tanto os aminoácidos como fenilacetato de potássio vinham sendo consumidos com a mesma velocidade que antes da alimentação. No entanto, a adição do pulso (14 horas) conduziu a um acúmulo de nutrientes, que foram completamente exauridos após 20 horas de cultivo, salvo os ácidos aspártico e glutâmico, que permaneceram remanescentes até o final de 48 horas, embora com concentrações menores do que aquela que se observou ao final de 24 horas nos cultivos anteriores totalizando 1,60 g/L de aminoácidos. A cada suplementação do cultivo observa-se uma retomada no crescimento do microrganismo, acompanhado pelo aumento na fração de CO<sub>2</sub> produzido. No entanto, a zona de máxima produção de PGA está em torno de 12-18 horas de cultivo, período em que ocorre a desaceleração da respiração celular, já na ausência de alguns aminoácidos alanina, arginina, treonina e serina. Esse comportamento está em concordância com os demais cultivos, que sempre apresentaram maior expressão da enzima na fase estacionária de crescimento do microrganismo.

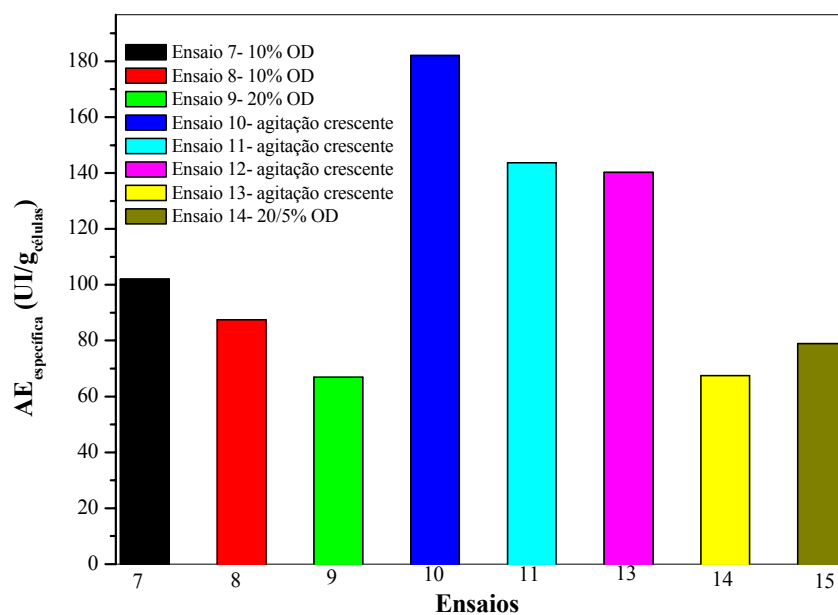
A limitação de oxigênio dissolvido de 20 para 5% da saturação, Ensaio 14 parece ter favorecido o crescimento do microrganismo, pois após as 8 horas de cultivo, momento em que é feita a redução na concentração deste, observa-se uma retomada na formação de CO<sub>2</sub>, indicando uma nova aceleração da respiração celular conduzindo a uma concentração de células de 4,92 g/L em 12 horas. A produção da enzima, 346 UI/L, contudo não alcançando o mesmo patamar obtido em frascos agitados, 461 UI/L. Essa estratégia, porém inibiu a formação de esporos, que até o final do cultivo não se mostraram presentes nas amostras analisadas.

A distribuição de massas moleculares mostra consumo de proteínas intermediárias (0,5-14 kDa) até as 12 horas de cultivo, já após as 18 horas, observa-se uma evolução na concentração dessas mesmas proteínas, bem como na concentração de peptídeos

menores, o que nos parece ser uma evidência clara da formação de proteases durante o cultivo, mas em concentrações razoavelmente pequenas de modo a não ser detectadas pelos diferentes métodos de análises proteolíticas e nem hidrolisar significativamente a PGA, já que a diminuição nos níveis de atividade enzimática estão sempre dentro do desvio padrão e em alguns casos essa queda nem foi observada. A presença dos ácidos aspártico e glutâmico ao final do cultivo confirmaram a contribuição em excesso desses dois aminoácidos, tal como vinha sendo apresentada nos ensaios anteriores.

De acordo com os resultados apresentados observa-se que os cultivos com perfil crescente de agitação superaram significativamente a produção de PGA dos demais ensaios, alcançando praticamente o dobro da concentração de enzimas dos cultivos com controle da concentração de oxigênio dissolvido. A produção da enzima parece ocorrer realmente sob condições de “stress”, já que esse perfil de agitação conduzia a concentrações de oxigênio dissolvido em torno de 0% da saturação, confirmando os resultados reportados por De-Leon e colaboradores, 2006, que alcançaram máxima produção de PGA produzida por *E. coli* recombinante em condições bastante limitadas de oxigênio dissolvido, na faixa de 1,0% da saturação. O crescimento do microrganismo parece não ter sido influenciado positivamente por esse perfil de agitação, alcançando valores de concentração celular muito próximos dos obtidos com 10 e 20% de oxigênio dissolvido. Cabe ressaltar que a estratégia de limitação após 8 horas de cultivo parece ter favorecido a formação de células, conduzindo a mais alta concentração celular atingida, 4,92 g/L.

Nota-se, tal como foi observado no estudo da concentração de oxigênio dissolvido na produção de PGA pela nova linhagem de *B. megaterium*, 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. Pode-se concluir que o perfil crescente de agitação foi a condição mais favorável para a produção de PGA pela linhagem tradicional de *Bacillus megaterium*, resultado confirmado também ao se comparar as atividades específicas, em UI/g<sub>célula</sub>, ilustradas na Figura 4.17.



**Figura 4.17:** Valores máximos de atividade específica nos ensaios com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em biorreator com meio de cultivo padrão partindo da linhagem tradicional de *Bacillus megaterium*.

#### 4.3.2.2.b. Influência da Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de PGA por *B. megaterium* 1 em Meio de Cultivo com Soro de Queijo Hidrolisado.

Passamos então a investigar a influência da concentração do oxigênio dissolvido em meio de cultivo com soro de queijo hidrolisado, na tentativa de estabelecer para essa composição a melhor condição para crescimento do microrganismo e produção da enzima. Foram, pois realizados ensaios reproduzindo as condições ótimas de aeração obtidas com as duas linhagens de *B. megaterium*, perfil crescente de agitação e controle da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação, bem como manutenção da concentração em 20% e limitação de 20 para 5% após 8 horas de cultivo.

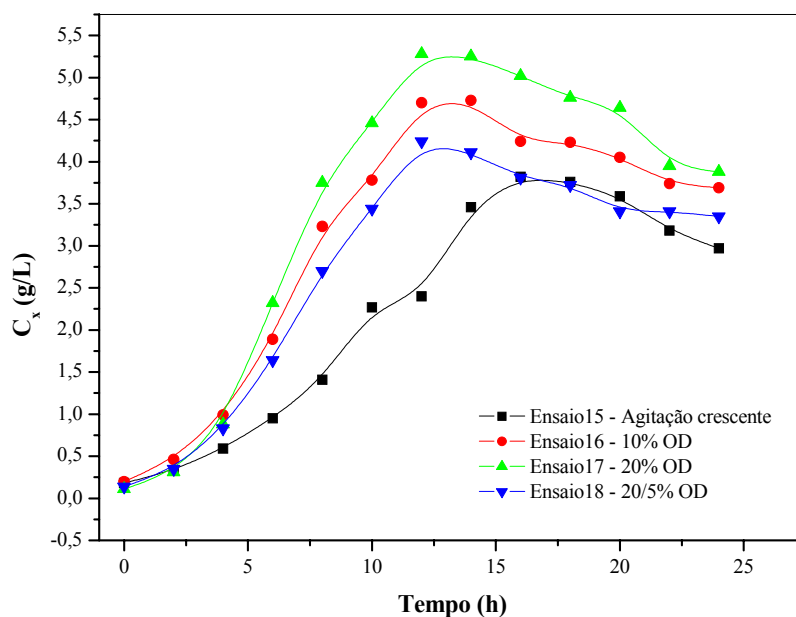
A Tabela 4.35 apresenta as diferentes estratégias utilizadas para o estudo da influência de oxigênio dissolvido em cultivos de *B. megaterium* (linhagem tradicional) em meio contendo soro de queijo hidrolisado.

**Tabela 4.35:** Descrição resumida dos ensaios realizados para estudos da influência da concentração de oxigênio dissolvido na produção de PGA pela linhagem tradicional de *B. megaterium* em meio de cultivo contendo soro de queijo hidrolisado.

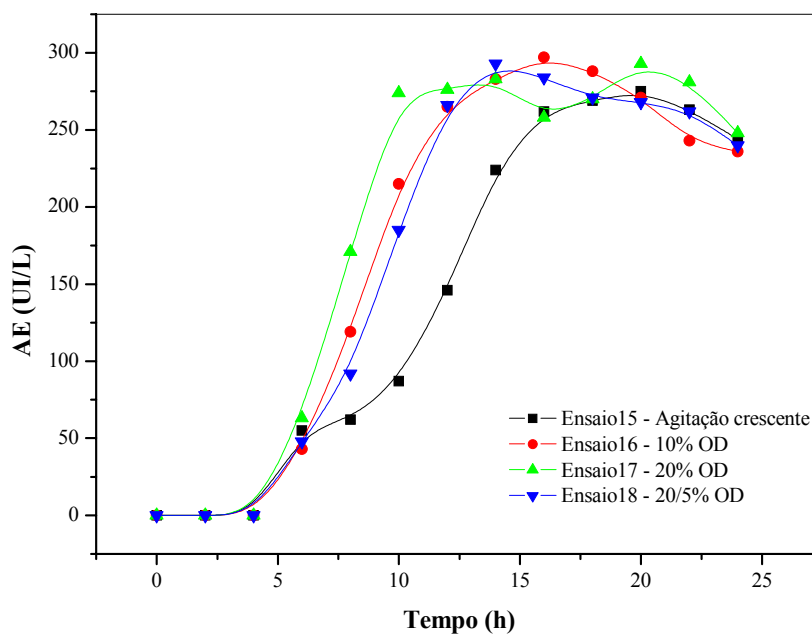
Ensaio	Oxigênio Dissolvido (% saturação)	Velocidade de Agitação (rpm)	Inóculo	Meio de Produção
15	Variável	Perfil crescente	eppendorf	Soro hidrolisado pH <sub>inicial</sub> = 8,0
16	10	Variável	eppendorf	Soro hidrolisado pH <sub>inicial</sub> = 8,0
17	20	Variável	eppendorf	Soro hidrolisado pH <sub>inicial</sub> = 8,0
18	20 – 5	Variável	eppendorf	Soro hidrolisado pH <sub>inicial</sub> = 8,0

A Figura 4.18 (A) mostra que nos cultivos com soro de queijo hidrolisado o crescimento do microrganismo não foi favorecido por condições limitadas de oxigênio dissolvido. Perfil crescente de agitação (Ensaio 15) e limitação na concentração de oxigênio dissolvido de 20 para 5% da saturação após 8 horas de cultivo (Ensaio 18), conduziram a valores de concentração celular e máxima velocidade específica de crescimento em torno de 4,0 g/L e 0,26 h<sup>-1</sup>, enquanto que a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10 e 20% da saturação, Ensaio 16 e 17, promoveu máxima concentração de células de 4,73 e 5,28 g/L, respectivamente, com máxima velocidade específica de crescimento acima de 0,4 h<sup>-1</sup>, para ambos ensaios.





(A)



(B)

**Figura 4.18:** Comparação entre os ensaios em biorreator a diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em meio de cultivo com soro de queijo hidrolisado e inoculados com a linhagem tradicional de *Bacillus megaterium* – (A) Valores de atividade enzimática (AE) e (B) concentração celular ( $C_x$ ).

Uma vez que o perfil crescente de agitação mostrou-se como condição ótima para a produção de PGA em cultivos com soro integral (padrão), esperava-se que na presença de soro hidrolisado essa estratégia conduzisse a níveis de atividade enzimática semelhantes aos obtidos nos ensaios padrão e com soro hidrolisado em frascos agitados. No entanto, em biorreator, a máxima concentração de enzima alcançou apenas 42% daquela obtida em câmara rotativa, ou seja, 275 UI/L, para um padrão (soro integral) de 619 UI/L e 660 UI/L em meio similar (soro hidrolisado).

A baixa atividade enzimática alcançada em biorreator utilizando soro hidrolisado com perfil crescente de agitação, é de difícil explicação, já que em câmara rotativa resultados similares foram obtidos com as duas composições de meio de cultura, soro integral e hidrolisado. As análises dos resultados nos remetem a três possibilidades: A) a presença de pequenos peptídeos no soro hidrolisado, nas condições de oxigênio dissolvido no biorreator, favorece a produção de proteases, que inativam parte das moléculas de PGA produzidas, conduzindo a uma menor atividade aparente, B) a presença de aminoácidos ou pequenos peptídeos gerados no hidrolisado das proteínas do soro de queijo interferem com a regulação da expressão da enzima, ou C) a produção da PGA é dependente da morfologia do microrganismo, já que cultivos partindo de células dormentes parecem favorecidos com respeito à produção da enzima. Essa última hipótese foi atribuída ao fato de se iniciar um cultivo numa condição extrema de pH ( $\text{pH}_{\text{inicial}} = 9,0$ ) para o crescimento do microrganismo, com secreção pelo microrganismo de algum fator que favorecesse a produção da enzima, o qual também seria secretado durante a germinação ao se partir de microrganismos conservados na forma de esporos.

As hipóteses A e B foram investigadas através de medidas de atividade proteolítica nos caldos de cultivo, as quais não detectaram a presença de proteases, e também pela distribuição das massas moleculares das proteínas presentes no meio de cultura ao longo do processo fermentativo, apresentadas no Anexo 5b.

Observou-se um aumento na concentração das proteínas de menor massa molecular (abaixo de 0,5 kDa) ao longo do tempo, possivelmente originadas pela ação de alguma protease produzida durante o cultivo, cuja presença não foi marcante o suficiente para ser detectada nos métodos anteriormente utilizados. Além disso, nesses outros métodos (hidrólise de caseína, de azocaseína, de gelatina) o tempo de hidrólise era inferior a uma hora enquanto que no cultivo a protease produzida pode agir durante várias horas. Uma metodologia mais sofisticada como a utilizada agora permite verificar que, embora pequeno, há consumo das proteínas (0,030 g/L.h) e, portanto, produção de proteases. Algumas

condições de aeração em bioreator podem ter conduzido a um aumento na produção de proteases, com conseqüente inativação da PGA produzida. Assim, não se pode descartar essa hipótese.

A hipótese C havia sido enzimática semelhantes tanto nos cultivos partindo de células dormentes como investigada através da realização do ensaio com o perfil crescente de agitação usando células vegetativas congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  como inóculo, onde não se verificou nenhuma diferença marcante em relação à produção da enzima, alcançando níveis de atividades incubados com células vegetativas.

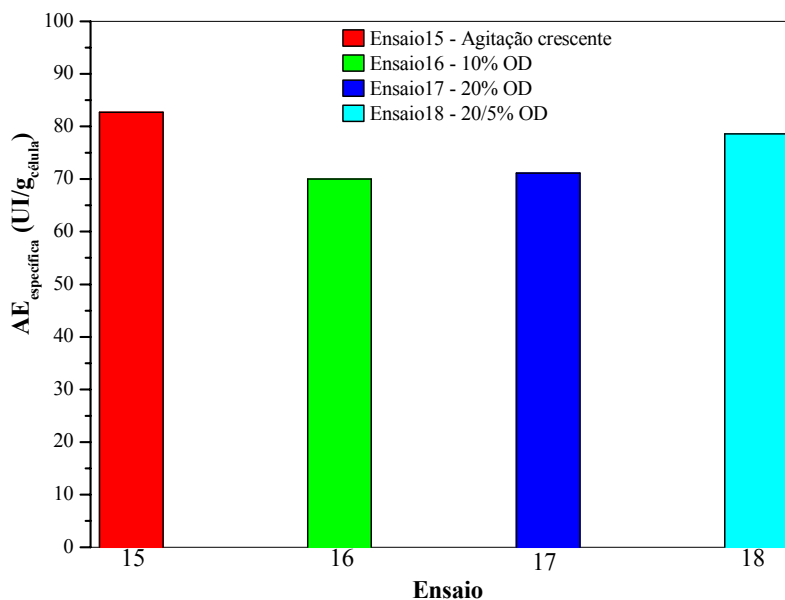
Quando a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação, condição ótima nos ensaios com a nova linhagem de *B. megaterium*, foi reproduzida na presença de soro hidrolisado, os resultados mostraram mais uma vez que a produção da PGA em câmara rotativa foi significativamente superior à do biorreator, que atingiu apenas 297 UI/L enquanto que em frascos agitados a mesma composição de meio de cultura conduziu a 606 UI/L. Uma possível explicação é que o soro hidrolisado confere ao microrganismo uma disponibilidade de nutrientes diferente daquela oferecida pelo soro padrão, com uma presença mais marcante de proteínas de massa molecular intermediárias (0,5-14 kDa), provenientes da hidrólise, o que leva ao requerimento de oxigênio diferente daquele determinado para soro integral.

A manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação (Ensaio 17) e sua limitação para 5% após 8 horas de cultivo (Ensaio 18) também não favoreceu a produção da enzima, apresentando valores de atividade enzimática em torno de 290 UI/L, valor bastante inferior aos obtidos em frascos agitados tanto para meio similar (soro hidrolisado) quanto para meio padrão (soro integral), em que se observa produção de enzima na ordem de 600 UI/L.

Nenhuma das condições investigadas, perfil crescente de agitação, manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20 e 10% da saturação e limitação de 20 para 5%, favoreceram a produção da enzima em cultivos com soro de queijo hidrolisado, assim nada se pode concluir a respeito da melhor estratégia de aeração para a produção da PGA com essa composição de meio de cultura. Essa observação pode ser confirmada pela observação da Figura 4.4, em que se compara as atividades específicas de todos os cultivos com soro de queijo hidrolisado nas diferentes concentrações de oxigênio dissolvido.

O consumo de fenilacetato de potássio apresentou o mesmo perfil para todos os ensaios, sendo exaurido após 14-18 horas de cultivo, tal como nos ensaios anteriores com meio padrão. A presença remanescente dos ácidos aspártico e glutâmico ao final do cultivo

também foi verificada, mas parece contribuir com uma concentração um pouco menor do que aquela que se vinha observando nos ensaios anteriores.



**Figura 4.19:** Valores máximos de atividade específica nos ensaios com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido em biorreator com meio de cultivo utilizando soro de queijo hidrolisado partindo de células vegetativas da linhagem tradicional de *B. megaterium*.

Uma vez que em todos os ensaios apresentados observaram-se concentrações remanescentes de ácido aspártico e glutâmico e que esse comportamento não era observado na presença de 18 aminoácidos em estudo anterior (Souza, 2003), a presença desse e dos outros cinco aminoácidos foi reavaliada e detectou-se que a composição da solução composta pelos sete aminoácidos não conferia em proporcionalidade com a solução original. Embora não houvesse vantagem em utilizar uma composição que requeria uma maior massa de aminoácidos (recorde-se que se chegou a uma composição com 7,0 g/L de sete aminoácidos que conduzia a resultados similares aos 10,0 g/L de 18 aminoácidos e depois dos 7 aminoácidos preferenciais) decidiu-se verificar se a utilização da proporção correspondente a presente na caseína melhorava a produção da enzima em biorreator.

Assim, a composição dessa solução foi reformulada, de modo a manter a concentração total em 10,0 g/L, sendo que cada um dos sete aminoácidos presentes tivessem suas massas acrescidas pelas concentrações dos 11 aminoácidos omitidos. Passamos, então a

investigar essa composição em cultivos em biorreator com perfil crescente de agitação e manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação durante todo cultivo.

#### 4.3.2.2.c. Avaliação da Composição Reformulada de Aminoácidos na Produção de PGA em Biorreator

O Ensaio 19 buscava avaliar a composição da solução reformulada de aminoácidos com perfil crescente de agitação partindo de células vegetativas conservadas a -70°C.

**Tabela 4.36:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE), concentração de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) ao longo do cultivo com meio de cultivo reformulado partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 19: Perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0.

Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{aa}$ (g/L)	$C_{indutor}$ (g/L)
Inóculo	8,04	1,94	-	-	-
0	7,65	0,17	0	9,25	3,74
2	7,73	0,36	0	8,79	3,68
4	7,94	0,59	0	7,97	3,59
6	8,03	0,91	30	6,97	3,56
8	8,23	1,71	44	5,73	3,54
10	8,36	2,90	38	4,17	2,98
12	8,47	3,36	63	3,43	2,28
14	8,60	3,91	108	2,67	2,04
18	8,67	3,85	143	1,88	2,50
20	8,70	3,54	157	1,87	2,96
22	8,72	3,64	136	1,63	3,10
24	8,73	3,27	128	1,05	3,65
Shaker 24 h - padrão	8,59	3,45	503	0,79	0,00
Shaker 24 h - reformulado	8,64	3,78	457	2,56	0,00

Os resultados apresentados na Tabela 4.36 mostram que a produção da enzima alcançou apenas 34% da atividade enzimática obtida em câmara rotativa, 157 UI/L para um padrão de 457 UI/L. A baixa concentração de enzimas em biorreator deve estar mais relacionada com o requerimento de oxigênio pelo microrganismo do que com a composição do meio, já que em frascos agitados meio padrão e reformulado conduziram aos mesmos níveis de atividade enzimática.

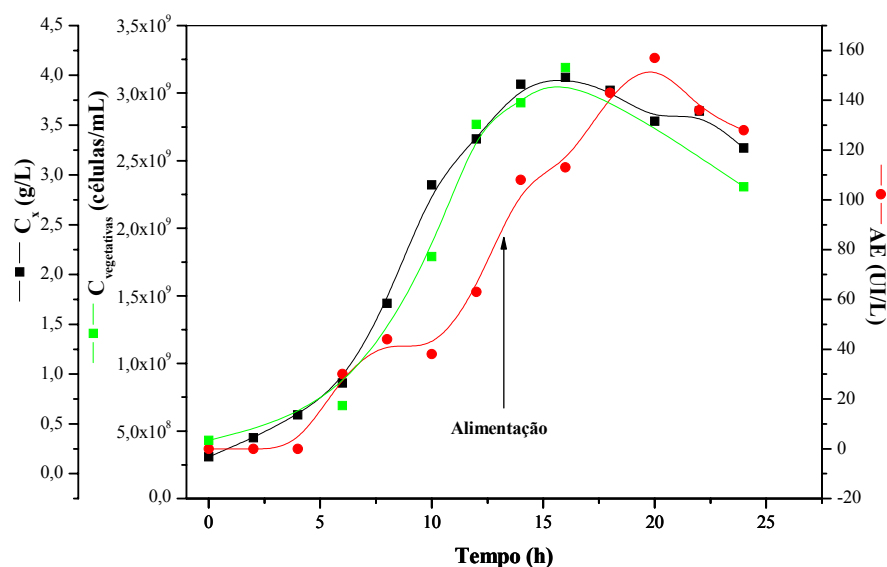
Essas observações nos remetem ao caso do soro de queijo hidrolisado, cuja utilização em frascos agitados alcançava os níveis de produção da PGA com meio padrão e, no entanto, em biorreator, a concentração de enzimas chegava a no máximo 50% da obtida em câmara rotativa.

A combinação de meio reformulado com perfil crescente de agitação, contudo, parece não ter afetado a crescimento celular, alcançando em torno de 4,0 g/L em 16 horas de cultivo, coincidindo com máxima concentração de células vegetativas,  $3,19 \times 10^9$  células/mL

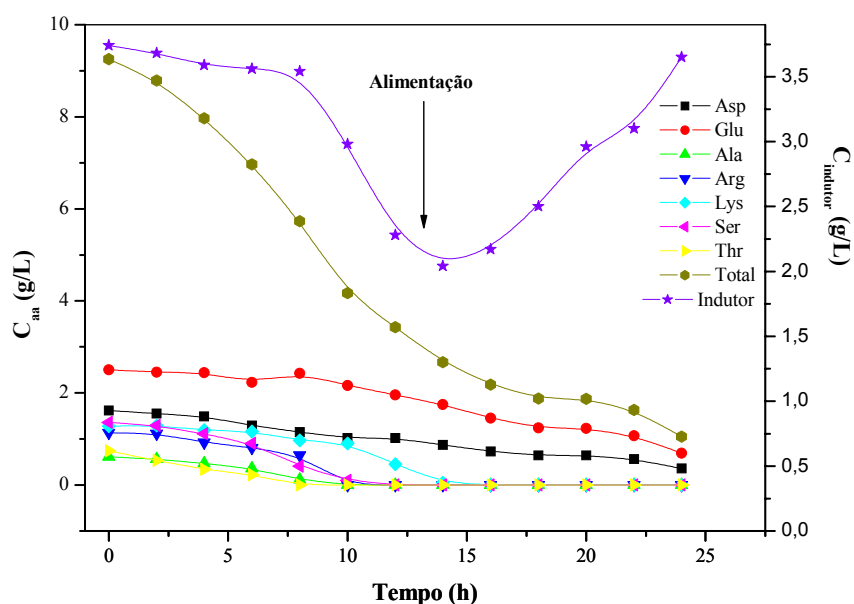
Após 13 horas de cultivo, momento em que se observou uma desaceleração da respiração celular, iniciou-se a suplementação do meio com uma solução de 16,5g/L de fenilacetato de potássio a uma vazão de 30 mL/h.

Esse nutriente foi escolhido porque vinha se mostrando com um substrato bastante assimilável pelo microrganismo, sendo completamente exaurido após períodos de 14-18 horas de cultivo. Além de contribuir como indutor na expressão da enzima o fenilacetato de potássio poderia também atuar como fonte de carbono, tal como foi apresentado anteriormente nos estudos de fontes individuais de carbono e nitrogênio para produção da PGA.

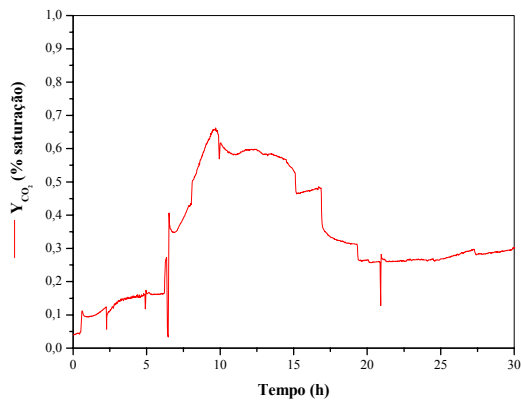
No entanto, a alimentação desse nutriente parece ter excedido a necessidade do microrganismo, conduzindo a um acúmulo de fenilacetato, mas não em concentrações suficientes para justificar a inibição na expressão da enzima, uma vez que estas estão muito próximas da concentração ótima para a produção da PGA.



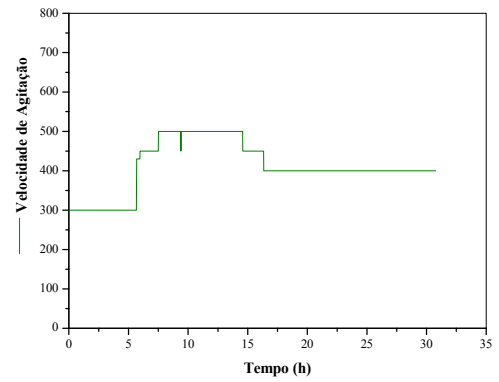
**Figura 4.20:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em meio reformulado partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a  $-70^{\circ}\text{C}$ , com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 – Ensaio 19.



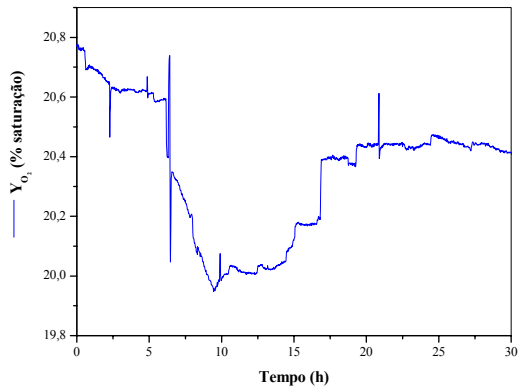
**Figura 4.21:** Consumo de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) durante o cultivo de *B. megaterium* partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 19: Meio reformulado e manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação em todo cultivo e pH inicial 8,0



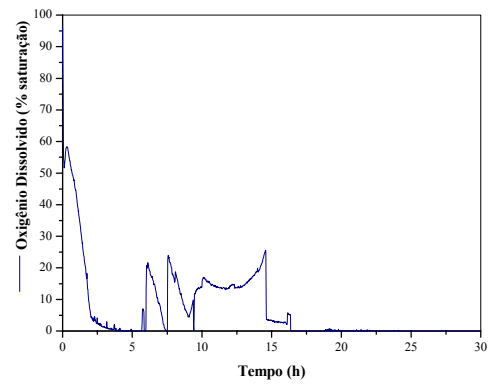
(A)



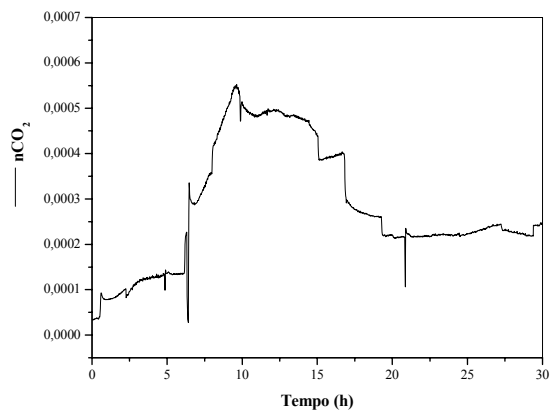
(B)



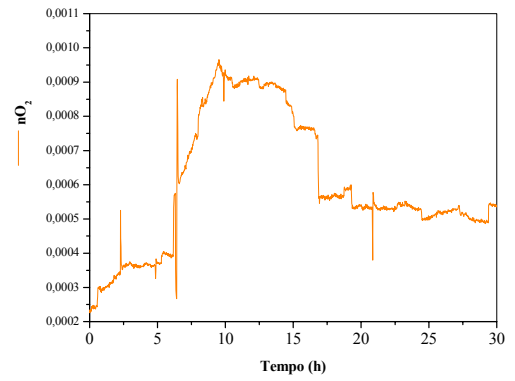
(C)



(D)

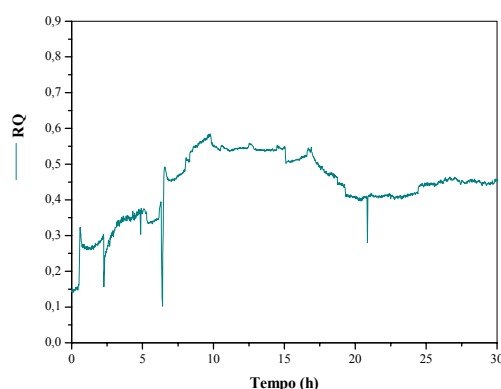


(E)



(F)





(G)

**Figura 4.22:** Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de  $\text{CO}_2$  –  $Y_{\text{CO}_2}$ , (B) velocidade de agitação, (C) fração molar de  $\text{O}_2$  –  $Y_{\text{O}_2}$ , (D) Concentração de oxigênio dissolvido, (E) velocidade de formação de  $\text{CO}_2$  –  $n_{\text{CO}_2}$ , (F) velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  –  $n_{\text{O}_2}$  e (G) coeficiente respiratório – RQ – Ensaio 19.

Outro cultivo utilizando a composição da solução reformulada de aminoácidos foi realizado. O foco principal do Ensaio 20 era uma tentativa de prolongar o crescimento do microrganismo e por conseqüência a produção associada da enzima através da suplementação do meio com os nutrientes presentes na composição padrão, aminoácidos, fenilacetato de potássio e soro de queijo.

Esses nutrientes por sua vez, através da avaliação de seus consumos nos ensaios em frascos agitados apresentados anteriormente, foram classificados da seguinte forma: (A) aminoácidos consumidos mais rapidamente; (B) aminoácidos consumidos mais lentamente e (C) indutor fenilacetato de potássio.

A partir dos cálculos das velocidades de formação de células e enzima e de consumo dos substratos, o pesquisador Pedro Luiz Fernandes, integrante desse projeto de pesquisa, realizou simulações, de modo a manter fixas as concentrações dos sustratos no biorreator, através da alimentação dos mesmos no decorrer do cultivo.

Os melhores resultados foram atribuídos às concentrações de 100 g/L de aminoácidos consumidos mais rapidamente, 50 g/L de aminoácidos consumidos mais lentamente e 60 g/L de fenilacetato de potássio, alimentadas a uma vazão de 30 mL/h a partir de 8 horas de cultivo.

Soro de queijo não foi considerado nas simulações por não ter sido detectado seu consumo como fonte de carbono, porém, optou-se por incluí-lo no meio suplementar por

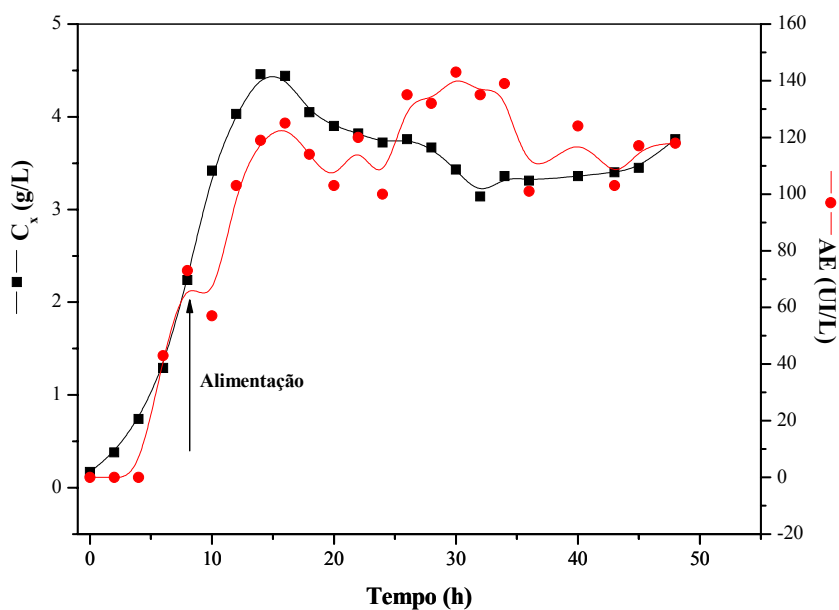
conter nutrientes essenciais a expressão da enzima conforme foi discutido no estudo do papel do soro de queijo na produção da PGA.

**Tabela 4.37:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE), concentração de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) ao longo do cultivo com meio reformulado partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 20: controle da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação e pH inicial 8,0.

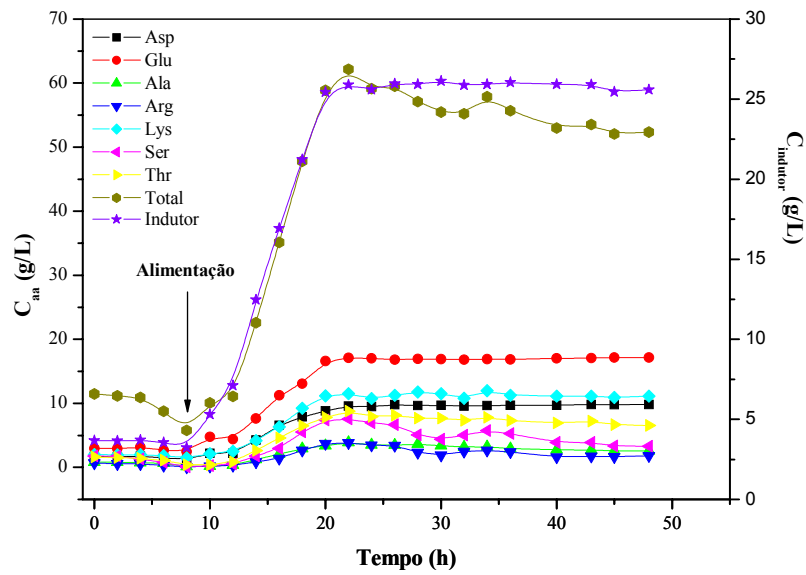
Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{aa}$ (g/L)	$C_{indutor}$ (g/L)
Inóculo	8,07	2,12	-	-	-
0	7,53	0,17	0	11,48	3,67
2	7,73	0,38	0	11,17	3,66
4	7,79	0,74	0	10,92	3,70
6	8,12	1,29	43	8,79	3,55
8	8,42	2,24	73	5,79	3,24
10	8,56	3,42	57	10,06	5,30
12	8,59	4,03	103	11,07	7,11
14	8,59	4,46	119	22,59	12,46
16	8,59	4,44	125	35,15	16,93
18	8,59	4,05	114	47,80	21,23
20	8,43	3,90	103	58,87	25,44
22	8,49	3,82	120	62,18	25,89
24	8,44	3,72	100	59,14	25,58
26	8,45	3,76	135	59,53	25,96
28	8,53	3,67	132	57,10	25,92
30	8,61	3,43	143	55,46	26,12
34	8,64	3,36	139	57,87	25,93
36	8,65	3,31	101	55,69	26,04
40	8,68	3,36	124	53,00	25,92
45	8,73	3,45	117	52,07	25,45
48	8,70	3,76	118	52,36	25,59
Shaker 24 h - padrão	8,35	3,70	491	2,59	0,00
Shaker 24 h - reformulado	8,36	3,72	498	1,23	0,00

Os resultados indicam que a produção da enzima vinha se mostrando satisfatória até as 8 horas de cultivo, alcançando atividade enzimática superior à obtida nos ensaios com máximas concentrações de PGA (perfil crescente de agitação). No entanto, na amostra seguinte nota-se uma inibição na produção da enzima, porém como a concentração de células mostrava-se em evolução, deu-se continuidade a alimentação.

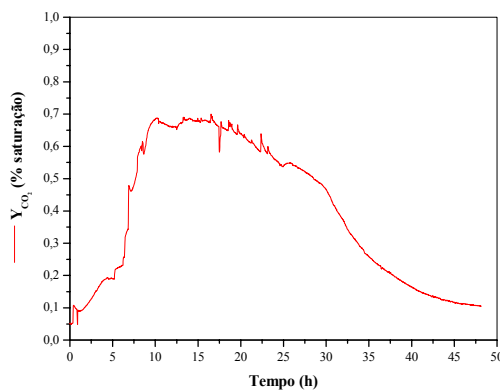
A partir de 12 horas de cultivo, a concentração de enzimas chegou a 100 UI/L, permanecendo nesse patamar até as 24 horas, quando se finalizou a suplementação do meio, a partir desse ponto, observa-se uma leve retomada na produção da PGA, alcançando a máxima atividade enzimática desse cultivo, 143 UI/L, valor significativamente inferior ao obtido em frascos agitados 498 UI/L, facilmente explicada ao se observar as concentrações acumuladas de fenilacetato de potássio e aminoácidos, muito além das concentrações ótimas para a produção da enzima, 3,5 e 10,0 g/L, respectivamente.



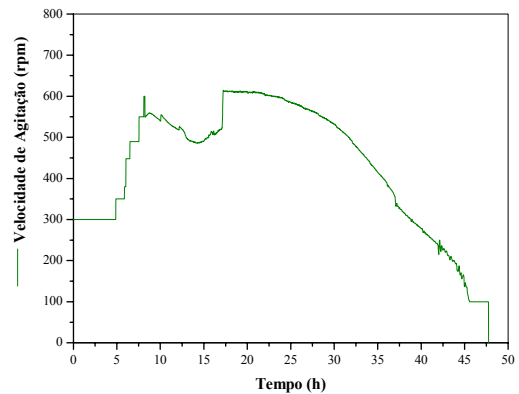
**Figura 4.23:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em meio reformulado partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a  $-70^\circ\text{C}$ , com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 – Ensaio 20.



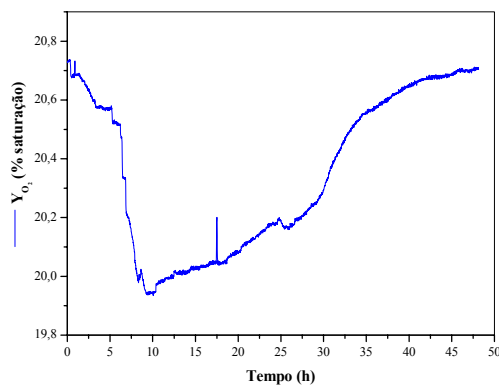
**Figura 4.24:** Consumo de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) durante o cultivo de *B. megaterium* partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 20: Meio reformulado e manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação em todo cultivo e pH inicial 8,0



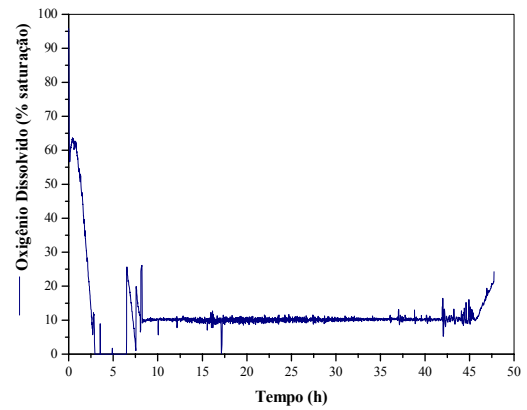
(A)



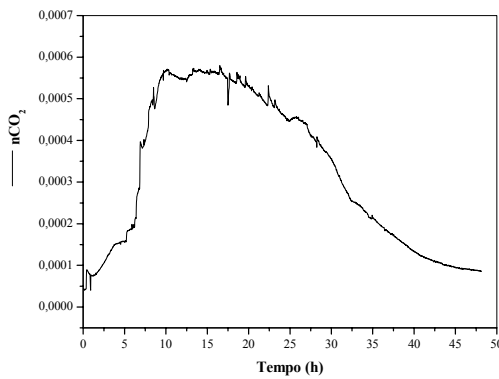
(B)



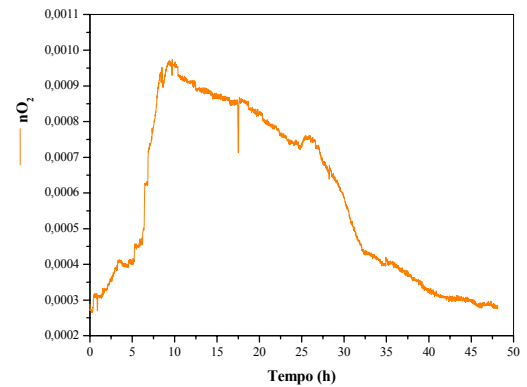
(C)



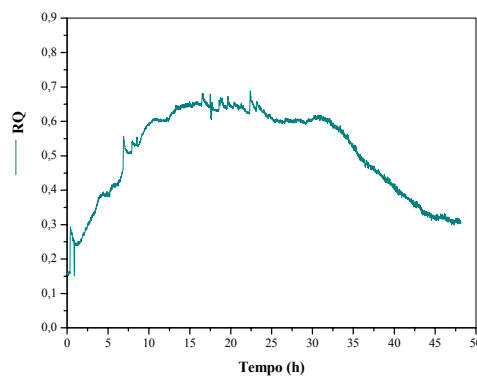
(D)



(E)



(F)



(G)

**Figura 4.25:** Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de  $\text{CO}_2$  –  $Y_{\text{CO}_2}$ , (B) velocidade de agitação, (C) fração molar de  $\text{O}_2$  –  $Y_{\text{O}_2}$ , (D) Concentração de oxigênio dissolvido, (E) velocidade de formação de  $\text{CO}_2$  –  $n_{\text{CO}_2}$ , (F) velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  –  $n_{\text{O}_2}$  e (G) coeficiente respiratório – RQ – Ensaio 20

### 4.3.3. Conclusões do Item 4.3: Estudo da Influência da Temperatura e Concentração de Oxigênio Dissolvido na Produção de PGA por *B. megaterium*

Foi estudada a influência da temperatura no cultivo de *B. megaterium* para produção de PGA na faixa entre 25-40°C. Os resultados mostraram que a máxima concentração celular e a máxima produção da enzima ocorre no cultivo a 30°C.

O efeito da concentração de oxigênio dissolvido na produção de PGA foi extensamente estudado. Uma segunda linhagem de *B. megaterium* mostrou crescimento mais lento que a tradicional, requerendo vinte e quatro horas para a fase de germinação/propagação. Foi assim efetuado estudo em biorreator com diferentes estratégias de fornecimento de oxigênio para as duas linhagens. Desde Hojo, 1997, a produção de enzima em frascos agitados tem se mostrado ser maior que a obtida em biorreator em quase todos os ensaios realizados. Maximizar a produção da enzima em biorreator significa obter uma produção no mínimo igual à obtida em frasco agitado e se confunde, pois, com a busca de uma condição de oxigênio dissolvido que reproduza aquela que ocorre em câmara rotativa. A segunda linhagem mostrou de forma clara que a manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação conduzia à maior produção da enzima dentre todas as condições testadas, com produção em biorreator similar à obtida em frasco agitado. Estudo semelhante com a linhagem tradicional não confirmou essa condição, pois só se obteve produção similar à obtida em frasco agitado com um perfil crescente de agitação, que implicava concentração de oxigênio dissolvido muito baixa, permanecendo em zero por vários períodos ao longo do cultivo. É possível que essa condição conduza a resultados iguais ou melhores ainda para a segunda linhagem. Infelizmente, não houve tempo para se efetuar esse teste, que fica aqui como uma sugestão para a continuidade deste trabalho. Uma conclusão já possível é que as duas linhagens têm requerimentos diferenciados para o oxigênio dissolvido.

Um outro fator complicador na análise do efeito do oxigênio é que embora o uso de soro hidrolisado em frascos agitados conduza a níveis de PGA similares aos obtidos com soro integral, em biorreator, com a linhagem tradicional, a produção da enzima é menor com soro hidrolisado para quatro condições de oxigênio dissolvido testadas, incluindo 10% da saturação e perfil crescente de agitação. Foram investigadas três possíveis explicações para esse fato: 1) forma de preservação do microrganismo, 2) proporção entre células vegetativas/espores ao longo do tempo em frascos agitados e biorreator; 3) aumento na produção de proteases no cultivo em biorreator em relação ao ensaio em frasco agitado. O

microrganismo conservado como “slant” respondeu de maneira similar ao conservado como “ependorffs” a um perfil crescente de agitação, o que indica que não deve ser a forma de preservação a causa da diferente resposta ao soro hidrolisado nos ensaios em biorreator/frascos agitados. Não se encontrou diferença expressiva na relação entre concentração de células vegetativas/espores ao longo do cultivo em biorreator e frascos agitados, devendo-se, portanto, também eliminar essa hipótese. Aparentemente há uma pequena produção de proteases, pois há uma queda na concentração total de proteínas e pequenos peptídeos ao longo do cultivo em biorreator com soro integral, na ordem de  $0,027 \pm 0,005$  g/L.h (quatro ensaios). Contudo, as velocidades de consumo tanto para soro hidrolisado em biorreator, quanto para soro integral e soro hidrolisado em frascos agitados são muito próximas. Assim, a diferença entre produção da enzima entre biorreator e frasco agitado com soro hidrolisado também não pode ser explicada por uma maior produção de proteases em biorreator.

Não foi obtida, portanto, até o momento, uma conclusão satisfatória sobre que alterações podem estar ocorrendo em biorreator que não ocorram em frascos agitados, alterações essas que interferem na regulação da expressão da enzima.

#### **4.4. Consumo e Formação de Metabólitos Durante o Cultivo de *Bacillus megaterium* para Produção de PGA**

Este tópico dedica-se a investigar os metabólitos formados ao longo do cultivo de *B. megaterium* para produção de PGA, e, tentativa de investigar melhor o metabolismo do microrganismo no que diz respeito ao consumo de carboidratos e ácidos orgânicos presentes no meio de cultura.

Considerando-se apenas fenilacetato de potássio e aminoácidos livres como fontes de carbono para a formação de células e CO<sub>2</sub> nos cultivos de *Bacillus megaterium*, a avaliação do balanço de carbonos totais mostrou uma defasagem de substratos em relação aos produtos formados, sugerindo a presença de algum outro nutriente que esteja atuando como fonte de carbono, hipótese investigada através de análises cromatográficas.

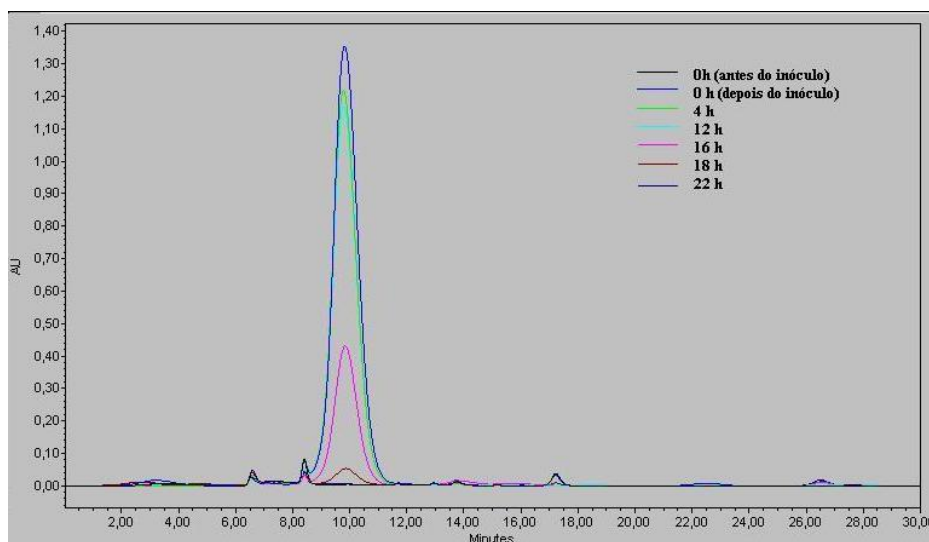
Os cromatogramas de amostras iniciais dos meios de cultura mostraram a presença, ainda que em concentrações bastante diminutas, de ácido láctico, acético e oléico, além de galactose e concentrações expressivas de lactose.

As análises de amostras provenientes do meio de germinação/propagação após incubação do microrganismo por 12 horas a 30°C e 300 rpm, acusaram a formação acentuada

de um metabólito, que não estava presente no meio de cultivo para produção da enzima antes da adição de 10% em volume do inóculo proveniente da fase de germinação/ou propagação. No entanto, a indisponibilidade de compostos padrões (carboidratos e ácidos orgânicos) e equipamentos específicos para identificação de amostras desconhecidas, não permitiu sua quantificação.

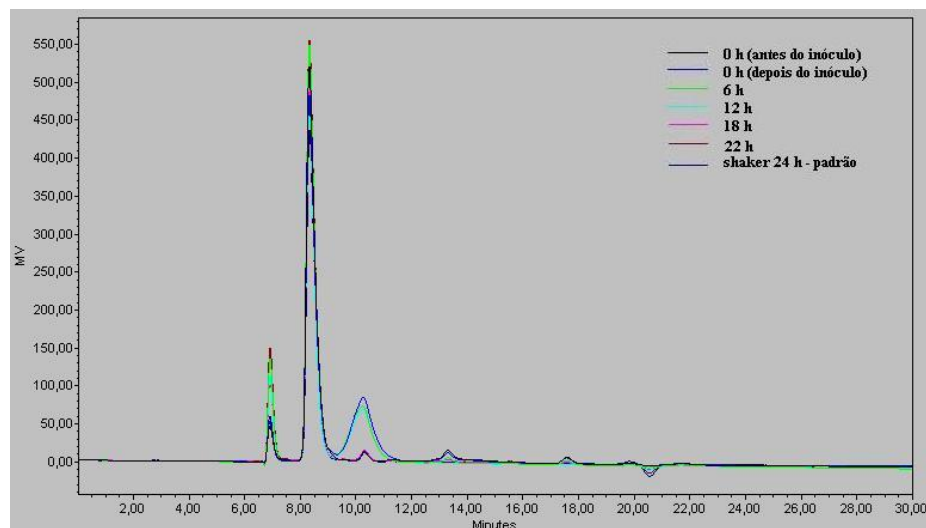
Sabe-se, contudo, que esse metabólito foi utilizado como substrato facilmente assimilável pelo microrganismo, pois o acompanhamento das amostras de caldos fermentados mostrou consumo total após 16-20 horas de cultivo, sugerindo ser este metabólito o incremento para a correta relação entre consumo de carbono e produção de células e CO<sub>2</sub>. A lactose, por sua vez, praticamente não foi consumida, permanecendo até o final dos cultivos investigados com concentrações em torno de 13,0 g/L. Essa observação confirma as análises desse composto através da determinação de açúcares redutores, nas quais se verificou consumo de lactose na ordem de 1,0 g/L dos 14,0 g/L disponíveis inicialmente no meio de cultura.

Essas observações estão ilustradas nos cromatogramas de diferentes amostras ao longo dos cultivos de *Bacillus megaterium* em biorreator apresentados no Anexo 6.

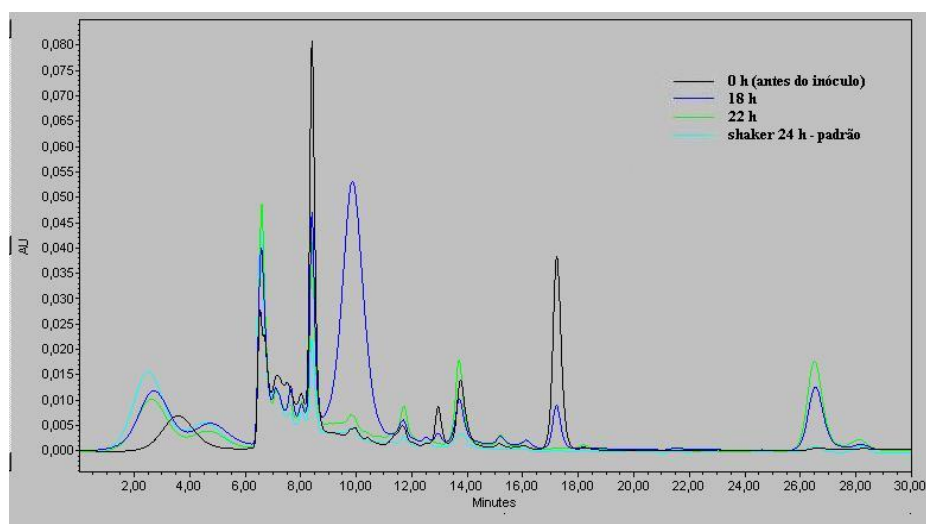


(A)





(B)



(C)

**Figura 4.26:** Acompanhamento do consumo e/ou formação de metabólitos ao longo do tempo de cultivo de *B. megaterium* em biorreator. (A) metabólito-chave, (B) lactose, galactose e ácido láctico e (C) demais metabólitos não identificados.

Para exemplificar, a Figura 4.26 (A) apresenta a formação do metabólito em questão na fase de germinação, (amostra 0 h – antes do inóculo) e posterior consumo ao longo do tempo de cultivo; a Figura 4.26 (B) ilustra a manutenção da concentração inicial de lactose, o consumo de galactose e ácido láctico e finalizando, a Figura 4.26 (C) permite observar o consumo total do metabólito-chave e também a presença de outros metabólitos também não identificados.

#### 4.5. Concentração e Purificação da Enzima por Ultra e Diafiltração

*Bacillus megaterium* ATCC 14945 utilizado nesse trabalho, produz e secreta a enzima para o meio de cultivo, o que permite procedimentos de purificação simplificados e conseqüentemente menos caros que os tradicionais processos para separação da enzima de *E. coli* que ao ser produzida permanece no espaço periplásmico da bactéria exigindo ruptura da parede celular para sua extração.

A enzima extracelular produzida em caldos fermentativos, foi, pois, submetida a etapas de separação do microrganismo, em membranas de microfiltração e concentração do caldo permeado por ultra e diafiltração.

Os procedimentos de purificação foram realizados para duas composições de meio de cultivo: soro de queijo integral e soro de queijo hidrolisado.

##### 4.5.1. Procedimentos de Concentração e Purificação para Enzima Produzida em Meio de Cultivo Contendo Soro de Queijo Integral

###### 4.5.1.1. Microfiltração dos Caldos de Cultivo Contendo Soro de Queijo

A etapa de microfiltração foi realizada em todos os caldos fermentados provenientes de cultivos em biorreator. Serão apresentados três diferentes ensaios para ilustrar a aplicação da técnica e a reprodutibilidade do método. Tanto a atividade enzimática como a concentração de proteínas foram medidas antes e após o procedimento. Os resultados referentes a essa etapa estão apresentados na Tabela 4.38.

**Tabela 4.38:** Valores de atividade enzimática (AE) e concentração de proteínas ( $C_{\text{proteínas}}$ ) medidas em caldo conendo PGA produzida por *Bacillus megaterium*, pelos métodos de Lowry e Bradford, antes e depois da etapa de microfiltração.

Ensaio	AE (UI/L)		$C_{\text{proteínas}}$ – Lowry (g/L)		$C_{\text{proteínas}}$ – Bradford (g/L)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
1	208	203	2,37	2,29	0,54	0,49
2	224	220	2,48	2,57	0,46	0,52
3	213	210	2,43	2,48	0,51	0,47

A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry, que dosa aminoácidos e peptídeos, e método de Bradford, que quantifica apenas peptídeos de massa molecular acima de 5000 Da. Desta forma, quando se observa uma diminuição na concentração de proteínas dosadas pelo método de Bradford, esta deve estar relacionada com a perda da enzima ou das proteínas do soro de queijo presentes no meio de cultivo, pois o meio de cultivo é constituído de aminoácidos e soro de queijo.

A microfiltração permitiu eliminação completa da suspensão de células, com preservação total da atividade enzimática em todos os ensaios avaliados, tal como pode ser observado na Tabela 4.38. A recuperação da enzima ao final do processo e os resultados similares para as os diferentes ensaios mostram que a técnica foi satisfatória para o objetivo proposto. Desta maneira, a partir do caldo livre de microrganismos iniciaram-se os processos de purificação e concentração propriamente ditos.

#### **4.5.1.2. Ultrafiltração dos Caldos de Cultivo Contendo Soro de Queijo Integral**

O permeado da microfiltração, foi então, submetido à concentração em membrana com curva de corte de 50 kDa e pressão de trabalho de 1,5 kgf/cm<sup>2</sup>.

Como o objetivo da ultrafiltração é obter um extrato enzimático concentrado, torna-se necessário estabelecer um fator de concentração volumétrica. O volume inicial de caldo microfiltrado era então submetido à ultrafiltração até que o retentado fosse diminuído a um volume 10 vezes menor que o volume inicial, estabelecendo um fator de concentração volumétrica igual a 10. Como nessa etapa as biomoléculas maiores que o poro da membrana ficam retidas e o volume torna-se reduzido, além da concentração da enzima, ocorre também a concentração das proteínas presentes no soro de queijo.

A eficiência do processo foi avaliada pela medida das concentrações de enzimas e proteínas antes e após a ultrafiltração. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.39.

A observação da Tabela 4.39 mostra que a ultrafiltração conduziu a um fator de concentração de 8,77 para atividade enzimática num caldo com fator de concentração volumétrica igual a 10. O fator de concentração das proteínas dosadas por Bradford, 9,08, próximo ao da atividade enzimática, mostra que não ocorreu desnaturação da enzima e que a diferença entre o fator de concentração volumétrico e o de atividade enzimática possivelmente se deve a adsorção de proteínas, incluindo PGA na membrana. Essa técnica permitiu assim não somente concentrar a enzima, mas também conduziu a um fator de purificação de 2,8

vezes, devido à eliminação parcial das proteínas do soro com massa molecular menor que 50 kDa.

**Tabela 4.39:** Valores de atividade enzimática (AE) e concentração de proteínas ( $C_{\text{proteínas}}$ ) obtidos de caldos de cultivo ultrafiltrados em membrana de 50 kDa com fator de concentração volumétrica igual a 10.

Amostra	AE (UI/L)	FC	$C_{\text{proteína}}$ (g/L) <sup>a</sup>	FC	$C_{\text{proteína}}$ (g/L) <sup>b</sup>	FC	AE <sub>específica</sub> (UI/g <sub>proteína</sub> ) <sup>c</sup>	FP
Inicial	220	8,77	2,57	3,13	0,52	9,08	85,60	2,81
Final	1930		8,03		4,72		240,35	

<sup>a</sup>Concentração de proteínas dosada pelo método de Lowry;

<sup>b</sup>Concentração de proteínas medida pelo método de Bradford

F.C = Fator de concentração

F.P = Fator de purificação (atividade específica final/atividade específica inicial)

<sup>c</sup>Proteínas medida pelo método de Lowry na atividade específica

A não desnaturação da enzima deve-se ao cuidado em manter o caldo em banho de gelo durante o processo de filtração, já que a baixa temperatura é condição primordial para evitar perdas na atividade enzimática por desnaturação da enzima, conforme verificado por Pinotti, 2003.

Com relação ao baixo fator de concentração obtido na dosagem de proteínas pelo método de Lowry este já era esperado, uma vez que aminoácidos e oligopetídeos contidos no meio de cultivo conseguem permear a membrana de ultrafiltração.

#### 4.5.1.3. Diafiltração dos Caldos de Cultivo Contendo Soro de Queijo Integral

A diálise permite a retirada de solutos de baixa massa molecular e retenção das moléculas protéicas. O caldo concentrado na etapa de ultrafiltração foi submetido à diafiltração com cinco volumes de lavagem, utilizando como solução dialisante tampão fosfato 100 mM, pH 8,0. Resultados dessa operação estão apresentados na Tabela 4.40.

**Tabela 4.40:** Valores de atividade enzimática (AE) e concentração de proteínas ( $C_{\text{proteínas}}$ ) antes e depois da diafiltração com tampão fosfato pH 8,0, 100 mM.

Amostra	AE (UI/L)	$C_{\text{proteínas}}$ – Lowry (g/L)	$C_{\text{proteínas}}$ – Bradford (g/L)	AE <sub>específica</sub> (UI/g <sub>proteína</sub> )*	F.P
Inicial	1930	8,03	4,72	240,35	2,37
Final	1490	2,62	3,18	568,70	

F.P= Fator de purificação (atividade específica final/atividade específica inicial)

\*Proteínas medida pelo método de Lowry na atividade específica

A redução da concentração protéica mostra que está ocorrendo uma parcial purificação do caldo, como era o desejado. Contudo, observa-se um decréscimo de aproximadamente 23% na atividade enzimática. Esses resultados estão coerentes com os relatados por Balasingham *et al.*, 1972, que apresentam uma perda de 24% na atividade recuperada após a diálise. Essa perda deve ser devido à retirada de pequenas moléculas presentes no meio de cultivo que interagem com a enzima e auxiliam-na a proteger a sua estrutura terciária, bem como adsorção de PGA na membrana. Esse último fator deve ser reduzido ao se operar em grande escala e não é preocupante.

#### 4.5.2. Procedimentos de Concentração e Purificação para Enzima Produzida em Meio de Cultivo Contendo Soro de Queijo Hidrolisado

##### 4.5.2.1. Micro e Ultrafiltração de Caldos Contendo Soro de Queijo Hidrolisado

Os resultados apresentados na Tabela 4.41 são referentes ao caldo de fermentação submetido à microfiltração em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$ , para a separação dos microrganismos, e posterior ultrafiltração em membrana de 50 kDa, com um fator de concentração volumétrica igual a 10. A composição inicial do meio de cultivo apresentava extrato de levedura (10,0 g/L), sais (0,3 g/L), fenilacetato de potássio (3,5 g/l) e soro de queijo hidrolisado (19,6 g/L) por tripsina imobilizada em quitosana.

Pode-se observar na Tabela 4.41 que, somando-se as unidades de enzima retidas no concentrado da ultrafiltração com as unidades medidas no permeado, constata-se perda de aproximadamente 18% na atividade da enzima, devido possivelmente ao aumento de temperatura durante a ultrafiltração, pois o balanço de massa de proteínas não indica nenhuma perda.

**Tabela 4.41:** Valores de atividade enzimática (AE) e concentração de proteínas ( $C_{\text{proteínas}}$ ) determinadas pelos métodos de Bradford e Lowry para as amostras submetidas respectivamente a microfiltração em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e ultrafiltração em membrana de 50 kDa.

Amostra	Volume (L)	A.E. (UI/L)	$C_{\text{proteínas}}$ (g/L) Bradford	$C_{\text{proteínas}}$ (g/L) Lowry	AE específica (UI/mg <sub>proteína</sub> )*
Caldo fermentado	3,80	91 (345,8 UI)	0,070 (0,27 g <sub>proteína</sub> )	2,4 (9,12 g <sub>proteína</sub> )	37,92
Caldo microfiltrado	3,50	85 (297,5 UI)	0,070 (0,24 g <sub>proteína</sub> )	2,40 (8,4 g <sub>proteína</sub> )	35,42
Caldo ultrafiltrado	0,35	420 (147 UI)	0,47 (0,16 g <sub>proteína</sub> )	4,7 (1,65 g <sub>proteína</sub> )	89,36
Permeado da ultrafiltração	3,15	31 (97,7 UI)	0,02 (0,08 g <sub>proteína</sub> )	2,0 (6,30 g <sub>proteína</sub> )	15,50

\*Proteínas medida pelo método de Lowry na atividade específica

Uma vez que nos experimentos anteriores de ultrafiltração não se observou perda, é possível que tenha ocorrido falha no cuidado com a manutenção da baixa temperatura. Não se observava também no primeiro experimento apresentado, a permeação de PGA pela membrana que ocorreu agora, devido possivelmente ao uso de membrana nova. Com respeito à presença das proteínas menores que 5 kDa remanescentes no meio de cultivo, verificou-se que a ultrafiltração remove cerca de 75% delas. Esses resultados podem ser confirmados pela eletroforese SDS-PAGE realizada, onde se pode ver claramente que há uma diminuição da quantidade das proteínas menores no concentrado da ultrafiltração.

#### 4.5.2.2. Diafiltração dos Caldos de Cultivo Contendo Soro de Queijo Hidrolisado: Influência do pH e do Volume de Lavagem

Foi também investigado o efeito da diafiltração de caldos concentrados com diferentes volumes de lavagem com solução dialisante.

Resultados anteriores de diálise realizadas com tampão fosfato mostraram que deve haver um efeito protetor para a enzima por parte da lactose e outras moléculas pequenas presentes no meio, pois não há perda de atividade na ultrafiltração e, nas mesmas condições operacionais, há expressiva diminuição da atividade e estabilidade da enzima após a diafiltração usando tampão. Uma vez que se verificou que a ultrafiltração remove 75% das

pequenas moléculas, decidiu-se estudar a diafiltração usando o permeado do soro de queijo “in natura” obtido na ultrafiltração em membrana de 10 kDa, portanto com uma concentração bem menor de proteínas acima de 5 kDa e concentração de lactose em torno de 50 g/L.

O caldo ultrafiltrado foi submetido a diafiltrações com diferentes volumes de lavagem (1, 2 e 3 vezes o volume do caldo concentrado), tendo-se ajustado o pH das soluções de lavagem (permeado do soro “in natura”) para 6,0; 6,64 ou 8,0.

As Tabelas 4.42 e 4.43 mostram os resultados do estudo sobre o efeito do pH e do número de lavagens e do volume da solução dialisante no rendimento e na purificação da enzima.

**Tabela 4.42:** Valores de atividade enzimática (AE) e concentração de proteínas ( $C_{\text{proteínas}}$ ) dosadas pelo método de Bradford obtidas no permeado e concentrado após etapas de diafiltração a diferentes pHs. Volume inicial de caldo ultrafiltrado= 100 mL

		pH= 6,00			pH= 6,64			pH= 8,00		
Amostra	Lavagens	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>
Inicial	AE (UI)	42,0	30,1	24,0	42,0	31,4	21,8	42,0	28,7	20,2
	$C_{\text{proteína}}$ (mg)	47,0	41,0	38,0	47,0	46,0	42,0	47,0	42,0	39,0
Final (após diafiltração)	AE (UI)	30,1	24,0	16,4	31,4	21,8	14,9	28,7	20,2	18,9
	$C_{\text{proteína}}$ (mg)	41,0	38,0	31,0	46,0	42,0	33,0	42,0	39,0	39,0
Permeado da diafiltração	AE (UI)	5,8	4,5	2,4	4,5	3,8	2,0	3,6	4,0	1,4
	$C_{\text{proteína}}$ (mg)	3,0	3,0	2,0	1,0	4,0	2,0	3,0	4,0	3,0

Pode-se observar que ocorreu também neste experimento inativação de parte da enzima, confirmando a necessidade de extremo cuidado com a temperatura. Houve também, permeação da enzima em todos os pHs, sendo mais acentuada no pH 6 onde ocorreu perda da ordem de 14% nas duas primeiras diafiltrações e de 10% na terceira, indicando grande irregularidade dos poros da membrana, já que a especificação indica que 95% dos poros deveriam reter proteínas acima de 50 kDa.

**Tabela 4.43:** Percentuais de recuperação de unidades de penicilina G acilase ( $AE_{\text{final}}$ ) e atividade específica ( $AE_{\text{específica}}$ ) na fração concentrada após etapas de diafiltração com diferentes volumes de lavagem. Partindo de 100 mL de caldo com  $AE_{\text{inicial}} = 420 \text{ UI/L}$  (42 UI) e  $AE_{\text{específica inicial}} = 0,89 \text{ UI/mg}_{\text{proteína}}$

pH	1ª Lavagem		2ª Lavagem		3ª Lavagem	
	$AE_{\text{final}}$ (%)	$AE_{\text{específica}}$ (UI/mg <sub>proteína</sub> )	$AE_{\text{final}}$ (%)	$AE_{\text{específica}}$ (UI/mg <sub>proteína</sub> )	$AE_{\text{final}}$ (%)	$AE_{\text{específica}}$ (UI/mg <sub>proteína</sub> )
6,00	72	0,73	57	0,63	39	0,52
6,64	75	0,68	52	0,52	35	0,45
8,00	68	0,68	48	0,51	45	0,48

Aparentemente ocorre maior adsorção de proteínas na membrana a pH 6,0 onde se observa cerca de 10% de perda no balanço de massa. Contudo, a determinação da concentração de proteína no permeado da diafiltração é sujeita a um grande erro experimental devido à baixa concentração de proteína presente.

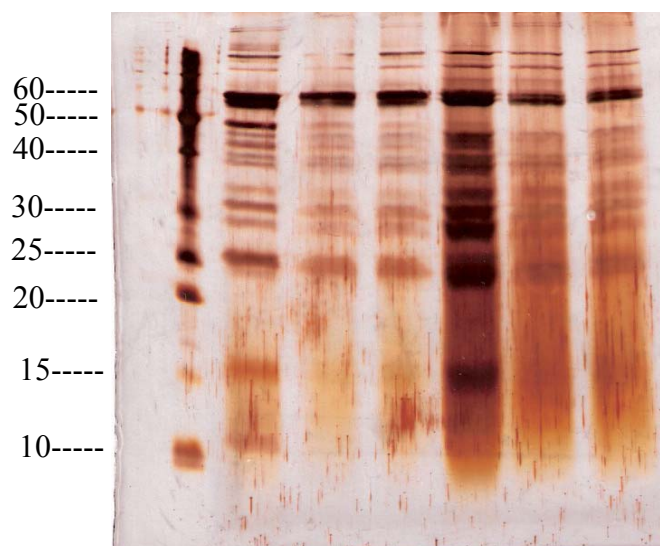
Fica claro, pois que ocorre grande perda de enzima nas sucessivas etapas de diafiltração, de modo que não houve aumento da atividade específica. Uma vez que a eletroforese, Figura 4.27, indica uma grande eliminação de proteínas menores que a PGA, recomenda-se que se realize uma etapa de diafiltração, mas não mais do que uma, a menos que se deseje um alto grau de purificação, sem preocupação com o rendimento. O pH da solução dialisante também não parece ser uma variável significativa, entre 6,0-8,0, a faixa estudada.

Em outro trabalho (Rodrigues *et al.*, 2007) esse estudo foi refeito em menor escala, comparando de modo sistemático a ultra e diafiltração de caldos de cultivo da produção de PGA com soro integral e hidrolisado, em tubos de separação com membrana de celulose de 30 kDa. Os resultados obtidos confirmam os que foram aqui apresentados, obtidos com os mesmos caldos de cultivo. Segundo os autores o uso de soro hidrolisado permite grande aumento no grau de purificação de PGA pois, na etapa de ultrafiltração, grande parte das proteínas menores (que surgem com a hidrólise) são removidas, com pequena perda da atividade enzimática.

Nas etapas de diafiltração a perda de atividade é maior e a quantidade de proteínas removida é menor, não devendo ser realizadas a menos que se necessite muito de um alto grau de purificação da enzima, mesmo a custo de perda no rendimento. Para o soro integral, as proteínas indesejadas apresentam tamanho maior e não são removidas com



eficiência na primeira etapa de purificação (ultrafiltração), exigindo as etapas seguintes de diálise que causam maiores perdas nos valores de atividade enzimática. O estudo da influência do pH nas etapas de diafiltração realizado por Rodrigues e colaboradores, 2007, mostrou que o pH não tem influência sobre a eficiência da purificação de PGA, confirmando os resultados aqui apresentados.



**Figura 4.27:** Eletroforese em gel de poliacrilamida 15%, SDS-PAGE, com revelação em prata. Linha 1: marcadores de peso molecular; 2: caldo fermentativo ultrafiltrado, com soro hidrolisado ; 3: caldo fermentativo ultrafiltrado e dialisado uma vez, com soro hidrolisado 4: caldo fermentativo ultrafiltrado, dialisado duas vezes, com soro hidrolisado 5: caldo fermentativo ultrafiltrado, com soro integral; 6: caldo ultrafiltrado, dialisado uma vez, com soro integral 7: caldo fermentativo ultrafiltrado, dialisado duas vezes, com soro integral.

#### 4.6. Caracterização de Penicilina G Acilase de *Bacillus megaterium*

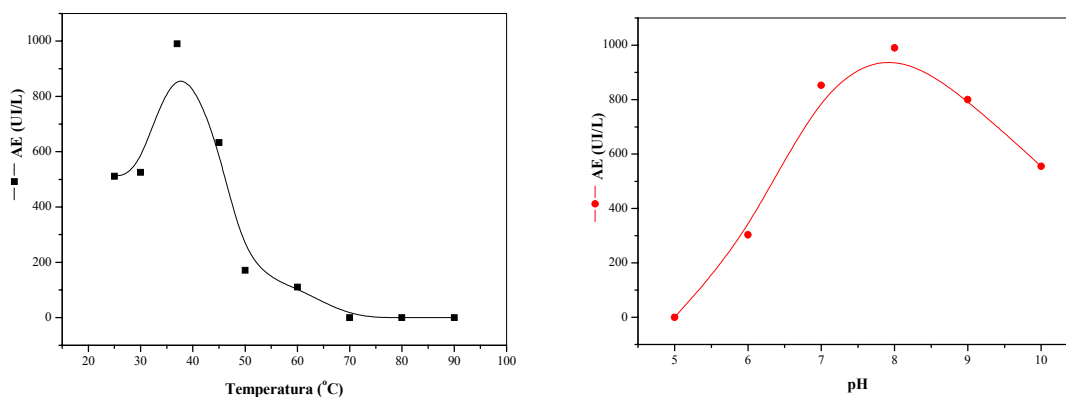
Penicilina G acilase produzida pela linhagem tradicional de *B. megaterium* foi caracterizada quanto à temperatura e pH ótimos e parâmetros cinéticos,  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$ , obtidos na hidrólise de penicilina G potássica.

A enzima apresentou máxima atividade enzimática a 37°C, valor esse que está de acordo com os resultados de Chiang e Bennett, 1967; Savidge e Cole; Illanes, *et al.*, 1994, que reportam temperaturas ótimas para PGA extracelular em torno de 35-45°C.

O pH ótimo, 8,0, também se mostrou coerente com os reportados em literatura, nos quais os valores máximos de atividade enzimática foram obtidos em pH em torno de 7,0-

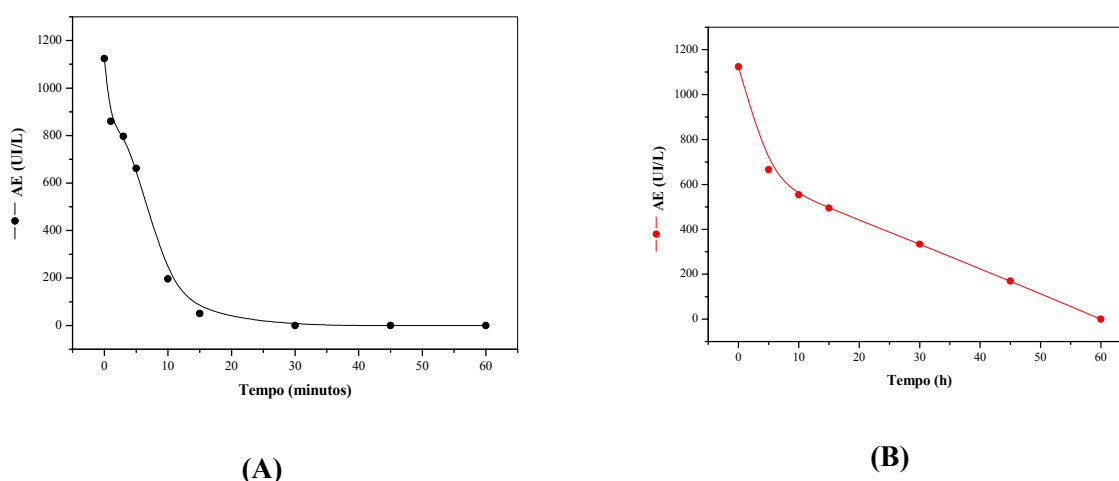
8,5 para enzimas provenientes de diferentes fontes: *Bacillus megaterium* (Illanes et al., 1994), *Aspergillus fumigatus* e *Mucor gryseocianum* (José et. al., 2003) e *Achromobacter* sp (Plhácková, et al., 2003).

Os perfis de atividade enzimática em função da temperatura e pH estão apresentados na Figura 4.28 (A) e (B), respectivamente.



**Figura 4.28:** Acompanhamento da atividade enzimática (AE) da PGA de *Bacillus megaterium* em função de diferentes temperaturas (A) e pHs (B).

As estabilidades térmica e alcalina também foram estudadas de acordo com metodologia descrita no Capítulo 3.

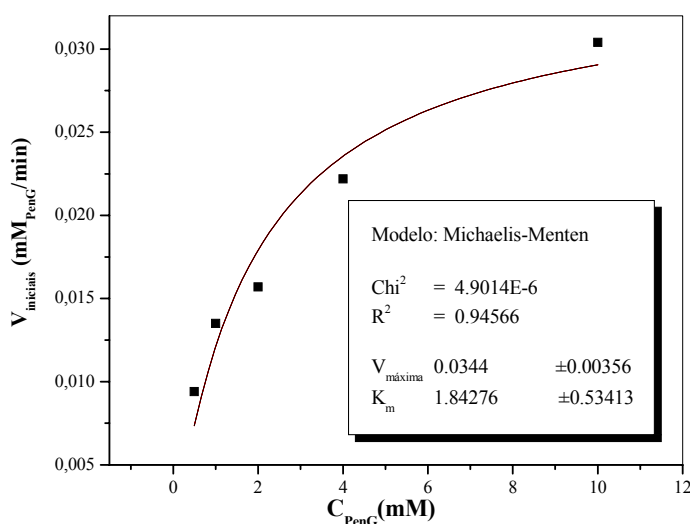


**Figura 4.29:** Acompanhamento da atividade enzimática da PGA de *Bacillus megaterium* ao longo do tempo de incubação (A) estabilidade térmica e (B) estabilidade a pH alcalino.

Os resultados estão apresentados na Figura 4.29. Nota-se que após meia hora de incubação à 60°C, a enzima está completamente inativada. Quanto à estabilidade em pH alcalino, observa-se que a enzima chega à completa inativação após 1 hora de incubação a pH 10,0.

Foi também estudada a influência da concentração de substrato na cinética de hidrólise de penicilina G catalisada por PGA produzida por *B.megaterium* 1, de modo a se poder comparar os parâmetros cinéticos obtidos com valores da literatura reportados para PGAs de outros microrganismos. O ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten aos pontos experimentais de velocidades da reação de hidrólise de penicilina G em função das diferentes concentrações iniciais de substrato forneceu os valores dos parâmetros  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$ . Uma estimativa inicial baseada no ajuste linear do inverso das concentrações de substrato em função dos inversos da velocidade do gráfico de Lineweaver-Burk forneceu os valores iniciais usados para o ajuste não linear do modelo de Michaelis-Menten usando o software Origin 6.0, o qual permitiu obtenção de estimativas mais confiáveis dos parâmetros cinéticos.

As velocidades iniciais de hidrólise da penicilina G em função das diferentes concentrações de substrato estão apresentadas na Figura 4.30, bem como o ajuste do modelo cinéticos de Michaelis-Menten aos pontos experimentais, que conduziram a valores de  $V_{m\acute{a}x}$  e  $K_m$  de 0,0344 mM<sub>PenG</sub>/min e 1,83 mM, respectivamente.



**Figura 4.30:** Ajuste do modelo cinético de Michaelis-Menten aos pontos experimentais de velocidades iniciais ( $V_{iniciais}$ ) na hidrólise de penicilina G em função de diferentes concentrações de substrato ( $C_{PenG}$ ).

A Tabela 4.44 apresenta uma comparação entre os parâmetros cinéticos de diferentes PGA reportadas na literatura e a enzima produzida nesse trabalho.

**Tabela 4.44:** Propriedades cinéticas de PGAs produzidas por diferentes microrganismos.

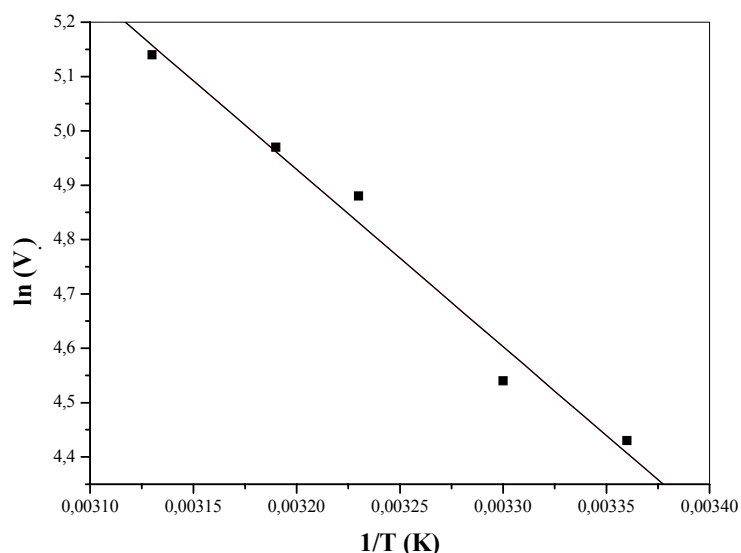
Microrganismo	T <sub>ótima</sub> (°C)	pH <sub>ótimo</sub>	K <sub>m</sub> (mM)	Referência
<i>Bacillus megaterium</i>	37	8,7	4,5	Savidge e Cole, 1975
<i>Bacillus megaterium</i>	37	8,0	2,0	Illanes, <i>et al.</i> , 1994
<i>Escherichia coli</i>	37	8,0	0,7	Savidge e Cole, 1975
<i>Escherichia coli</i>	37	7,8	1,1	Shewale e Sivaraman, 1989
<i>Kluyvera citrophila</i>	37	8,0	15,0	Álvaro <i>et al.</i> , 1992
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40	7,0-8,0	1,8x10 <sup>-4</sup>	José <i>et al.</i> , 2003
<i>Mucor gryseocianum</i>	40	7,5-8,5	1,5x10 <sup>-4</sup>	José <i>et al.</i> , 2003
<i>K. citrophila</i> em <i>E. coli</i>	55	8,5	0,02	Wen, <i>et al.</i> , 2004
<i>Bacillus megaterium</i>	37	8,0	1,84	Presente trabalho

Sabe-se que:

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

Considerando-se o valor de K<sub>m</sub> igual a 1,84 mM e a massa molecular do substrato (penicilina G) 372,5g/mol, tem-se um valor de Km de 0,69 g/L. Como a concentração de substrato utilizada na determinação da atividade enzimática é 40,0 g/L, ou seja, aproximadamente 50 vezes o valor de K<sub>m</sub>, pode-se afirmar que as velocidades iniciais estimadas para essa concentração de substrato devem estar próximas de V<sub>máx</sub>. Nessa condição, uma possível influência da temperatura em K<sub>m</sub> não afetaria a velocidade da reação, que estando próxima de V<sub>máx</sub>, seria função apenas da concentração da enzima. Uma vez que esta é mantida constante nos ensaios para se determinar a influência da temperatura na atividade enzimática, torna-se possível estimar com razoável precisão a energia de ativação da reação usando os dados de atividade enzimática a diferentes temperaturas, embora a rigor se devessem utilizar dados de V<sub>máx</sub> obtidos a diferentes temperaturas.

Assim, com os valores de velocidade da reação no trecho ascendente, obtidos nas temperaturas de 25-65°C, construiu-se o gráfico de Arrhenius, para a estimativa da energia de ativação da PGA como mostrado na Figura 4.31.



**Figura 4.31:** Gráfico de Arrhenius – Efeito da temperatura na velocidade de reação de hidrólise de penicilina G catalisada por PGA produzida por *B. megaterium* 1.

Os valores da regressão linear obtidos através do gráfico de  $\ln(V_{\text{máx}})$  por  $1/T$  (K) estão na Tabela 4.45. O valor da constante dos gases utilizado foi 8,314 KJ/mol.K.

**Tabela 4.45:** Valores da regressão linear para estimativa da energia de ativação, reta  $Y=A+BX$

Parâmetro	Valores	Erros
A	15,369	±0,881
B	-3262,546	±271,511

Como  $B = -\frac{E_a}{R}$ , pode-se, então, obter o valor da energia de ativação para a

PGA de *Bacillus megaterium*. O valor estimado para PGA de *Bacillus megaterium* foi 27,12 kJ/mol, este resultado 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.

## 5. CONCLUSÕES

Neste capítulo, estão apresentadas as conclusões pertinentes aos diferentes estudos desenvolvidos ao longo deste trabalho.

Dentre as diferentes estratégias de preservação estudadas, células dormentes conservadas em criotubos a  $-70^{\circ}\text{C}$  na presença de solução crioprotetora glicerol 20% v/v mostrou considerável reprodutibilidade do inóculo e manutenção dos níveis de atividade enzimática após períodos prolongados de armazenamento, sendo, portanto, a forma mais conveniente de preservação da cultura para um estudo mais longo. A conservação como células vegetativas congeladas (eppendorff), embora tenha conduzido nos primeiros meses a valores maiores de atividade enzimática, mostra atenuação da expressão da enzima ao longo do tempo. Contudo, uma vez otimizado o cultivo, já na produção em maior escala deve-se utilizar células vegetativas congeladas, obtidas de cultivos que mostraram alta produção de enzima e estiverem com menor tempo de conservação possível.

Estudos de otimização do meio de cultivo em frascos agitados apontaram que dos sete aminoácidos presentes no meio apenas treonina não se mostrou essencial à produção da enzima, podendo ser excluída da composição. O acompanhamento da concentração de aminoácidos em cultivos padrões revelou que o microrganismo consome preferencialmente serina, arginina, lisina e alanina, restando ao final de 24 horas de cultivo, em torno de 50% das concentrações iniciais de ácido aspártico e glutâmico. A eliminação das concentrações excedentes desses dois aminoácidos e a omissão individual de treonina, totalizando 7,0 g/L de aminoácidos, tornaram o meio de cultivo mais simplificado e conduziram aos mesmos níveis de atividade enzimática dos ensaios padrão.

A substituição da solução de aminoácidos por extrato de levedura no meio de cultura não é recomendada, pois a máxima concentração de enzima, obtida na presença de 10,0 g/L de extrato de levedura, alcançou 70% da produção de PGA em ensaio padrão, quando inoculadas com esporos congelados a  $-70^{\circ}\text{C}$  (criotubos – Lote I), já para cultivos partindo de células vegetativas provenientes de caldo de cultura composto por aminoácidos livres, a produção da enzima na presença de extrato de levedura chegou a apenas 128 UI/L para um padrão de 850 UI/L.

No entanto, a utilização de sulfato de amônio e fenilacetato de potássio como fontes individuais de nitrogênio e carbono, mostrou-se como uma alternativa promissora, conduzindo a níveis de atividade enzimática superiores aqueles obtidos com aminoácidos e superando em biorreator a produção dos frascos agitados na condição otimizada de aeração:

limitação na concentração de oxigênio dissolvido de 20% para 5% da saturação. Esse comportamento também foi verificado no cultivo em batelada alimentada com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação durante todo cultivo.

Soro de queijo se mostrou como nutriente essencial na produção da enzima, mas contém significativa quantidade de proteínas, que permanecem no caldo do cultivo, dificultando a posterior separação da enzima produzida. Após intensivo estudo, obteve-se solução que minimiza o problema: soro de queijo previamente hidrolisado com tripsina mostrou conservar o(s) nutriente(s) responsável(s) pelo crescimento do microrganismo e indução da enzima. Após hidrólise das proteínas, os peptídeos gerados puderam ser facilmente eliminados por ultra/diafiltração.

A influência da temperatura na produção da PGA mostrou o efeito significativo dessa variável no crescimento do microrganismo e atividade enzimática, com máximas concentrações de células e enzima a 30°C e nenhum crescimento celular e expressão de PGA a 40°C.

Ensaio em biorreator para avaliar o efeito de concentração de oxigênio dissolvido mostraram que a produção da enzima parece ocorrer sob condições de “stress”. Contudo, a condição exata para se obter a máxima produção de enzima em biorreator variou conforme a linhagem de *Bacillus megaterium* que se cultiva. Estudo realizado com uma linhagem nova de *B. megaterium* mostrou claramente que manutenção de oxigênio dissolvido em 10% da saturação conduz a máximas produções de enzima similares à obtida em frascos agitados. Contudo, para outra linhagem, as mais altas concentrações de enzima são obtidas utilizando-se um perfil crescente de agitação, o qual conduz a concentrações de oxigênio muito menores que os 10% utilizados com a primeira linhagem, chegando a zero muitas vezes, ou seja, crescimento realmente limitado pelo oxigênio. Assim, temos respostas diferentes para duas variantes de *B. megaterium*, o que impossibilita a generalização do resultado.

O uso de soro hidrolisado, que conduz a produções de enzima similares às obtidas com soro integral nos ensaios em shaker, modifica o requerimento de oxigênio dissolvido no biorreator. Aparentemente, deve ocorrer alguma mudança metabólica no microrganismo na medida em que diminui a concentração de nutrientes e de oxigênio e aumenta a concentração celular. Algum limiar é atingido em uma dada condição alcançada em tempos diferentes nos frascos agitados, dependendo da composição do meio. Reproduzir essa condição em biorreator exige condições operacionais de cultivo diferentes para soro hidrolisado.

A concentração e purificação da enzima por ultra/diafiltração foram estudadas e os resultados obtidos mostraram que realmente a utilização de soro hidrolisado permite eliminação de grande quantidade das proteínas contaminantes já na etapa de concentração, com melhores resultados ainda na etapa de diálise.

A caracterização da enzima revelou que a temperatura ótima para a PGA de *B. megaterium* está em torno de 30°C e pH ótimo 8,0. Após meia hora de incubação à 60°C, a enzima torna-se completamente inativada e observa-se que a enzima chega à completa inativação após 1 hora de incubação a pH 10,0. As velocidades iniciais de hidrólise da penicilina G em função das diferentes concentrações de substrato conduziram a valores de  $V_{\text{máx}}$  e  $K_m$  de 0,0344 mM<sub>PenG</sub>/min e 1,83 mM, respectivamente.



## 6. SUGESTÕES

Como continuidade desse trabalho, propõe-se:

- Realizar ensaios em frascos agitados na presença de seis aminoácidos, com omissão de Thr e redução total de 1,0 g/L nas concentrações de Asp e Glu, totalizando 6,0 g/L,
- Utilizar a composição descrita acima em cultivo em biorreator com as condições ótimas de concentração de oxigênio dissolvido determinadas neste estudo para as duas linhagens de *Bacillus megaterium*;
- Reproduzir em biorreator cultivo com perfil crescente de agitação incubado com a nova linhagem de *Bacillus megaterium*;
- Realizar cultivo em biorreator com a nova linhagem de *Bacillus megaterium* utilizando soro de queijo hidrolisado no meio de cultura;
- Identificar os metabólitos formados e consumidos durante o cultivo de *B. megaterium* e elucidar o metabolismo do microrganismo através da cinética de consumo dos substratos.

**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Acevedo, F.; Cooney, C. L.; Penicillin Amidase Production by *Bacillus megaterium*, ***Biotechnology and Bioengineering***, vol. 15, p. 493-503, 1973.

Adler-Nissen, J. *Enzymic Hydrolysis of Food Proteins*, Elsevier Applied Science Publishers, London and New York, 1986.

Alvaro G., Fernandez-Lafuente R., Rosell C. M., Blanco R. M., Garcia-Lopez J. L., e Guisan, J. M. Penicillin-G Acylase from *Kluyvera citrophila* New Choice as Industrial Enzyme. *Biotechnology Letters*, vol. 14, p. 285-290, 1992.

Bailey, J. E.; Ollis, D. F. ***Biochemical Engineering Fundamentals***, 2<sup>nd</sup> ed, New York, McGraw Hill, 1986.

Barbero, J. L., Buesa, J. M., Buitrago, G. G., Méndez, E., Aranda, A. P. e García, J. L. Complete Nucleotide Sequence Of The Penicillin Acylase Gene From *Kluyvera Citrophila*, ***Gene***, vol. 49, p. 69-80, 1986.

Barends, T. R. M., Polderman-Tijmes, J. J., Jekel, P. A., Hensgens, C. M. H., Vries, E. J., Janssen, D. B. e Dijkstra, B. W. The Sequence and Crystal Structure of the  $\alpha$ - Amino Acid Ester Hydrolase from *Xanthomonas Citri* Define a New Family of  $\beta$ -Lactam Antibiotic Acylases. ***Journal of Biological Chemistry***, vol. 278, p. 23076-23084, 2003.

Barends, T.R.M., Yoshida, H., Dijkstra, B.W. Three-Dimensional Structures Of Enzymes Useful For  $\beta$ -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.

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<sup>th</sup> edition, USA, 1974.

Black, J. G.; *Microbiology: Principles and Applications*, 3<sup>rd</sup> edition, New Jersey, Prentice-Hall, 1966.

Blinkovsky, A. M. e Markaryan, A. N. Synthesis of  $\beta$ -Lactam Antibiotics Containing  $\alpha$ -Aminophenylacetyl Group N the Acyl Moiety Catalysed by D-(-)-Phenylglycyl- $\beta$ -Lactamide Amidohydrolase. *Enz. Microb. Technol.*, vol. 15, p. 965-973, 1993.

Boccu, E., Gianferrara, T., Gardossi, L., Veronese, F.M. *E. coli* Penicillin Acylase: Purification by Affinity Chromatography and Covalent Binding to Nylon. *Farmaco*, vol. 45 (2), p. 203-21, 1990.

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.

Buchholz, K., Kasche, V., Bornscheuer, U.T. *Biocatalysts and Enzyme Technology*. Weinheim: Wiley-VCH, Cap. 1. p. 1-26, 2005.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, vol 72, p. 248-254, 1976.

Burtscher, H., Günter, S. Reconstitution *in Vivo* of Penicillin G Acylase Activity from Separately Expressed Subunits. *European Journal of Biochemistry*, vol. 205, p. 77-83, 1992.

Cai, G., Zhu, S., Yang, S., Zhao, G., e 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 Environmental Microbiology*, vol. 70, p. 2764-2770, 2004.

Calderbank, P. H. e Moo Young, M. B. The prediction of power consumption in the agitation of non-newtonian fluids. *Trans. Inst. Chem. Eng.* vol. 37, p. 26-33, 1959.

Çalik, P., Biliç E., Çalik, G., Ozdamar, T. H. Bioreactor Operation Parameters as Tools for Metabolic Regulations in Fermentation Processes: Influence of pH Conditions. *Chemical Engineering Science*, vol. 58, p. 759-766, 2003.

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.

Chaloupka, J.; Krecková, P.; Regulation Formation of Protease in *Bacillus megaterium*. The influence of Amino Acids on the Enzyme Formation. **Folia Microbiológica**, vol 11, p. 82-88, 1966.

Cheng, S.; Song, Q.; Wei, D.; Gao, B. High-level production penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis* in recombinant *Escherichia coli* with optimization of carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 41, p. 326-330, 2007.

Chiang, C.; Bennett, R. E.; Purification and Properties of Penicillin Amidase from *Bacillus megaterium*. **Journal of Bacteriology**, vol. 93, p. 302-308, 1967.

Chou, C. P., Lin, W. J., Kuo, B. Y., Et, A. L. Genetic Strategies to Enhance Penicillin Acylase Production in *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 27, p. 766-773, 2000.

Cocaingn-Bousquet, M.; Garrigues, C.; Novak, L.; Lindley, N. D.; Loubiere, P.; Rational Development of a Single Synthetic Medium for the Sustained Groth of *Lactococcus lactis*. **Journal of Applied Bacteriology**, vol. 79, p. 108-116, 1995.

Cohen, S.A.; Meys, M. E Tarvin, T.L. **Pico-Tag advanced methods manual**. Bedford, USA, Millipore, 1989.

Cole, M.; **Drugs of the Future**, vol. 6, p. 697-727, 1981.

Deak, P. M., Wahl, S. L., Bothe, H., e Fischer, L. Bioreactor Cultivation of *Escherichia Coli* for Production of Recombinant Penicillin G Amidase from *Alcaligenes faecalis*, **Biotechnology Letters**, vol. 25, p. 397-400, 2003.

De Leon, A. R.; Garcia, B., Barba De La Rosa; A. P., Villasenör, F., Estrada, A., Lopez, R. Periplasmic Penicillin G Acylase Activity In Recombinant *Escherichia Coli* Cells Permeabilized With Organic Solvents. **Process Biochemistry**, vol. 39, p. 301-305, 2003.

De León, A. R., Rivera, D. P., Medina, R., Flores, J. L, Estrada, A. B., Ordóñez, L. G. A. e Barba De La Rosa. A. P. Production of Penicillin Acylase by a Recombinant *Escherichia coli* Using Cheese Whey as Substrate and Inducer. **Biomolecular Engineering**, vol. 23, p. 299-305, 2006.

Duggleby, H. J.; Tolley, S. P.; Dodson, E. J.; Moody, P. C.; Penicillin Acylase has a Single Amino Acid. **Nature**, vol. 373, p. 564-268, 1995.

Elander, R. P. Industrial Production of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 61, p. 385-395, 2003.

Erarslan A.; Terzi, L.; Guray A.; Bermek, E. Purification and Kinetics of Penicillin G Acylase from Mutant Strain of E. coli ATCC 11105. *J. Chem Technol Biotechnol.* vol. 51, p. 27-40, 1991.

Erarslan, A. e Ertan, H. Thermostabilization of penicillin G acylase obtained from a mutant of *Escherichia coli* ATCC 11105 by bisimidoesters as homobifunctional cross-linking agents. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 17, p.629-635, 1995.

Fisher, S. H.; Regulation of Nitrogen Metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la difference! *Molecular Microbiology*, vol. 32, p. 223-232, 1999.

Fitton, V., Santarelli, X. Evaluation of Immobilized Metal Affinity Chromatography for Purification of Penicillin Acylase. *J. Chromatogr.* vol. 754, 135-140, 2001.

Fitton, V., Verdoni, N., Sanchez, J., Santarelli, X. Penicillin Acylase Purification with the Aid of Pseudo-affinity Chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 49, p. 553-560, 2001.

Flores, G.; Xavier, S.; Osuna, J. Production of a Fully Functional, Permuted Single-Chain Penicillin G Acylase. *Protein Science*, vol. 13, p. 1677-1683, 2004.

Fonseca, L.P., Cabral, J.M. Evaluation of Affinity and Pseudo Affinity Adsorption Processes for Penicillin Acylase Purification. *Bioseparation*, vol. 6 (5), p. 293-302, 1996.

Gentina, J.C.; Acevedo, F.; Villagra, M. P. Short Communication: Effect of Complex Nitrogen Sources on the Production of Acylase by *Bacillus megaterium*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 13, p. 127-128, 1997.

Ghosh, R., Cui, Z. F. Protein Purification by Ultrafiltration with Pre-treated Membrane. *Journal of Membrane Science*, vol. 167, p. 47-53, 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.

Grafkova, J., Sobotkova, L., Kyslik, P. *Evaluation of Strains Derived from Escherichia coli* W as Hosts for the Expression of Penicillin G-Acylase-Encoding Gene Cloned on the Recombinant Plasmid pKA18. **Folia Microbiologica**, vol. 47, p. 189-192, 2002.

Hartree, E. F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, vol 48, p. 422-427, 1972.

Hojo, O., Kokka, C. O. Statistical Medium Optimization for the Production of Penicillin G Acylase from *Bacillus megaterium*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 13, p. 130-140, 1996.

Hojo, O.; Estudo sobre a Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **Tese**, São Carlos, UFScar, 1997.

Huang, S. W., Lin, Y. H., Chin, H. L., Wang, W. C., Kuo, B. Y., Chou, C. P. Effect of pH on High Temperature Production of Bacterial Penicillin Acylase in *Escherichia coli*. **Biotechnology Progress**, vol. 18, p 668-671, 2002.

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.

Isaka, K.; Suga, N.; Ishimura, F.; Kinetics and Mechanism of Acyl Transfer by Penicillin G Acylase Comparing Acyl Donors Methyl Chloroacetato an Methyl Phenylacetato. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. vol 79, nº 3, p. 224-228, 1995.

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*. **Moscow University Chemistry Bulletin**. vol. 44, p. 53-56, 2003.

Kasche, V., Loffler, F., Scholzen, T., Kramer, D.M., Boller, T. Rapid Protein Purification Using Phenylbutylamine-Eupergit: A Novel Method for Large-scale Procedures. **J. Chromatogr.**vol. 510, p. 149-154, 1990.

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.

Keilmann, C., Wanner, G., Bock, A. Molecular Basis of the Exclusive Low Temperature Synthesis of an Enzyme in *Escherichia coli* - Penicillin Acylase. ***Biological Chemistry Hoppe***, vol. 374, p. 983-992, 1993.

Klei, H. E., Daumy, G. O., Kelly, J. A. Purification and Preliminary Crystallographic Studies of Penicillin G Acylase from *Providencia rettgeri*. ***Protein Science***, vol. 4, p. 433-441, 1995.

Lehninger, A. L., ***Princípios de Bioquímica***. São Paulo, Sarvier, p. 127-194, 1991.

Li, X., Robbins J. W., Taylor, K. B. Effect of the Levels of Dissolved-Oxygen on the Expression of Recombinant Proteins in 4 Recombinant *Escherichia coli* Strains. ***Journal Of Industrial Microbiology***, vol. 9, p. 1-9, 1992.

Lin, Y. H., Hsiao, H. C., e Chou, C. P. Strain Improvement to Enhance the Production of Recombinant Penicillin Acylase in High-Cell-Density *Escherichia coli* Cultures ***Biotechnol. Prog.***, vol. 18, p. 1458-1461, 2002.

Liu, Y.C., Chang Chien, C.C., Suen, S.Y. Purification of Penicillin G Acylase Using Immobilized Metal Affinity Membranes. ***J. Chromatogr.*** vol. 794, p. 67-76, 2003.

Mahajan, P.B., Borkar, P.S. Properties of Penicillin Acylase from *Escherichia coli* NCIM 2500 Purified by Affinity Chromatography. ***Hindustan Antibiot. Bull.*** vol. 24, p. 38-40, 1982.

Mahajan, P.B., Borkar, P.S., 1984. Novel approaches to the purification of penicillin acylase. ***Appl. Biochem. Biotechnol.*** 9 (5-6), 421-437.

Martin, L.; Prieto, M. A.; Cortés, E.; Garcia, J. L.; Cloning and Sequencing of the pac Gene Encoding the Penicillin G Acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. ***FEMS Microbiology Letters***, vol. 125, p. 287-292, 1995.

Meevootisom, V., Saunders, J. R. Cloning and Expression of Penicillin Acylase Genes from Overproducing Strains of *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium*. ***Applied Microbiology and Biotechnology***, vol. 25, p. 372-378, 1987.

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, 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.

Monteiro, S. M., Clemente, J. J., Henriques, A. O., Gomes, R. J., Carrondo, M. J., e Cunha, A. E. A Procedure for High-Yield Spore Production by *Bacillus subtilis*. ***Biotechnol. Prog.*** vol. 21, p. 1026-1031, 2005.

Mooter, V. D, Swings, M. Numerical Analysis of 295 Phenotypic Features of 266 *Xanthomonas* Strains and Aim Proved Taxonomy of the Genus. ***J. Syst. Bacteriol.***, vol. 40, p. 348-369, 1990.

Moo-Young, M.; Chisti, Y.; Biochemical Engineering In Biotechnology. ***Pure & Applied Chemistry***, vol. 66, p. 117-136, 1994.

Murao, S.; Sakaguchi, K.; Kono, K.; Process for Preparing 6-aminopenicillanic Acid by *Bacillus megaterium*, ***U.S. Patent 3***, p. 144-395, 1964.

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.

Neidhardt, F. C. Bloch, P. L.; Smith, D. F.; Culture Medium for Enterobacteria. ***Journal of Bacteriology***, vol. 119, p. 736-747, 1974.

Neviani, E.; Giraffa, G.; Brizzi, A.; Carminati, D.; Amino Acid Requeriments and Peptidase Activities of *Streptococcus salivariu* subsp. *Thermophilus*. ***Journal of Applied Bacteriology***, vol. 79, p. 302-307, 1995.

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.

Ochoa, L. C.; D.; Rodríguez, C. G.; Valério, G. A.; Ros, R. O. Screening, Purification and Characterization of the Thermoalkalophilic Lipase Produced by *Bacillus thermoleovorans* CCR1. ***Enzyme and Microbial Technology***, vol. 37, p. 648-654, 2005.

Ohashi, H.; Katsuta, Y.; Nagashima, M.; Kamei, T.; Yano, M.; Expression of the *Arthrobacter viscosus*. Penicillin G Acylase Gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. ***Applied and Environmental Microbiology***, p. 1351-1356, 1989.



Ospina, S. S. Characterization and Use of a Penicillin Acylase Biocatalyst. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 205-214, 1992.

Ozmihci, S e Kargi, F. Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations. *Bioresource Technology*, vol. 98, p. 2978–2984, 2006.

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<sup>a</sup> edition, 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., Silva, A. F. S., Silva, R. G., Giordano, R. L. C. Study of Different Media for Production of Penicillin G Acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 84-6, p. 655-663, 2000.

Pinotti, L. M., Silva, R. G., Giordano, R. C. e Giordano, R. L. C. Inoculum03. studies in the Production of Penicillin G Acylase by *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Appl Biochem Biotechnol.*, vol. 679-86, p. 98-100, 2002.

Pinotti, L. M.; Produção e Purificação de Penicilina G Acilase. *Tese*, São Carlos, 20

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.

Plháčková, K., Becka, S., Skrob, F., Kyslík, P. Isolation and Characterization of a New Strain of *Achromobacter* Sp. with  $\beta$ -Lactam Antibiotic Acylase Activity. *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 62, p. 62:507–516, 2003.

Rajendhran, J.; Krishnakumar, V.; Gunasekaran, P.; Production of Penicillin G acylase from *Bacillus* sp.: Effect of medium components. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. vol. 19, p. 107–110, 2003.

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.

Reed, L. J. e Muench, H. A simple method for estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hygiene*, vol. 27, p. 493-497, 1938.

Richards, N. S. P. S. Emprego Racional do Soro Láctico. *Indústria de Laticínios*. 67-69., 1997.

Rodrigues, D. S., Costa, J. O., Mendes, A. A., Souza, V. R., Adriano, W. S. E Giordano, R. L. C. Purificação de Penicilina G Acilase Presente em Caldo Fermentativo de *Bacillus megaterium* por Adsorção em Suporte de Afinidade. *XVI Simpósio Nacional de Bioprocesso. Anais do Congresso*, Curitiba – PR, 2007.

Santos, V. E. Producción De Xantano. Phd Thesis. Madrid, Spain, Universidad Complutense, 1993.

Santarelli, X., Fitton, V., Verdoni, N., Cassagne, C. Preparation, Evaluation and Application of New Pseudo-affinity Chromatographic Supports for Penicillin Acylase Purification. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* vol. 739 (1), p. 63-72, 2000.

Sargantanis, I. G., Karim, M. N. Effect of Oxygen Limitation on Beta-Lactamase Production. *Biotechnology Progress*, vol. 12, p. 786-792, 1996.

Savidge, T. A.; Cole, M.; Penicillin Acylase (bacterial). *Methods in Enzymology*, vol. 43, p. 705-721, 1975.

Sebek, O. K.; *Biotechnology*, chapter 7, 1987.

Senthilvel, S. G., Pai, J. S. Purification of Penicillin Acylase of *Bacillus megaterium*. *Biotechnology Techniques*, vol. 10, p. 611-614, 1996.

Shewale, J. G.; Sivaraman, H. Penicillin Acylase: Enzyme Production and its Application in the Manufacture of 6-APA. *Proc. Biochem.*, p. 146-154, 1989.

Shewale, J. G.; e Sudhakaran, V. K. Penicillin V acylase: Its potential in the production of 6-aminopenicillanic acid *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 20, p. 402-410, 1997.

Shuler, M.L., Kargi, F. *Bioprocess Engineering – Basic Concepts*. New Jersey, USA, Prentice Hall, p. 479, 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.

Silva, R. G.; Souza, V. R.; Nucci, E. R.; Pinotti, I. M.; Cruz, A. J. G.; Giordano, R. C.; e Giordano, R. L. C. Using a Medium of Free Amino Acids to Produce Penicillin G Acylase in Fed-batch Cultivations of *Bacillus megaterium* ATCC 14945. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, vol. 23, p. 37-43, 2006.

Sinchaikul, 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.

Sobotkova, L., Stepanek, V., Plhackova, K. Development of a High-Expression System for Penicillin G Acylase Based on the Recombinant *Escherichia coli* Strain RE3(pKA18). *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 19, p. 389-397, 1996.

Souza, V. R.; Requerimentos Nutricionais na Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945, *Dissertação de Mestrado*, São Carlos, UFSCar, 2003.

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.

Szentirmai, A. Production of Penicillin Acylase. *Applied Microbiology*, vol. 12, p. 185, 1964.

Tessier, L., Bouchard, P., Rahni, M. Separation and Purification of Benzylpenicillin Produced by Fermentation Using Coupled Ultrafiltration and Nanofiltration Technologies. *Journal of Biotechnology*, vol. 116, p. 79-89, 2005.

Tonin, F. C. Avaliação de Variáveis Operacionais e Aplicação de Enfoque Hídrico na Modelagem do Processo de Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium*. *Dissertação de Mestrado*, São Carlos, UFSCar, 2005.

Valesova, R., Hollerova-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***, vol. 35, p. 74-80, 2004.

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.

Vauterin, L., Hoste, B., Kerster, K., Swings. Reclassification of *Xanthomonas*. ***International Journal of Systematic Bacteriology***, vol. 45, p. 472-489, 1995.

Verhaert, R. M. D., Riemens, A. M., Vanderlaan, J. M., Vanduin, J. e Quax, W. J, Molecular Cloning and Analysis of the Gene Encoding the Thermostable Penicillin G Acylase from *Alcaligenes Faecalis*. ***Applied and Environmental Microbiology***, vol. 63, p. 3412-3418, 1997.

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<sup>nd</sup> 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 O<sub>2</sub>. ***Folia Microbiol.***, vol. 20, p. 289 -297, 1975.

Zhang, M., Shi, M., Zhou, Z., Yang, S., Yuan, Z. Y., Ye, Q. Production of *Alcaligenes faecalis* Penicillin G Acylase in *Bacillus subtilis* WB600 (pMA5) Fed with Partially Hydrolyzed Starch. ***Enzyme and Microbial Technology***, vol. 39, p. 555-560, 2006.

Zhou, H.; Ni, J.; Huang, W.; Zhang, J. Separation of Hyaluronic Acid from Fermentation Broth by Tangential Flow Microfiltration and Ultrafiltration. ***Separation and Purification Technology***, vol. 52, p. 29–38, 2006.

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.***, vol. 21, p. 60-64, 2001.

Yang, Y., Biedendieck, R., Wang, W., Gamer, M., Malten, M., Jahn, D., Deckwer, W. D. High Yield Recombinant Penicillin G Amidase Production and Export into the Growth Medium Using *Bacillus megaterium*. ***Microbial Cell Factories***, vol. 5, p. 24-42, 2006.

Wen, Y.; Shi, X.; Yuan, Z. e Zhoua, P. Expression, Purification, and Characterization of His-Tagged Penicillin G Acylase from *Kluyvera citrophila* in *Escherichia coli*. ***Protein Expression and Purification***, vol. 38, p. 24–28, 2004.

## ANEXO 1: Procedimento para contagens bacterianas

Método TCID<sub>50</sub> – Reed and Muench, 1938

### 1. Preparação das placas de 96 poços (ver figura abaixo):

a. Colocar em cada um dos poços **a2** a **a?** da linha **a**, 180 µL de meio de cultura apropriado. O número de poços deverá ser igual ao número de diluições preliminares (que não serão testadas nos poços teste);

b. Colocar em cada um dos poços **b** a **g** das colunas **1** a **11** 180 µL de meio de cultura apropriado;

### 2. Preparação das diluições:

c. Colocar no poço **a1** a amostra a titular;

d. Retirar 20 µL do poço **a1** e colocar no poço **a2**. Homogenizar a amostra utilizando a micropipeta;

e. Trocar a ponta da micropipeta, e repetir o passo anterior nos poços da linha **a** até uma diluição antes da primeira diluição a colocar nos poços teste.

f. Trocar a ponta da micropipeta e retirar 20 µL do último poço das diluições preliminares (**a?**) e colocar no poço **b1**. Homogenizar a amostra utilizando a micropipeta;

g. Trocar a ponta da micropipeta, e retirar 20 µL do poço **b1** e colocar no poço **c1**. Homogenizar a amostra utilizando a micropipeta;

h. Repetir o passo anterior até concluir todas as diluições requeridas.

### 3. Inoculação dos poços teste:

i. Com uma pipeta multicanal, retirar 10 µL de cada uma das diluições dos poços **b1** a **g1**, e colocar nos poços **b2** a **g2**;

j. Repetir o passo anterior e inocular os poços das colunas seguintes

### 4. Incubação da placa

Incubar a placa pelo período de tempo apropriado, à temperatura ótima de crescimento do microrganismo.

### 5. Contagem

Contar o número de poços contaminados e não contaminados em cada uma das diluições. Os poços contaminados são normalmente diferenciados dos não contaminados a

olho nú desde que o tempo de incubação seja suficiente, visto apresentarem turbidez. A leitura pode também ser feita num leitor de densidades ópticas em placas de 96 poços.

## 6. Cálculo do título

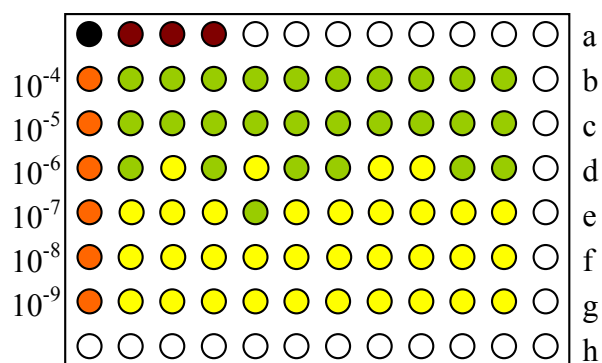
O TCID<sub>50</sub> é utilizado para determinação do título. Para contagens de bactérias o valor do TCID<sub>50</sub>/mL, corresponde à concentração de células por mL

### Notas importantes:

1. É necessário mudar sempre a ponta da micropipeta entre duas diluições. Sendo um método baseado em diluições limite, a utilização da mesma ponta gera falsos positivos por contaminação transferida pela ponta;
2. A distribuição das amostras previamente diluídas pelos poços teste pode ser feita com o mesmo conjunto de pontas na micropipeta;
3. Os poços periféricos da placa apenas devem ser utilizados para preparar as diluições (poços da linha **a** para as diluições preliminares e poços da coluna **1** para as diluições a aplicar nos poços teste, não devendo os restantes poços periféricos (linha **h** e coluna **12**) serem utilizados como poços de ensaio
4. Para uma maior precisão no resultado devem ser feitas pelo menos três placas por amostra a titular.
5. No caso de contagem de esporos, a amostra deve ser tratada termicamente à temperatura adequada antes de ser aplicada na placa.

### Exemplo para contagem de bactérias:

#### a) Incubação das amostras



- Amostra a titular 1 ● 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

- Diluições preliminares
- Diluições da amostra aplicar nos poços teste
  - Poço teste contaminado após incubação
  - Poço teste não contaminado após incubação

**Figura 1.1:** Representação esquemática da incubação das amostras na placa de 96 poços

### b) Contagem após incubação

Volume de amostra aplicado em cada poço: 10 µL;

Número de poços por diluição: 10

**Tabela 1.1:** Somatório de poços contaminados (positivos) e não contaminados (negativos) após 48 horas de incubação a 30°C.

	Diluição viral					
	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>
Positivos	10	10	6	1	0	0
Negativos	0	0	4	9	10	10
Σ Positivos	27	17	7	1	0	0
Σ Negativos	0	0	4	13	23	33
Σ Positivos/ (Σ Positivos. + Σ Negativos)	27/27	17/17	7/11	1/14	0/23	0/33
% Positivos	100	100	63.6	7.1	0	0

Σ Positivos – somatório da direita para a esquerda

Σ Negativos – somatório da esquerda para a direita

Em termos matemáticos a diluição limite 50% é dada por:

$$\log_{10}(\text{Dil. limite } 50\%) = \log_{10}(\text{dil. imediatam. } > 50\%) + (-PD)$$

PD é a distancia proporcional entre as duas diluições em que se esperaria encontrar 50% de respostas positivas. Esta distância é inferida por interpolação linear de acordo com a seguinte fórmula:

$$PD = ((\% \text{ pos. imediatam. } > 50\%) - 50\%) / ((\% \text{ pos. imediatam. } > 50\%) - \% \text{ pos. imediatam. } < 50\%)$$



Nos dados do exemplo:

$$PD = (63.6 - 50\%) / (63.6 - 7.1) = 0.24$$

$$\log_{10}(\text{Dil. limite } 50\%) = \log_{10}(10^{-6}) + (-0.24) = -6 - 0.24 = -6.24$$

O recíproco desta diluição corresponde ao título viral em número de doses infecciosas (TCID<sub>50</sub>) por unidade de inóculo

$$\text{Dil. limite } 50\% = 10^{(\log_{10}(\text{dil. imediatam. } > 50\%) + (-PD))}$$

Nos dados do exemplo:

$$\text{Dil. limite } 50\% = 10^{-6.24}$$

O título do stock viral original em termos de TCID<sub>50</sub> é dado por:

$$\text{TCID}_{50} = \frac{1}{\text{Dil. limite } 50\%}$$

Nos dados do exemplo:

$$\text{TCID}_{50} = \frac{1}{10^{-6.24}} = 10^{6.24} = 1.74 \cdot 10^6$$

Sendo em concentração dada por:

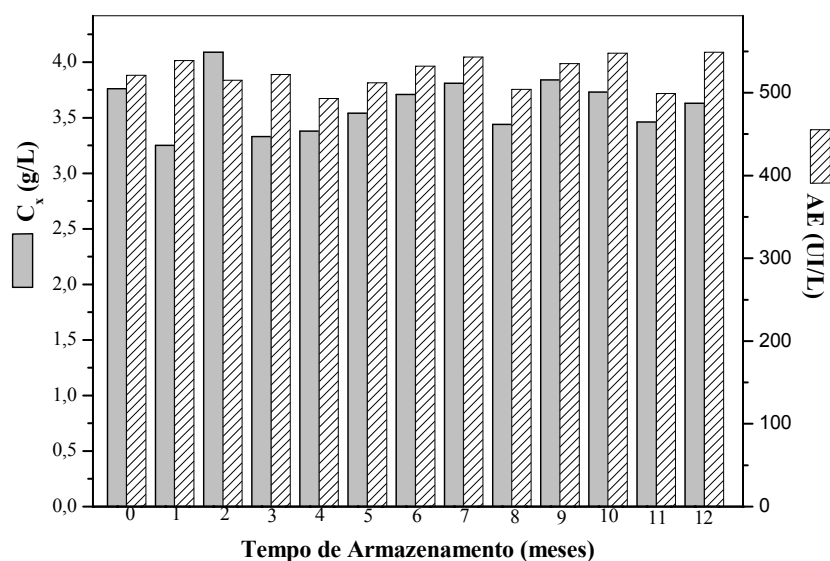
$$\text{TCID}_{50} / \text{mL} = \frac{1}{10^{(\log_{10}(\text{dil. imediatam. } > 50\%) + (-PD))}} \cdot \frac{1}{V}$$

Onde V é o volume de amostra aplicada em cada ensaio (mL)

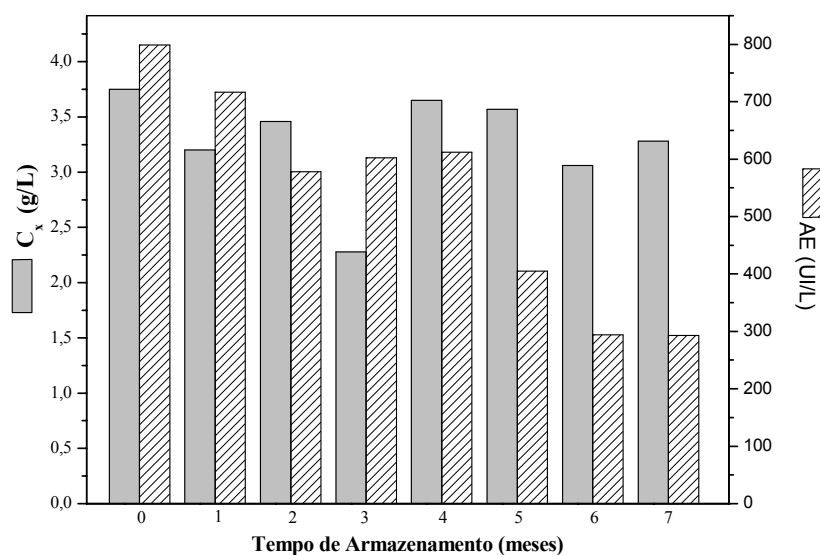
Nos dados do exemplo:

$$\text{TCID}_{50} / \text{mL} = 1.74 \cdot 10^6 \cdot \frac{1}{0.01} = 1.74 \cdot 10^8$$

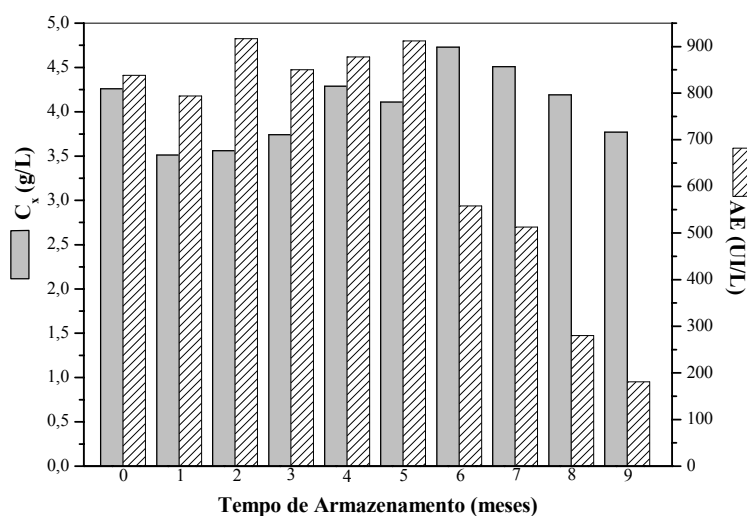
## ANEXO 2: Diferentes estratégias de preservação do microrganismo para manutenção da reprodutibilidade do inóculo e estabilidade da cultura para expressão da enzima



**Figura 2.1:** Acompanhamento mensal da concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos após 24 horas de cultivo de *B. megaterium* conservados como esporos  $-70^{\circ}\text{C}$  na presença de solução crioprotetora glicerol 20% v/v – criotubos Lote II.



**Figura 2.2:** Acompanhamento mensal da concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos após 24 horas de cultivo de *B. megaterium* conservados a como células dormentes a  $4^{\circ}\text{C}$  em tubos inclinados contendo meio sólido – “slants”.



**Figura 2.3:** Acompanhamento mensal da concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos após 24 horas de cultivo de *B. megaterium* conservados em eppendorfs.

#### **ANEXO 2.2: Avaliação da variabilidade do inóculo para microrganismo conservado como células vegetativas em glicerol 8% v/v a $-70^{\circ}\text{C}$ – eppendorfs**

**Tabela 2.1:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos no cultivo de *B. megaterium* em cinco ensaios em replicata em frascos agitados partindo de células vegetativas conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  em glicerol 8% v/v – eppendorfs

Ensaio	Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	A.E. (UI/L)
Eppendorf A	0	7,92	0,26	0
	24	8,79	4,26	838
Eppendorf B	0	7,87	0,23	0
	24	8,88	3,86	769
Eppendorf C	0	7,93	0,22	0
	24	8,95	3,79	852
Eppendorf D	0	7,91	0,22	0
	24	8,86	3,93	746
Eppendorf E	0	7,97	0,24	0
	24	8,92	3,48	789
Média			3,86	799
Desvio Padrão			0,28	45

### ANEXO 3: Diferentes composições de soluções de aminoácidos e outros substratos

**Tabela 3.1:** Diferentes composições de soluções de aminoácidos utilizadas nos meios de cultivo para produção de PGA por *Bacillus megaterium* em frascos agitados.

Aminoácido	Concentração (g/L)						
	Omissão de Ala	Omissão de Arg	Omissão de Asp	Omissão de Glu	Omissão de Lys	Omissão de Ser	Omissão de Thr
Ala	0	0,79	0,93	1,19	0,79	0,78	0,74
Arg	1,03	0	1,24	1,59	0	1,04	0,98
Asp	2,49	2,55	0	3,83	2,55	2,52	2,37
Glu	4,29	4,40	5,17	0	4,40	4,34	4,09
Lys	1,03	1,06	1,24	1,59	1,06	1,04	0,98
Ser	0,90	0,93	1,09	1,39	0,93	0	0,86
Thr	0,30	0,31	0,36	0,46	0,31	0,30	0
<b>Total</b>	<b>10,04</b>	<b>10,02</b>	<b>10,03</b>	<b>10,04</b>	<b>10,02</b>	<b>10,03</b>	<b>10,02</b>

**Tabela 3.2:** Composições de soluções de aminoácidos com omissões combinadas de Arg, Lys e Thr utilizadas nos meios de cultivo para produção de PGA por *Bacillus megaterium*

Aminoácido	Concentração (g/L)		
	Omissão de Arg e Thr	Omissão de Lys e Thr	Omissão de Arg, Lys e Thr
Ala	0,82	0,82	0,91
Arg	0	1,09	0
Asp	2,63	2,64	2,95
Glu	4,54	4,54	5,09
Lys	1,09	0	0
Ser	0,95	0,95	1,07
Thr	0	0	0
<b>Total</b>	<b>10,03</b>	<b>10,03</b>	<b>10,03</b>

**Tabela 3.3:** Composições de soluções de aminoácidos com concentrações de Asp e Glu reduzidas pela metade – (A) redistribuídas proporcionalmente aos demais aminoácidos, (B) redistribuídas proporcionalmente aos demais aminoácidos, exceto arginina, (C) sem redistribuição, totalizando 7,0 g/L e (D) 7,0 g/L com omissão de Thr.

Aminoácido	Concentração (g/L)			
	A	B	C	D
Ala	1,32	1,53	0,72	0,77
Arg	1,76	0,96	0,96	1,03
Asp	1,15	1,15	1,15	1,15
Glu	1,99	1,99	1,99	1,99
Lys	1,76	2,03	0,96	1,03
Ser	1,53	1,78	0,84	0,90
Thr	0,51	0,59	0,28	0
<b>Total</b>	<b>10,03</b>	<b>10,02</b>	<b>6,90</b>	<b>6,88</b>

**Tabela 3.4:** Composição reformulada da solução de aminoácidos utilizada nos meios de cultivo para produção de PGA por *Bacillus megaterium*.

Aminoácido	Concentração (g/L)
Ala	0,67
Arg	0,94
Asp	1,45
Glu	2,57
Lys	1,74
Ser	1,43
Thr	1,10
<b>Total</b>	<b>9,90</b>

**Tabela 3.5:** Composição da água de maceração de milho utilizada como fonte de carbono e nitrogênio na produção da PGA por *Bacillus megaterium* (Calderbank e Moo Young, 1959).

<b>Nutriente</b>	<b>Concentração (g/100 g)</b>
Sólidos	49,0 ± 1,7
Cinzas	9,0 ± 0,6
Azoto Total	3,6 ± 0,1
Glicose	2,0 ± 0,9
Ácido láctico	13,0 ± 1,7
Fósforo	1,7 ± 0,1
Potássio	2,3 ± 0,1

**Tabela 3.6:** Composição protéica do soro de queijo em pó utilizado na produção da PGA por *Bacillus megaterium* (Richards, 1997).

<b>Proteína</b>	<b>% mássica</b>	<b>Massa Molecular (kDa)</b>
β- lactoglobulina	49	18,3
α- lactoalbumina	16	14,2
Soro albumina bovina	5	69,0
Imunoglobulinas	10	1,5-1,0
Peptídeos	19	< 4,1

#### ANEXO 4: Consumo de aminoácidos ao longo do tempo de cultivo

**Tabela 4.1:** Consumo de aminoácidos ao longo do cultivo em frascos agitados utilizando soluções de aminoácidos com omissão individual ou combinada de Arg, Lys e Thr.

Ensaio	Tempo (h)	Concentração (g/L)							
		Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Ser	Thr	Total
Padrão	0	0,68	0,91	2,25	3,70	0,90	0,75	0,26	9,45
	24	0,00	0,00	1,19	1,24	0,00	0,00	0,00	2,43
Omissão de Arg	0	0,74	0,00	2,45	4,14	0,96	0,91	0,31	9,51
	24	0,00	0,00	1,79	1,12	0,00	0,00	0,00	2,92
Omissão de Lys	0	0,74	1,00	2,34	4,22	0,00	0,91	0,29	9,50
	24	0,00	0,00	1,09	1,40	0,00	0,00	0,00	2,49
Omissão de Thr	0	0,70	0,97	2,32	3,79	0,90	0,82	0,00	9,49
	24	0,00	0,00	1,64	1,11	0,00	0,00	0,00	2,75
Omissão de Arg e Thr	0	0,77	0,00	2,60	4,25	0,97	0,88	0,00	9,47
	24	0,00	0,00	1,51	1,41	0,00	0,00	0,00	2,93
Omissão de Lys e Thr	0	0,80	1,00	2,50	4,37	0,00	0,94	0,00	9,61
	24	0,00	0,00	1,28	1,71	0,00	0,00	0,00	3,00

**Tabela 4.2:** Consumo de aminoácidos ao longo do tempo de cultivo em frascos agitados utilizando soluções de aminoácidos com concentrações de Asp e Glu reduzidas à metade.

Ensaio	Tempo (h)	Concentração (g/L)							
		Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Ser	Thr	Total
Padrão	0	0,69	0,90	2,25	3,84	0,94	0,81	0,25	9,67
	24	0,00	0,00	1,18	2,65	0,00	0,00	0,00	3,82
A	0	1,28	1,73	1,11	1,96	1,73	1,49	0,48	9,79
	12	0,00	0,00	0,54	1,63	0,43	0,00	0,00	2,59
	24	0,00	0,00	0,50	0,95	0,25	0,00	0,00	1,71
B	0	1,46	0,92	1,09	1,98	1,93	1,75	0,56	9,68
	12	0,00	0,00	0,43	1,21	0,00	0,00	0,00	1,64
	24	0,00	0,00	0,29	0,92	0,00	0,00	0,00	1,21
C	0	0,66	0,92	1,11	1,93	0,91	0,82	0,26	6,59
	12	0,00	0,00	0,45	1,14	0,00	0,00	0,00	1,59
	24	0,00	0,00	0,36	0,87	0,00	0,00	0,00	1,22

(A) redistribuídas proporcionalmente aos demais aminoácidos, (B) redistribuídas proporcionalmente aos demais aminoácidos, exceto arginina, (C) sem redistribuição, totalizando 7,0 g/L.

**Tabela 4.3:** Consumo de aminoácidos ao longo do tempo de cultivo de *Bacillus megaterium* em frascos agitados utilizando solução de aminoácidos com composição reformulada inoculadas com células dormentes conservadas em glicerol 20% v/v a -70°C (criotubos).

Ensaio	Tempo (h)	Concentração (g/L)							
		Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Ser	Thr	Total
Padrão MC Padrão	0	0,69	0,91	2,29	3,95	0,88	0,79	0,26	9,77
	24	0,00	0,00	1,59	0,98	0,00	0,00	0,00	2,58
Padrão MC Reformulado	0	0,71	0,93	2,28	3,92	0,77	0,81	0,29	9,70
	24	0,00	0,00	1,11	1,06	0,00	0,00	0,00	2,17
MP Reformulado MC Padrão	0	0,65	0,84	1,37	2,23	1,58	1,12	0,98	8,93
	6	0,64	0,47	1,08	1,91	1,09	1,00	0,86	7,05
	12	0,09	0,09	0,55	1,40	0,75	0,04	0,08	3,00
	18	0,00	0,00	0,36	1,11	0,50	0,00	0,00	1,97
	24	0,00	0,00	0,24	0,77	0,00	0,00	0,00	1,01
MP Reformulado MC Reformulado	0	0,69	0,81	1,16	2,17	1,52	1,19	1,01	8,56
	6	0,52	0,45	0,86	1,63	1,04	0,82	0,7	6,03
	12	0,05	0,04	0,44	1,23	0,62	0,02	0,04	2,45
	18	0,00	0,00	0,34	1,1	0,33	0,00	0,00	1,77
	24	0,00	0,00	0,15	0,61	0,00	0,00	0,00	0,76

**Tabela 4.4:** Consumo de aminoácidos ao longo do cultivo de *B. megaterium* em biorreator partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 11: Meio de cultivo padrão com perfil crescente de agitação e pH inicial 9,0.

Tempo (h)	Concentração (g/L)							
	Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Ser	Thr	Total
0	0,64	0,71	2,41	3,54	0,76	0,72	0,28	9,06
2	0,57	0,63	2,32	3,29	0,72	0,66	0,25	8,44
4	0,51	0,61	2,24	3,14	0,68	0,6	0,23	8,02
6	0,48	0,51	2,24	3,3	0,7	0,57	0,17	7,96
8	0,45	0,25	2,53	3,81	0,76	0,42	0	8,23
12	0,12	0,02	2,2	3,51	0,56	0,05	0	6,45
14	0,01	0	1,9	3,08	0,26	0	0	5,25
20	0	0	1,68	2,77	0	0	0	4,45



**Tabela 4.5:** Consumo de aminoácidos ao longo do tempo de cultivo de *Bacillus megaterium* em frascos agitados utilizando solução de aminoácidos com composição reformulada inoculadas com células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a -70°C (ependorfs).

Ensaio	Tempo (h)	Concentração (g/L)							
		Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Ser	Thr	Total
Padrão	0	0,69	0,93	2,26	3,97	0,92	0,80	0,27	9,84
MC Padrão	24	0,00	0,00	1,24	1,07	0,00	0,00	0,00	2,31
Padrão	0	0,68	0,95	2,15	3,99	0,92	0,80	0,28	9,77
MC Reformulado	24	0,00	0,00	1,22	1,11	0,00	0,00	0,00	2,33
MP Reformulado MC Padrão	0	0,63	0,91	1,38	2,36	1,52	1,18	1,05	9,03
	6	0,41	0,47	0,91	1,76	1,03	0,49	0,65	5,73
	12	0,00	0,09	0,41	1,31	0,09	0,00	0,00	1,91
	24	0,00	0,00	0,14	0,52	0,00	0,00	0,00	0,66
MP Reformulado MC Reformulado	0	0,68	0,9	1,33	2,12	1,49	1,24	1,07	8,82
	6	0,41	0,47	0,91	1,76	1,30	0,49	0,65	5,73
	12	0,00	0,07	0,38	1,04	0,12	0,00	0,00	1,6
	24	0,00	0,00	0,14	0,50	0,00	0,00	0,00	0,64

**Tabela 4.6:** Consumo de aminoácidos ao longo do cultivo de *B. megaterium* em biorreator partindo de células vegetativas armazenados em ependorf – Ensaio 12: Perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 em meio de cultivo padrão.

Tempo (h)	Concentração (g/L)							
	Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Ser	Thr	Total
0	0,65	0,7	2,36	3,96	0,83	0,71	0,3	9,52
2	0,56	0,76	2,38	3,58	0,73	0,63	0,29	8,93
4	0,51	0,73	2,3	3,54	0,73	0,49	0,26	8,55
6	0,37	0,52	2,13	3,35	0,67	0,23	0,19	7,45
8	0,07	0,29	1,91	3,07	0,52	0	0	5,87
12	0,01	0,01	1,90	3,33	0,14	0	0	5,39
18	0	0	1,68	2,89	0	0	0	4,57
24	0	0	1,45	2,49	0	0	0	3,94

**Tabela 4.7:** Consumo de aminoácidos ao longo do cultivo de *B. megaterium* em biorreator partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 13: Perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 em meio de cultivo padrão em batelada alimentada.

Tempo (h)	Concentração (g/L)							
	Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Ser	Thr	Total
0	0,53	0,7	2,07	3,38	0,64	0,58	0,25	8,15
2	0,53	0,7	2,07	3,38	0,64	0,58	0,25	8,15
4	0,53	0,7	2,12	3,52	0,66	0,58	0,25	8,36
6	0,49	0,71	1,82	3,84	0,72	0,44	0,22	8,24
8	0,37	0,57	1,94	3,86	0,67	0,18	0,14	7,73
10	0,07	0,18	1,89	3,28	0,46	0,03	0	5,91
12	0	0	1,74	3,17	0,19	0	0	5,1
14	0	0	1,19	1,89	0	0	0	3,08
16	0	0,09	1,42	2,22	0,13	0	0	3,86
18	0	0	1,43	2,13	0,02	0	0	3,58
24	0	0,03	1,16	1,66	0,06	0	0	2,91
28	0	0	1,21	1,86	0,06	0	0	3,13
32	0	0	1,1	1,31	0	0	0	2,41
48	0	0	0,88	0,97	0	0	0	1,85

**Tabela 4.8:** Consumo de aminoácidos ao longo do cultivo de *B. megaterium* em biorreator partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 14: Meio de cultivo padrão com limitação na concentração de oxigênio dissolvido de 20 para 5% da saturação.

Tempo (h)	Concentração (g/L)							
	Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Ser	Thr	Total
0	0,61	0,79	2,26	3,87	0,75	0,69	0,29	9,26
2	0,55	0,76	2,27	3,89	0,76	0,59	0,27	9,09
4	0,37	0,61	2,32	3,86	0,69	0,21	0,17	8,23
6	0,01	0,11	1,79	3,55	0,46	0	0	5,92
8	0	0	1,7	3,52	0	0	0	5,22
12	0	0	1,32	2,51	0	0	0	3,83
14	0	0	1,14	2,12	0	0	0	3,26
16	0	0	1,07	2,13	0	0	0	3,2
18	0	0	1,18	2,18	0	0	0	3,36
20	0	0	1,14	1,94	0	0	0	3,08

**Tabela 4.9:** Consumo de aminoácidos ao longo do cultivo de *B. megaterium* em biorreator partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 15: Perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 em meio de cultivo contendo soro de queijo hidrolisado

Tempo (h)	Concentração (g/L)							
	Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Ser	Thr	Total
0	0,61	0,71	2,19	3,27	0,67	0,64	0,26	8,35
2	0,57	0,72	2,21	3,39	0,7	0,65	0,26	8,5
4	0,58	0,64	2,12	3,22	0,64	0,59	0,24	8,03
6	0,52	0,6	2,15	3,24	0,66	0,55	0,21	7,93
8	0,48	0,09	2,07	3,49	0,63	0,01	0	6,77
12	0,16	0,05	1,28	2,21	0,30	0	0	4,00
18	0	0	1,87	1,97	0,1	0	0	3,94

**Tabela 4.10:** Consumo de aminoácidos ao longo do cultivo de *B. megaterium* em biorreator partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 17: Soro de queijo hidrolisado e manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação em todo cultivo e pH inicial 8,0.

Tempo (h)	Concentração (g/L)							
	Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Ser	Thr	Total
0	0,79	0,89	2,38	4,18	0,89	0,82	0,33	10,09
2	0,84	0,86	2,32	4,18	0,86	0,73	0,31	9,9
4	0,69	0,82	2,24	3,98	0,82	0,37	0,22	8,8
6	0,2	0,56	2,26	3,62	0,56	0	0	6,69
8	0	0,07	1,65	3,43	0,07	0	0	5,15
12	0	0	1,59	3,4	0	0	0	4,99
14	0	0	1,08	2,32	0	0	0	3,40
18	0	0	1,24	2,76	0	0	0	4,00
24	0	0	1,24	1,12	0	0	0	2,36

**Tabela 4.11:** Consumo de aminoácidos ao longo do cultivo de *B. megaterium* em biorreator partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 19: Perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0, com meio de cultivo reformulado.

Tempo (h)	Concentração (g/L)							
	Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Ser	Thr	Total
0	0,61	1,14	1,62	2,5	1,28	1,36	0,74	9,25
2	0,56	1,12	1,55	2,45	1,29	1,29	0,53	8,79
4	0,47	0,93	1,49	2,44	1,19	1,11	0,34	7,97
6	0,36	0,81	1,29	2,23	1,16	0,9	0,22	6,97
8	0,12	0,65	1,15	2,43	0,97	0,41	0	5,73
10	0	0	1,02	2,16	0,9	0,1	0	4,17
12	0	0	1,02	1,96	0,45	0	0	3,43
14	0	0	0,87	1,75	0,05	0	0	2,67
16	0	0	0,73	1,45	0	0	0	2,18
18	0	0	0,64	1,24	0	0	0	1,88
20	0	0	0,64	1,23	0	0	0	1,87
22	0	0	0,56	1,07	0	0	0	1,63
24	0	0	0,36	0,69	0	0	0	1,05

**Tabela 4.12:** Consumo de aminoácidos ao longo do cultivo de *B. megaterium* em biorreator partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 20: Meio reformulado e manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação em todo cultivo e pH inicial 8,0, batelada alimentada.

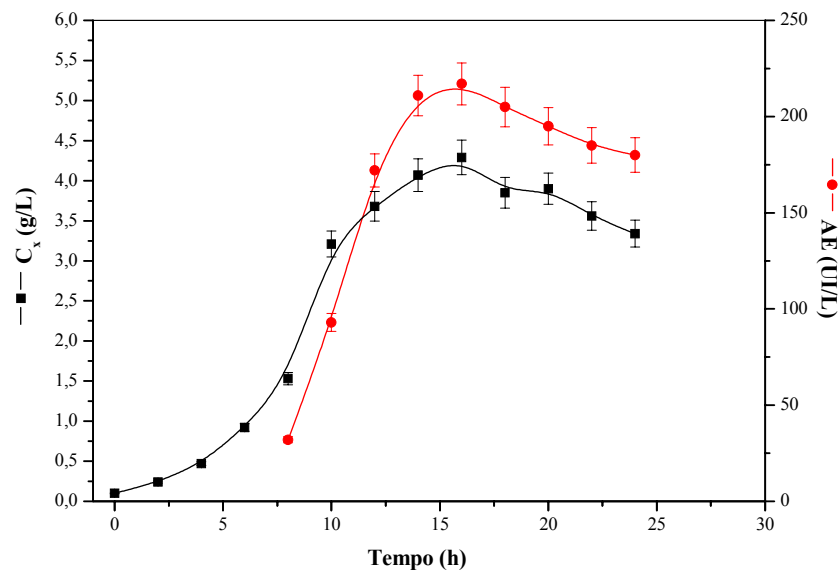
Tempo (h)	Concentração (g/L)							
	Ala	Arg	Asp	Glu	Lys	Ser	Thr	Total
0	0,82	0,67	1,69	2,94	1,97	1,78	1,6	11,48
2	0,81	0,57	1,64	2,9	1,96	1,75	1,54	11,17
4	0,73	0,56	1,75	3,18	1,99	1,3	1,41	10,92
6	0,65	0,32	1,47	2,65	1,81	0,79	1,11	8,79
8	0,12	0,05	1,24	2,47	1,48	0,07	0,37	5,79
10	0,17	0,19	2,18	4,76	2,1	0,25	0,4	10,06
12	0,33	0,29	2,19	4,39	2,51	0,5	0,84	11,07
14	1,24	0,84	4,27	7,64	4,2	1,78	2,62	22,59
16	2,07	1,39	6,58	11,26	6,33	2,94	4,59	35,15
18	2,91	2,68	7,87	13,08	9,25	5,52	6,48	47,8
20	3,39	3,73	8,83	16,61	11,17	7,36	7,79	58,87
22	3,87	3,83	9,56	17,09	11,52	7,55	8,77	62,18
24	3,49	3,48	9,5	17,01	10,76	6,96	7,93	59,14
26	3,46	3,41	9,77	16,82	11,26	6,66	8,15	59,53
28	3,63	2,33	9,65	16,96	11,78	5,07	7,67	57,1
30	3,39	1,92	9,68	16,9	11,49	4,41	7,67	55,46
32	3,17	2,51	9,59	16,8	10,79	5,04	7,34	55,24
34	3,21	2,65	9,65	16,9	11,96	5,72	7,79	57,87
36	2,9	2,4	9,71	16,85	11,26	5,26	7,31	55,69
40	2,76	1,6	9,71	17,04	11,11	3,87	6,91	53
43	2,69	1,74	9,83	17,06	11,11	3,87	7,22	53,52
45	2,57	1,64	9,80	17,17	10,91	3,32	6,67	52,07
48	2,58	1,81	9,83	17,17	11,14	3,28	6,55	52,36

**ANEXO 5a: Acompanhamento do crescimento do microrganismo, produção de PGA e consumo de substratos ao longo do cultivo em biorreator com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido, partindo de esporos da nova linhagem de *B. megaterium* conservados em meio sólido a 4°C (slants).**

**Ensaio 1:** Limitação na concentração de oxigênio dissolvido de 20 para 5% da saturação após 9 horas de cultivo da nova linhagem de *B. megaterium* conservados em meio sólido a 4°C (slants).

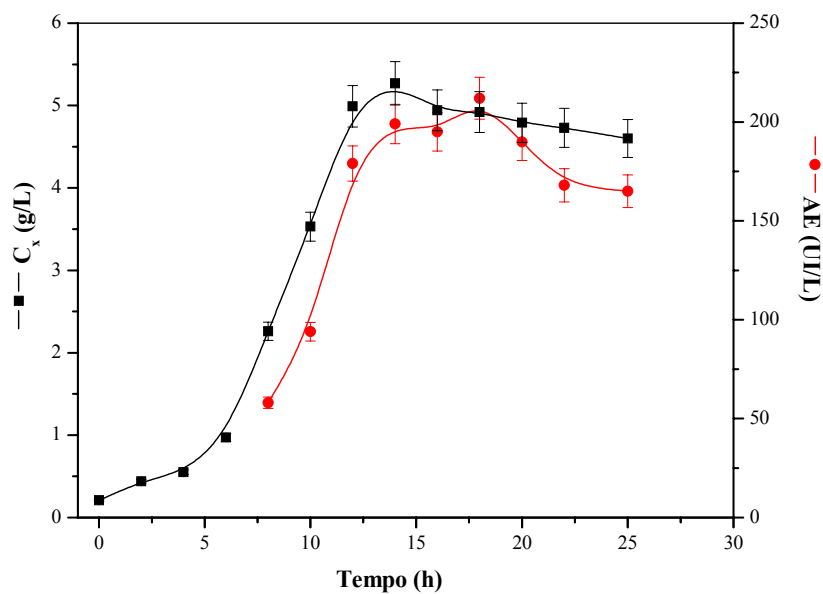
**Tabela 5a.1:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos na produção de PGA em biorreator e frascos agitados. Ensaio 1 – Meio de cultivo padrão com limitação de 20 para 5% de oxigênio dissolvido após 9 horas de cultivo.

Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (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 – 24 h	8,76	3,98	331



**Figura 5a.1:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em biorreator utilizando meio padrão com limitação da concentração de oxigênio dissolvido de 20 para 5% da saturação após 9 horas de cultivo – Ensaio 1.

**Ensaio 2:** Manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação durante todo cultivo da nova linhagem de *B. megaterium* conservada em slants.

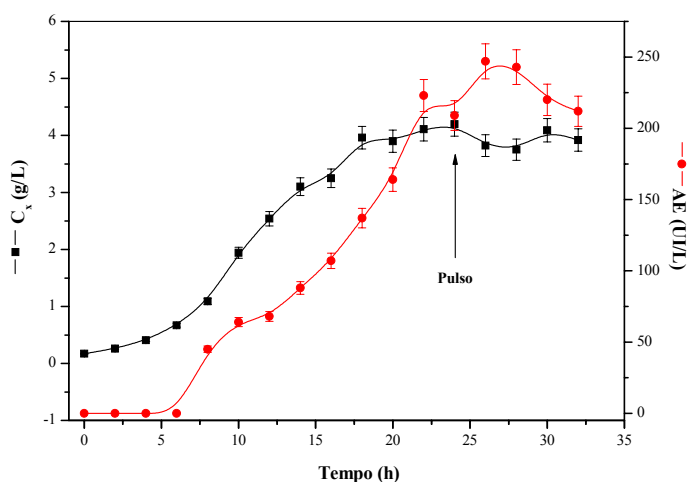


**Figura 5a.2:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos em biorreator com meio padrão e concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação durante todo cultivo – Ensaio 2.

**Tabela 5a.2:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) obtidos na produção de PGA em biorreator e frascos agitados – Ensaio 2: Meio de cultivo padrão com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação durante todo cultivo.

Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (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
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 – 24 h	8,73	4,07	427

**Ensaio 3:** Agitação fixa em 300 rpm no decorrer de todo o cultivo da nova linhagem de *B. megaterium* conservada em slants com adição de 1 pulso.



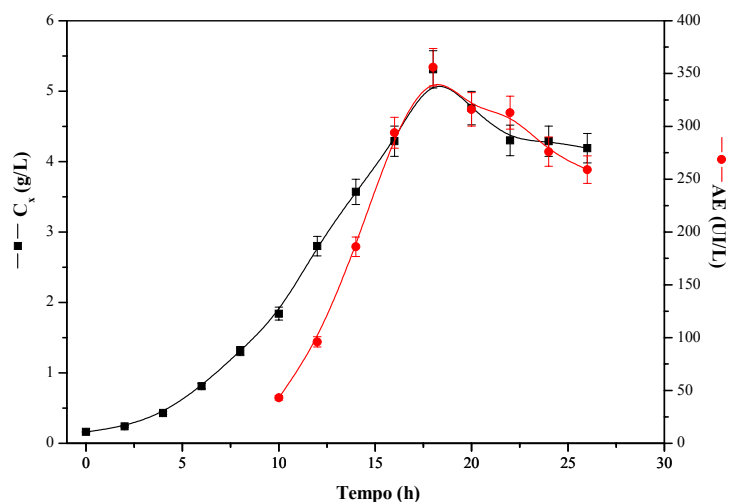
**Figura 5a.3:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em biorreator utilizando meio padrão e adição de pulso, com velocidade de agitação mantida a 300 rpm durante todo o cultivo – Ensaio 3.



**Tabela 5a.3:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (A.E.) obtidos na produção de PGA em biorreator e frascos agitados – Ensaio 3: Meio de cultivo padrão com adição de pulso e velocidade de agitação constante em 300 rpm durante todo cultivo.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b><math>C_x \pm 0,11</math> (g/L)</b>	<b>A.E. <math>\pm 22</math> (UI/L)</b>
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 – 24 h	8,55	3,88	407

**Ensaio 4:** Manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação durante todo cultivo da nova linhagem de *B. megaterium* conservada em slants.

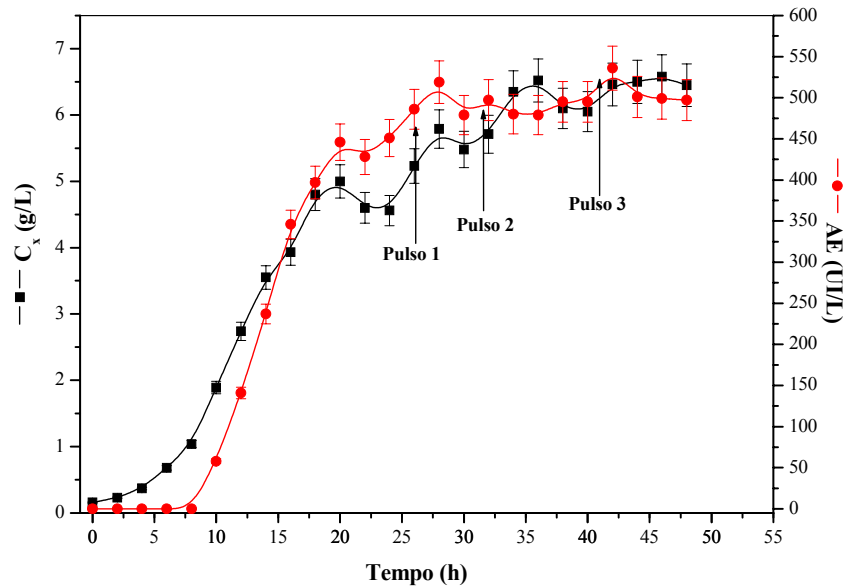


**Figura 5a.4:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em biorreator utilizando meio padrão com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação durante todo cultivo – Ensaio 4.

**Tabela 5a.4:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (A.E.) obtidos na produção de PGA em biorreator e frascos agitados – Ensaio 4: Meio de cultivo padrão com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação durante todo cultivo.

Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
0	6,97	0,16	-
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
Shaker – 24 h	8,68	4,19	380

**Ensaio 5:** Manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação durante todo cultivo da nova linhagem de *B. megaterium* conservada em slants com adição de pulsos.

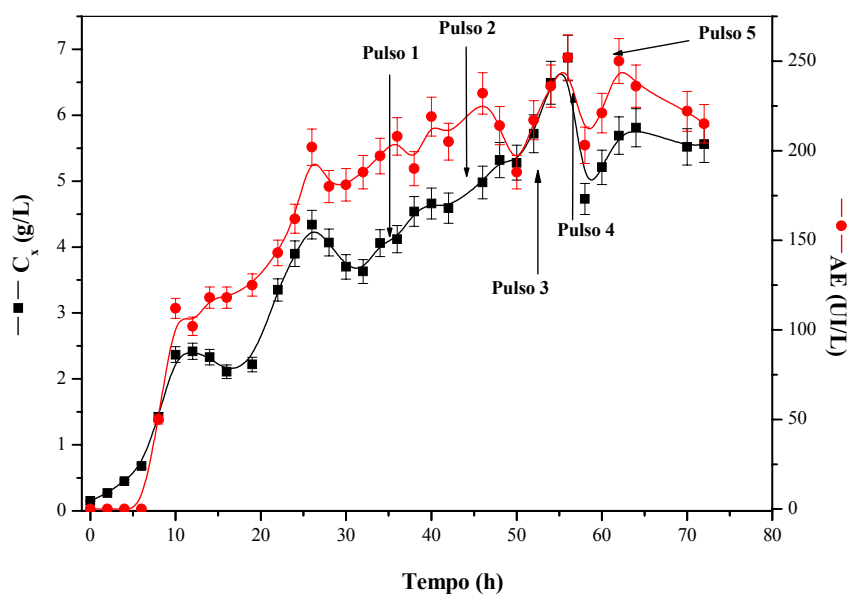


**Figura 5a.5:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em biorreator utilizando meio padrão com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação com adição de pulsos de nutrientes – Ensaio 5.

**Tabela 5a.5:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (A.E.) obtidos na produção de PGA em biorreator e frascos agitados – Ensaio 5: Meio padrão com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação com adição de 3 pulsos de nutrientes.

Tempo (h)	pH	C <sub>x</sub> (g/L)	AE (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 – 24 h	8,56	4,24	373

**Ensaio 6:** manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 5% da saturação até 17 horas e 10% até o final do cultivo com adição de pulsos de nutrientes partindo da nova linhagem de *B. megaterium* conservada em slants com adição de pulsos.



**Figura 5a.6:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em biorreator utilizando meio padrão com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 5% até 17 horas e 10% até o final todo cultivo com adição de pulsos – Ensaio 6.

**Tabela 5a.6:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE). Ensaio 6: Meio de cultivo padrão com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 5% da saturação até 17 horas e 10% até o final do cultivo com adição de pulsos de nutrientes.

Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (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

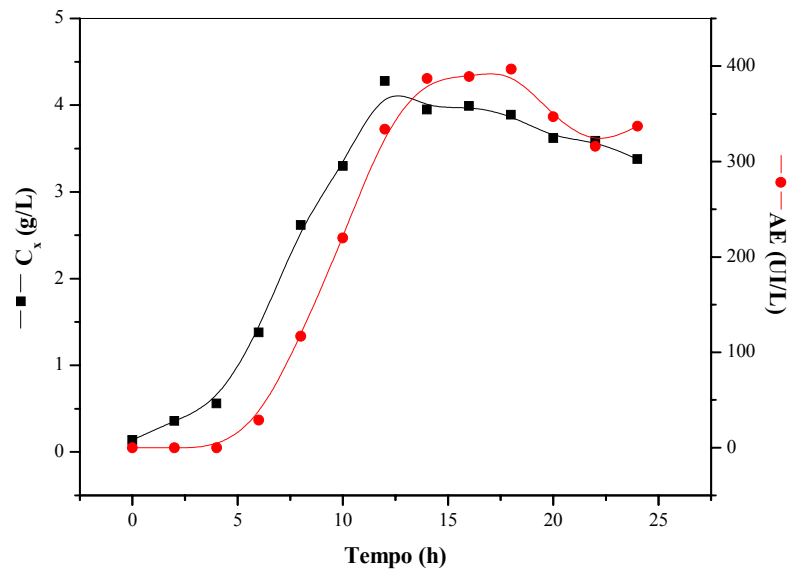
28	8,76	4,07	180
30	8,94	3,70	181
32	8,98	3,63	188
34	8,84	4,06	197
36	8,86	4,12	208
38	8,80	4,54	190
40	8,88	4,66	219
42	8,95	4,59	205
46	8,96	4,98	232
48	8,90	5,32	214
50	8,92	5,28	188
52	8,73	5,72	217
54	8,75	6,49	236
56	8,82	6,87	252
58	8,59	4,73	203
60	8,65	5,21	221
62	8,71	5,69	250
64	8,76	5,81	236
70	9,00	5,52	222
72	9,02	5,56	215
Shaker – 24 h	8,30	3,90	342

**ANEXO 5b: Acompanhamento do crescimento do microrganismo, produção de PGA e consumo de substratos ao longo do cultivo em biorreator com diferentes concentrações de oxigênio dissolvido, partindo da linhagem tradicional de *Bacillus megaterium*.**

**Ensaio 7:** Manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação durante todo cultivo da linhagem tradicional de *Bacillus. megaterium* em meio padrão a pH inicial 7,0.

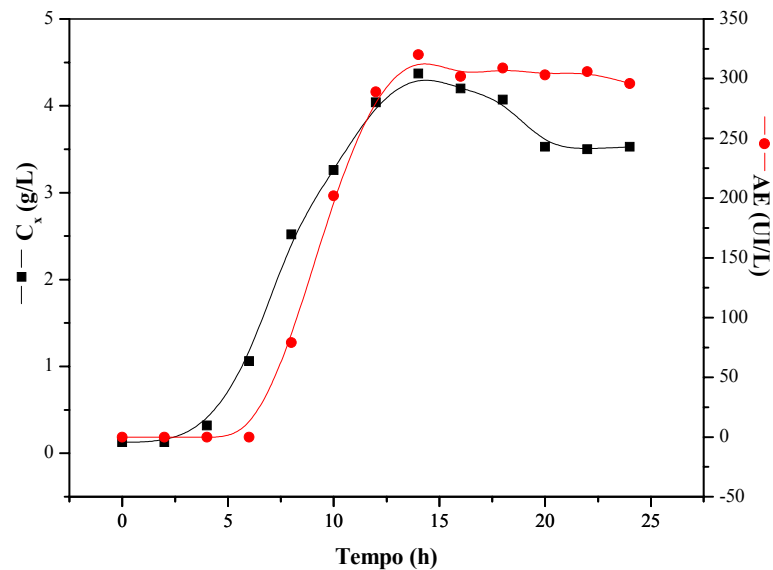
**Tabela 5b.1:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (A.E.) obtidos na produção de PGA em biorreator e frascos agitados inoculados com esporos armazenados em meio sólido a 4°C – Ensaio 7: Meio de cultivo padrão com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação durante todo cultivo e pH inicial 7,0.

Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	8,31	1,64	-
0	7,02	0,14	0
2	7,56	0,36	0
4	7,83	0,56	0
6	8,24	1,38	29
8	8,30	2,62	117
10	8,46	3,30	220
12	8,57	4,28	334
14	8,81	3,95	387
16	8,90	3,99	389
18	8,93	3,89	397
20	8,98	3,62	347
22	9,02	3,59	316
24	9,02	3,38	337
Shaker 24 h – pH 8,0	8,93	3,48	519
Shaker 24 h – pH 7,0	8,65	3,29	463



**Figura 5b.1:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo utilizando meio padrão partindo de esporos conservados em slant, com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação e pH inicial 7,0 – Ensaio 7.

**Ensaio 8:** Manutenção do oxigênio dissolvido em 10% da saturação durante todo cultivo da linhagem tradicional de *B. megaterium* em meio padrão a pH inicial 8,0.



**Figura 5b.2:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) partindo de células dormentes conservadas em meio sólido a 4°C, com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação durante todo cultivo e pH inicial 8,0 – Ensaio 8.



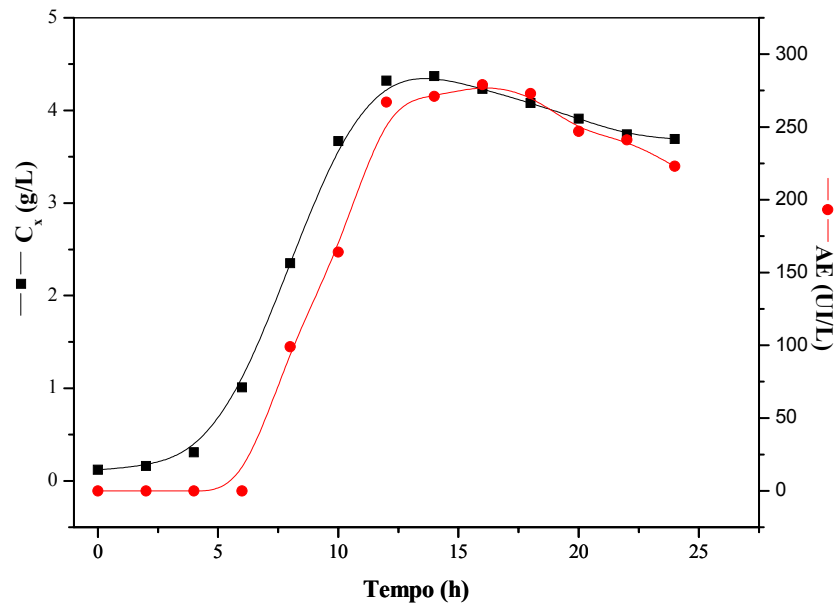
**Tabela 5b.2:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (A.E.) obtidos na produção de PGA partindo de esporos armazenados a 4°C – Ensaio 8: Meio padrão com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação e pH inicial 8,0

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b><math>C_x</math> (g/L)</b>	<b>AE (UI/L)</b>
Inóculo	8,37	1,34	-
0	7,62	0,13	0
2	7,73	0,13	0
4	7,93	0,32	0
6	8,27	1,06	0
8	8,43	2,52	79
10	8,56	3,26	202
12	8,66	4,04	289
14	8,71	4,37	320
16	8,83	4,20	302
18	8,92	4,07	309
20	8,99	3,53	303
22	9,06	3,50	306
24	9,10	3,53	296
Shaker 24 h – pH 8,0	8,67	3,59	547
Shaker 24 h – pH 7,0	8,64	3,77	456

**Ensaio 9:** Manutenção do oxigênio dissolvido em 20% da saturação durante todo cultivo da linhagem tradicional de *B. megaterium* em meio padrão a pH inicial 7,0.

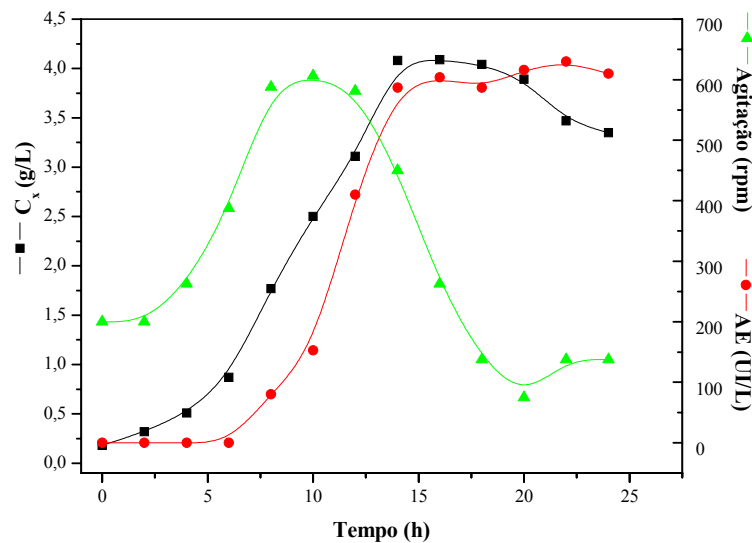
**Tabela 5b.3:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (A.E.) obtidos na produção de PGA partindo de esporos armazenados em meio sólido a 4°C – Ensaio 9: Meio de cultivo padrão com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação durante todo cultivo e pH inicial 7,0.

Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	8,56	1,53	-
0	6,90	0,12	0
2	7,39	0,16	0
4	7,70	0,31	0
6	8,16	1,01	0
8	8,30	2,35	99
10	8,48	3,67	164
12	8,64	4,32	267
14	8,82	4,37	271
16	8,89	4,23	279
18	9,01	4,08	273
20	9,03	3,91	247
22	9,07	3,74	241
24	9,21	3,69	223
Shaker 24 h – pH 8,0	8,65	3,47	611
Shaker 24 h – pH 7,0	8,62	3,27	573



**Figura 5b.3:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) partindo de células dormentes conservadas em meio sólido a 4°C, com manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação durante todo cultivo e pH inicial 7,0 – Ensaio 9.

**Ensaio 10:** Perfil crescente de agitação com meio de produção padrão e pH inicial 8,0 partindo da linhagem tradicional de *B. megaterium*.

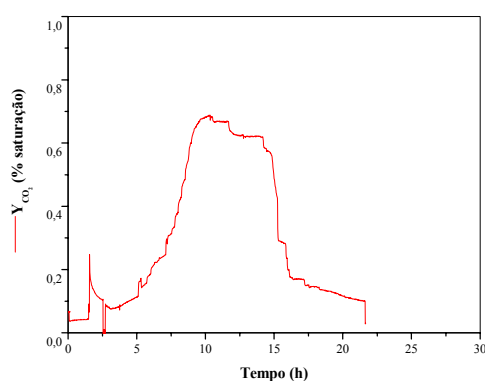


**Figura 5b.4:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE) e velocidade de agitação ao longo do cultivo utilizando meio padrão partindo de células dormentes conservadas em meio sólido a 4°C, com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 – Ensaio 10.

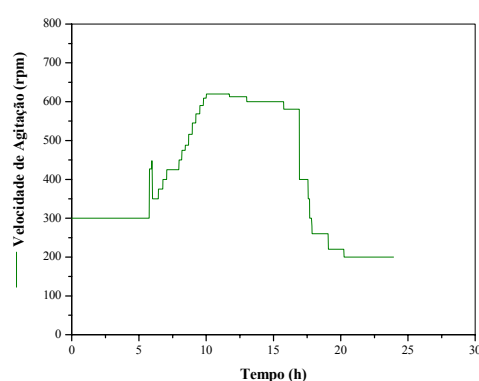
**Tabela 5b.4:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE) e velocidade de agitação obtidos na produção de PGA partindo de esporos armazenados em “slants” – Ensaio 10: Meio de cultivo padrão com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0

Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	Agitação (rpm)
Inóculo	8,43	1,67	-	300
0	7,73	0,18	0	300
2	7,86	0,32	0	300
4	7,98	0,51	0	350
6	8,15	0,87	0	450
8	8,27	1,77	80	610
10	8,40	2,50	153	625
12	8,52	3,11	410	605
14	8,68	4,08	587	500
16	8,74	4,09	604	350
18	8,85	4,04	587	250
20	8,89	3,89	616	200
22	8,91	3,47	630	250
24	8,96	3,35	610	250
Shaker 24 h	8,67	3,54	660	300

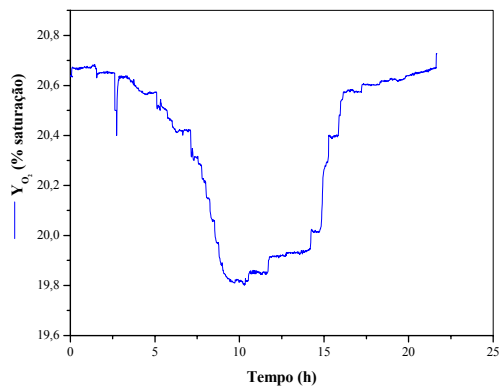
**Ensaio 11:** Perfil crescente de agitação com meio de produção padrão e pH inicial 9,0 partindo da linhagem tradicional de *B. megaterium*.



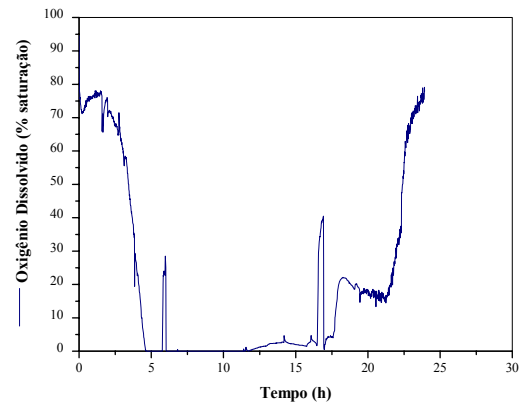
(A)



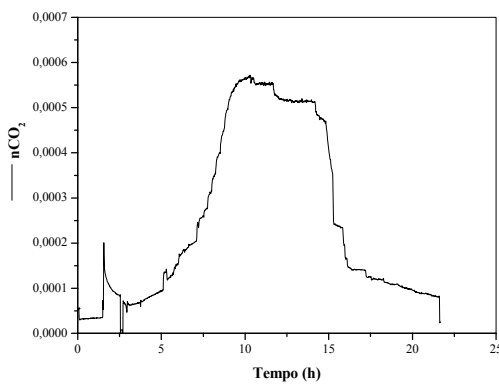
(B)



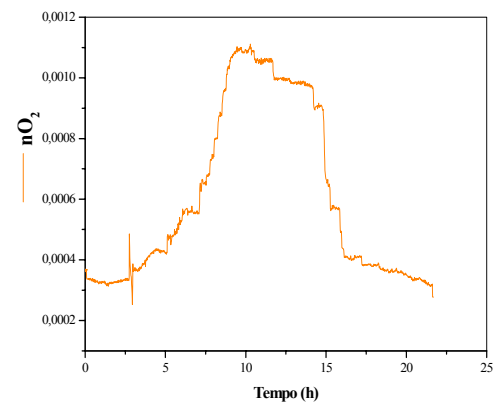
(C)



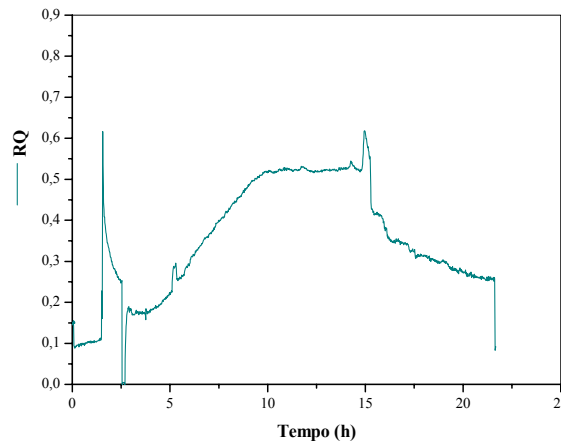
(D)



(E)



(F)



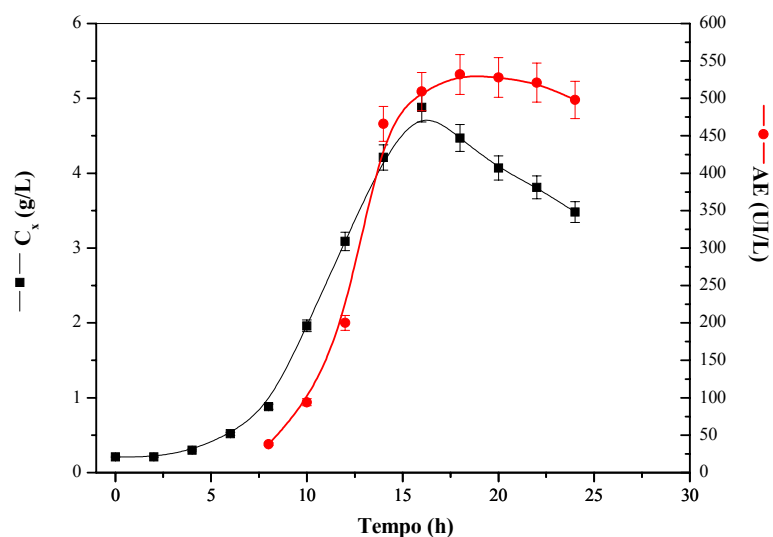
(G)

**Figura 5b.5:** Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados, Ensaio 11 – (A) Fração molar de  $\text{CO}_2$  –  $Y_{\text{CO}_2}$ , (B) velocidade de agitação, (C) fração molar de  $\text{O}_2$  –  $Y_{\text{O}_2}$ , (D) Concentração de oxigênio dissolvido, (E) velocidade de formação de  $\text{CO}_2$  –  $n_{\text{CO}_2}$ , (F) velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  –  $n_{\text{O}_2}$  e (G) coeficiente respiratório – RQ.

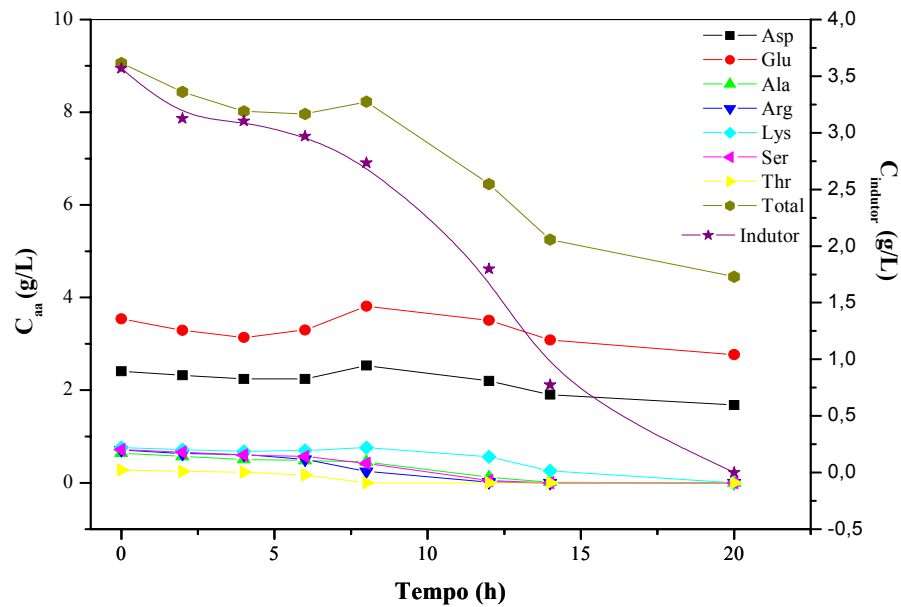
**Tabela 5b.5:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE), concentração de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e indutor fenilacetato de potássio ( $C_{\text{indutor}}$ ) ao longo do cultivo de *B. megaterium*

partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 11: Meio de cultivo padrão com perfil crescente de agitação e pH inicial 9,0.

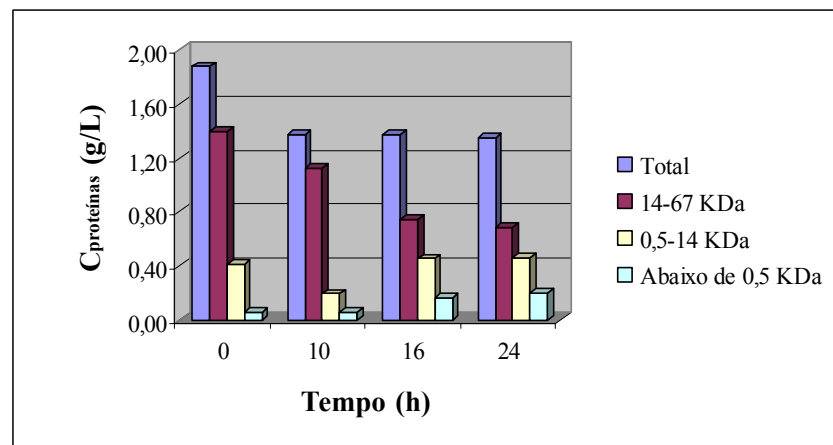
Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{aa}$ (g/L)	$C_{indutor}$ (g/L)
Inóculo	8,46	1,92	-	-	-
0	9,18	0,21	0	9,06	3,57
2	9,17	0,21	0	8,44	3,13
4	8,38	0,30	0	8,02	3,11
6	8,42	0,52	0	7,96	2,97
8	8,36	0,88	38	8,23	2,74
10	8,42	1,96	94	-	2,23
12	8,43	3,09	200	6,45	1,80
14	8,54	4,21	466	5,25	0,77
16	8,60	4,88	509	-	0,00
18	8,79	4,47	532	-	0,00
20	8,88	4,07	528	4,45	0,00
22	8,94	3,81	521	-	0,00
24	9,03	3,48	500	-	0,00
Padrão	8,72	3,67	603	3,72	0,00



**Figura 5b.6:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em biorreator utilizando meio padrão partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a -70°C, com perfil crescente de agitação e pH inicial 9,0 – Ensaio 11.

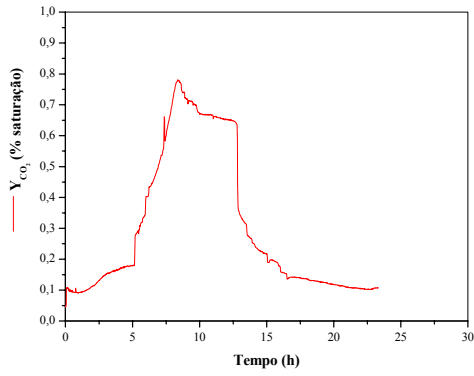


**Figura 5b.7:** Consumo de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) durante o cultivo de *B. megaterium* partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 11: Meio de cultivo padrão com perfil crescente de agitação e pH inicial 9,0

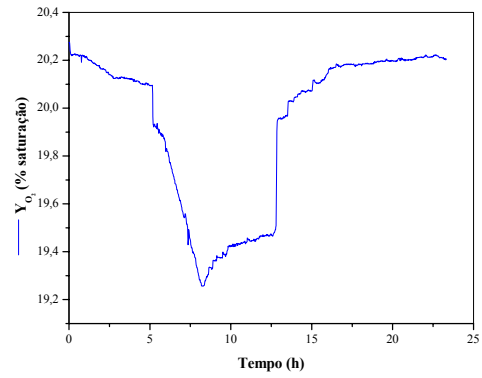


**Figura 5b.8:** Distribuição de massas moleculares de proteínas e oligopeptídeos obtidas no cultivo de *B. megaterium* partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 11: Meio de cultivo padrão com perfil crescente de agitação e pH inicial 9,0

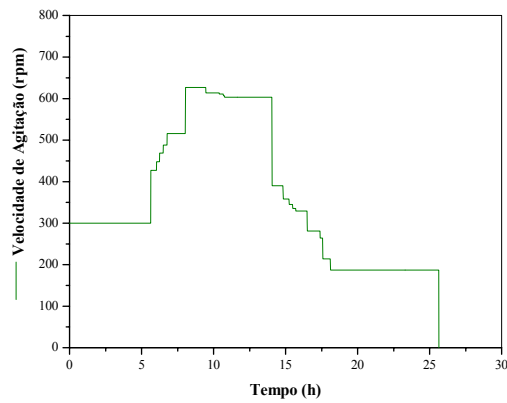
**Ensaio 13:** Perfil crescente de agitação com meio de produção padrão e pH inicial 8,0 partindo de **células vegetativas conservadas a -70°C** da linhagem tradicional de *B. megaterium*.



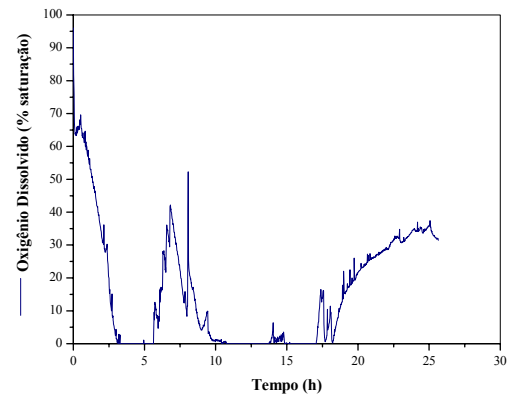
(A)



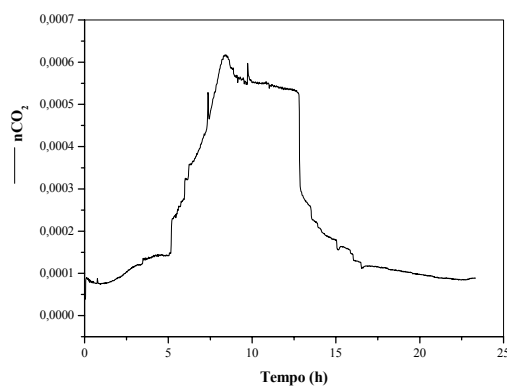
(B)



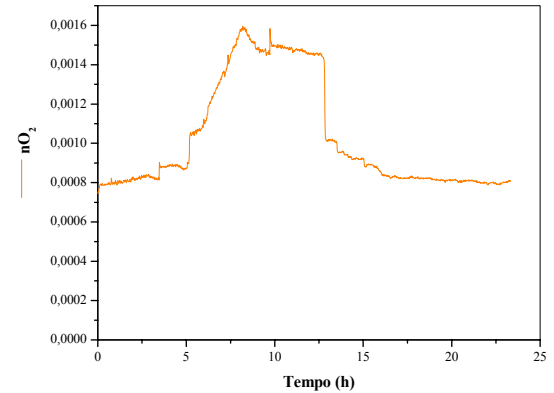
(C)



(D)

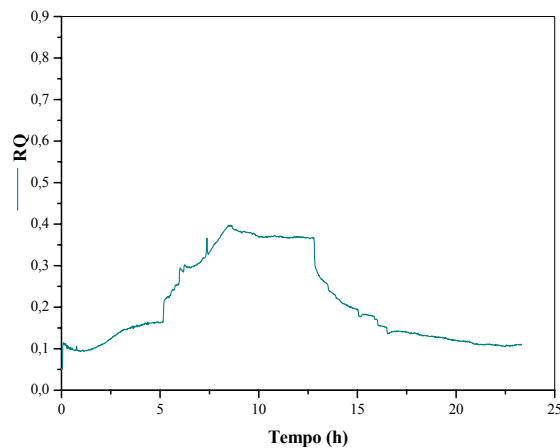


(E)



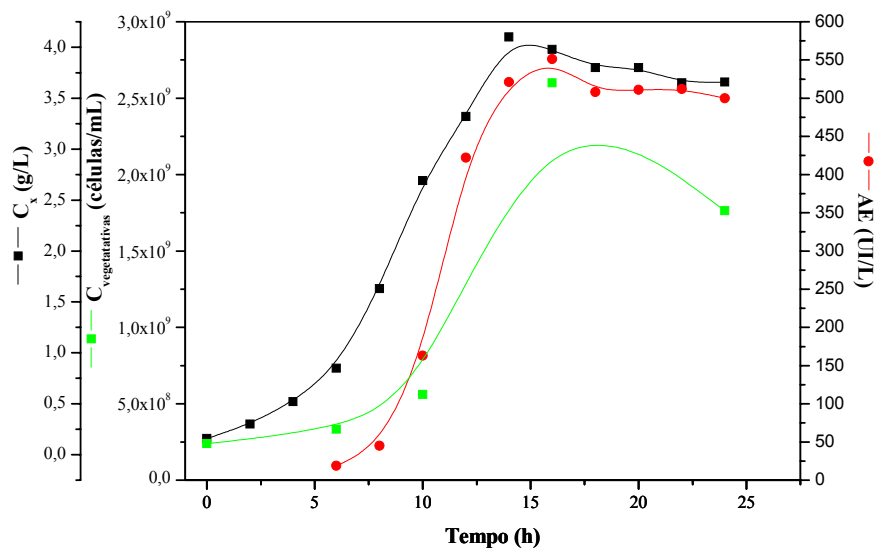
(F)





(G)

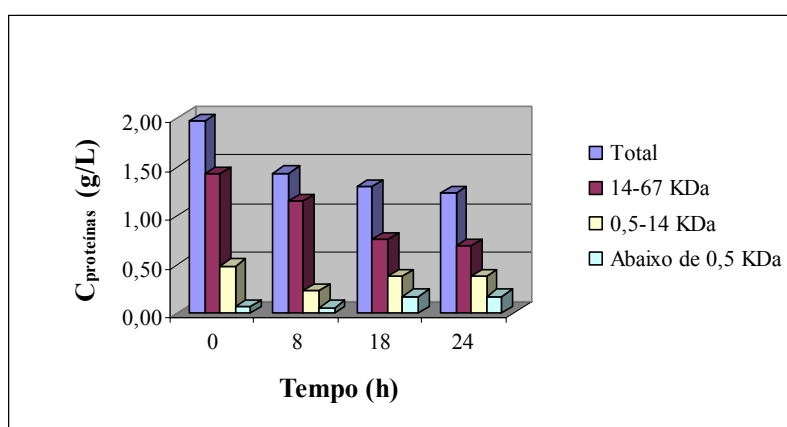
**Figura 5b.9:** Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de  $\text{CO}_2$  –  $Y_{\text{CO}_2}$ , (B) velocidade de agitação, (C) fração molar de  $\text{O}_2$  –  $Y_{\text{O}_2}$ , (D) Concentração de oxigênio dissolvido, (E) velocidade de formação de  $\text{CO}_2$  –  $n_{\text{CO}_2}$ , (F) velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  –  $n_{\text{O}_2}$  e (G) coeficiente respiratório – RQ – Ensaio 13.



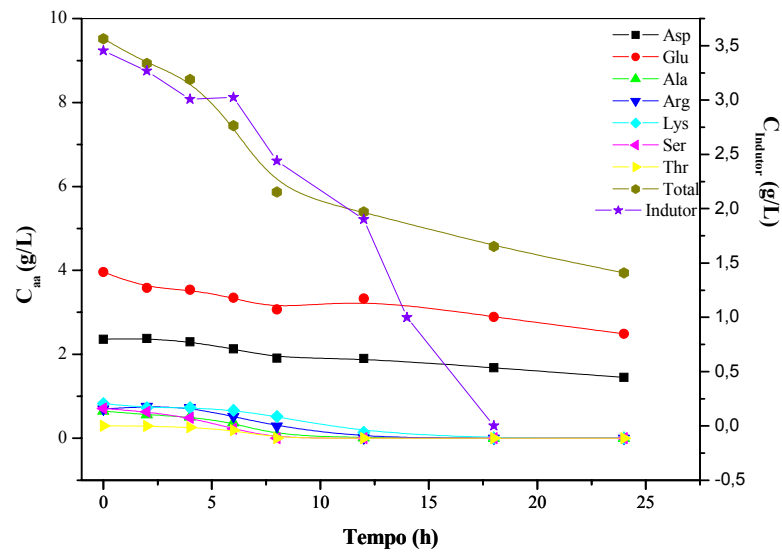
**Figura 5b.10:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em meio padrão (soro integral) partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a  $-70^\circ\text{C}$ , com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 – Ensaio 13.

**Tabela 5b.6:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (A.E), concentração de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e indutor fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) ao longo do cultivo, partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 13: Perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 em meio de cultivo padrão (soro integral)

Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{aa}$ (g/L)	$C_{indutor}$ (g/L)
Inóculo	8,40	1,32	-	-	-
0	7,55	0,16	0	9,52	3,45
2	7,78	0,30	0	8,93	3,27
4	7,88	0,52	0	8,55	3,01
6	8,05	0,85	19	7,45	3,03
8	8,31	1,63	45	5,87	2,44
10	8,33	2,69	163	-	1,90
12	8,42	3,32	422	5,39	0,99
14	8,54	4,10	521	-	0,00
16	8,71	3,98	551	-	0,00
18	8,86	3,80	508	4,57	0,00
20	8,89	3,80	511	-	0,00
22	8,95	3,65	512	-	0,00
24	8,98	3,66	500	3,94	0,00
Shaker 24 h	8,72	3,72	638	3,69	0,00

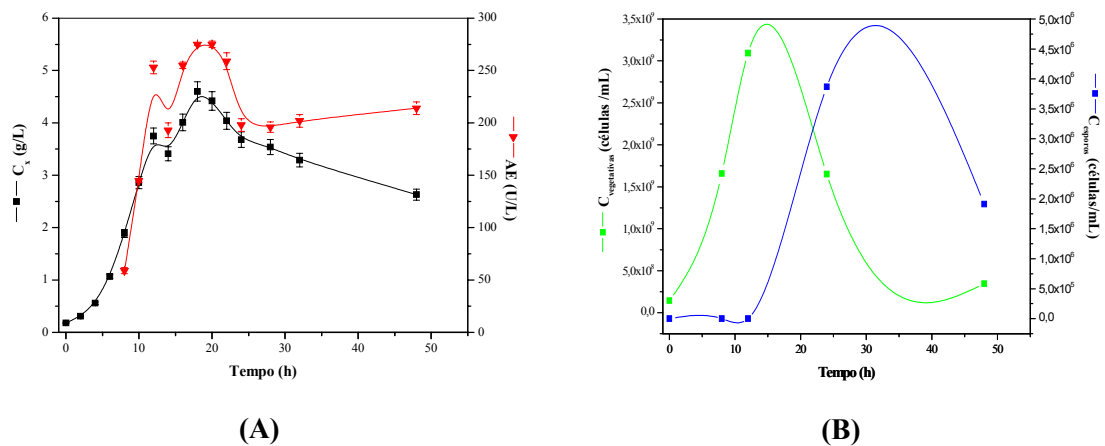


**Figura 5b.11:** Distribuição de massas moleculares obtidas no cultivo de *B. megaterium* partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 13: Meio de cultivo padrão (soro integral) com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0.



**Figura 5b.12:** Consumo de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) durante o cultivo de *B. megaterium* partindo de células vegetativas armazenadas em eppendorf – Ensaio 13: Meio de cultivo padrão (soro integral) com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0.

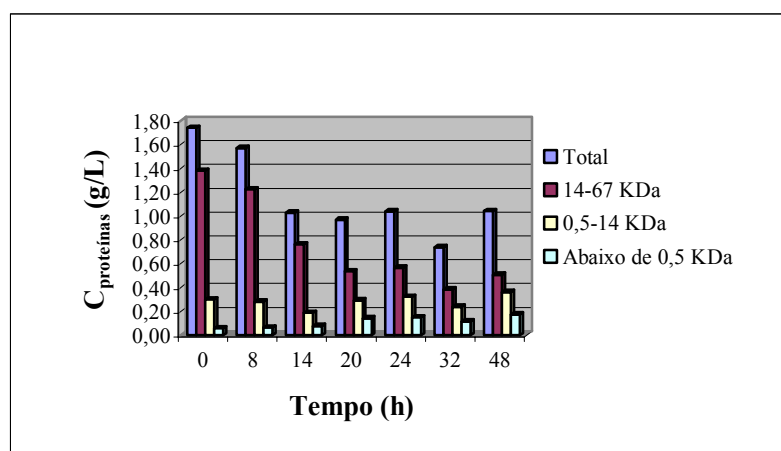
**Ensaio 14:** Batelada alimentada e perfil crescente de agitação com soro de queijo padrão e pH inicial 8,0 partindo de células vegetativas conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .



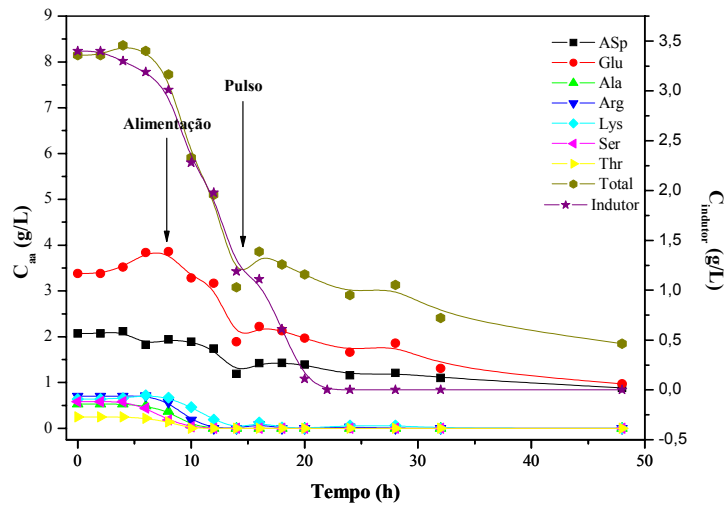
**Figura 5b.13:** (A) Valores de concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE) e (B) concentração de células vegetativas ( $C_{vegetativas}$ ) e esporos ( $C_{esporos}$ ) ao longo do cultivo em meio padrão partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a  $-70^{\circ}\text{C}$ , com perfil crescente de agitação e suplementação após 8 horas de cultivo com meio padrão a 180 mL/h – Ensaio 14.

**Tabela 5b.7:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE), concentração de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e indutor fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) ao longo do cultivo, partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 14: Perfil crescente de agitação e suplementação do meio após 8 horas de cultivo com meio padrão a 180 mL/h.

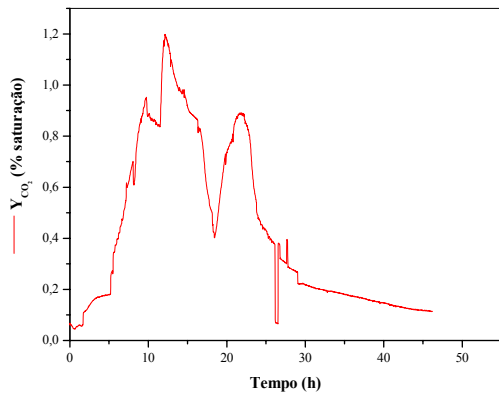
Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{aa}$ (g/L)	$C_{indutor}$ (g/L)
Inóculo	8,30	1,67	-	-	-
0	7,68	0,18	0	8,15	3,40
2	7,79	0,31	0	8,36	3,30
4	7,98	0,56	0	8,24	3,19
6	8,15	1,07	0	7,73	3,01
8	8,35	1,89	59	5,91	2,28
10	8,24	2,86	145	5,10	1,98
12	8,43	3,75	253	3,08	1,19
14	8,39	3,41	193	3,86	1,11
16	8,50	4,01	255	3,58	0,61
18	8,60	4,60	275	3,36	0,11
22	8,60	4,04	259	2,91	0,00
24	8,57	3,68	198	3,13	0,00
28	8,95	3,54	196	2,41	0,00
32	9,03	3,29	202	1,85	0,00
48	9,26	2,63	214	1,60	0,00
Shaker 24 h	8,64	3,71	518	3,54	0,00



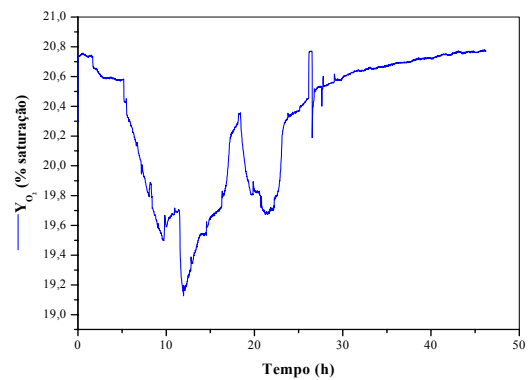
**Figura 5b.14:** Distribuição de massas moleculares obtidas no cultivo de *B. megaterium* partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 14: Meio de cultivo padrão (soro integral) com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0.



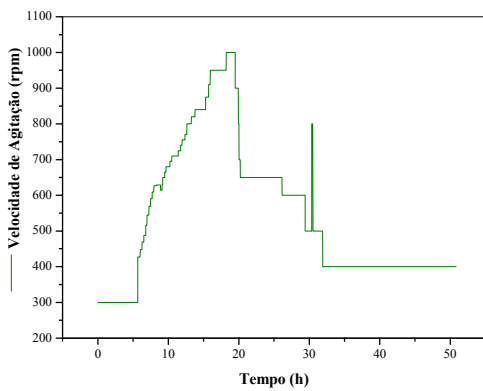
**Figura 5b.15:** Consumo de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{AFA}$ ) durante o cultivo de *B. megaterium* partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 14: Meio de cultivo padrão( soro integral) com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0



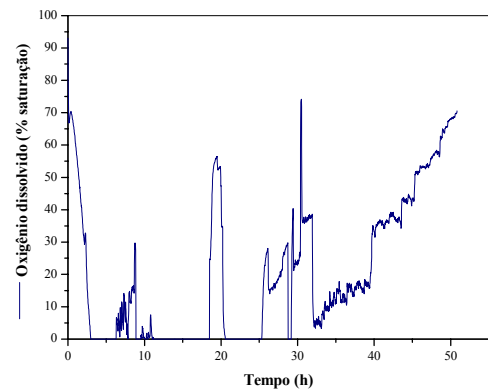
(A)



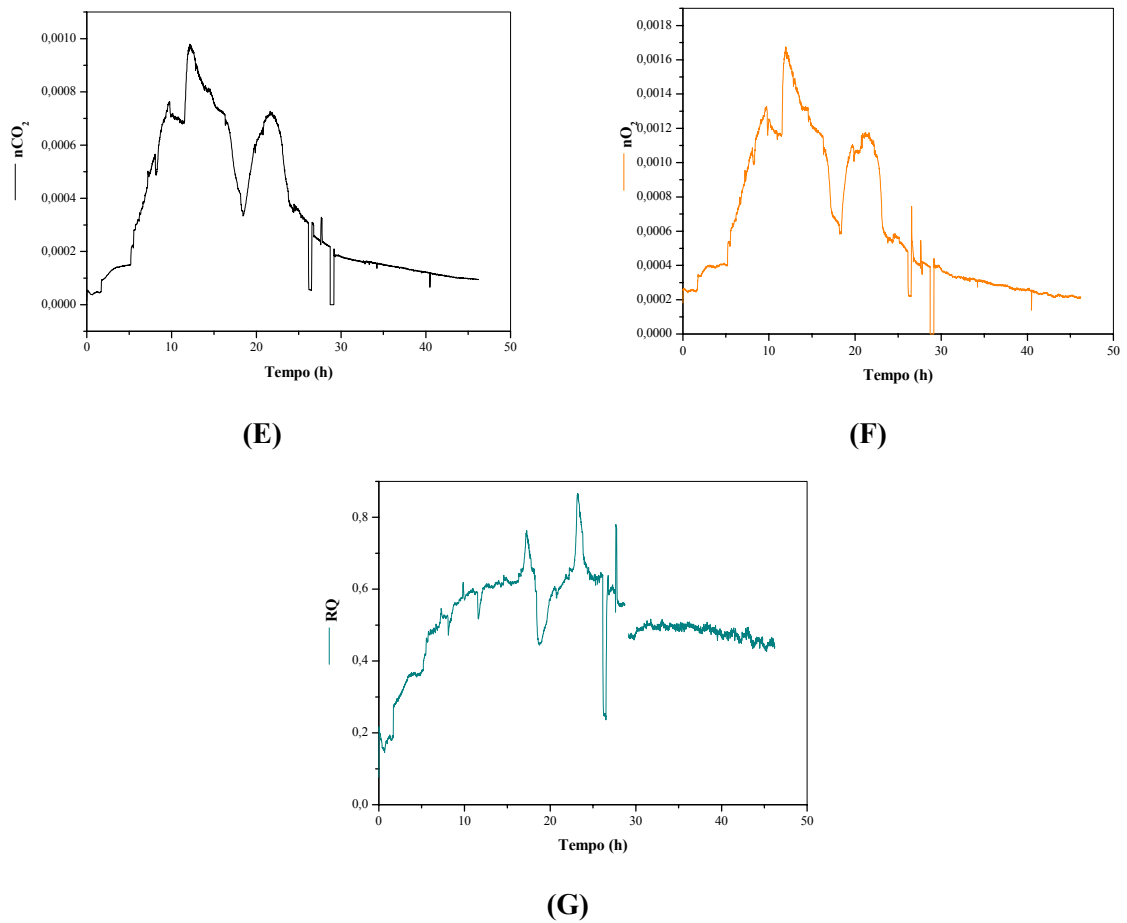
(B)



(C)



(D)

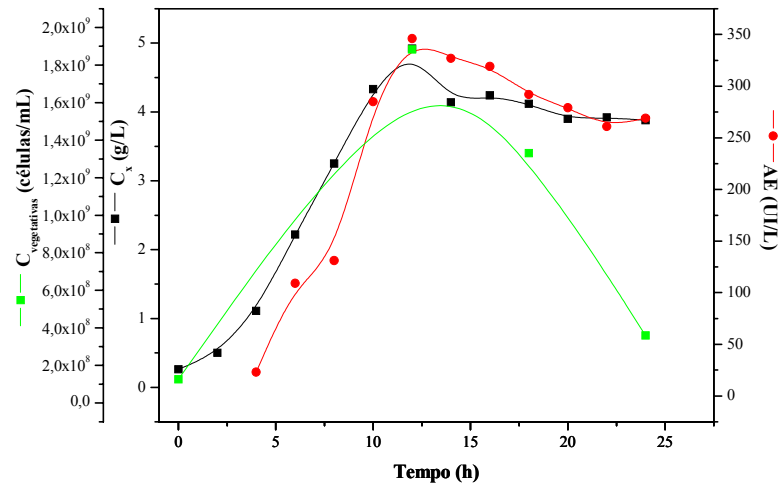


**Figura 5b.16:** Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de  $\text{CO}_2$  –  $Y_{\text{CO}_2}$ , (B) velocidade de agitação, (C) fração molar de  $\text{O}_2$  –  $Y_{\text{O}_2}$ , (D) Concentração de oxigênio dissolvido, (E) velocidade de formação de  $\text{CO}_2$  –  $n_{\text{CO}_2}$ , (F) velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  –  $n_{\text{O}_2}$  e (G) coeficiente respiratório – RQ – Ensaio 14.

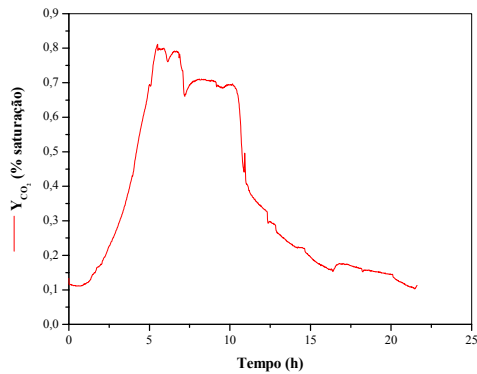
**Ensaio 15:** Limitação na concentração de oxigênio dissolvido de 20% para 5% da saturação após 8 horas de cultivo com meio padrão e pH inicial 8,0 partindo de células vegetativas conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Tabela 5b.8:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (A.E), concentração de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) ao longo do cultivo padrão partindo de células vegetativas armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  – Ensaio 15: limitação na concentração de oxigênio dissolvido de 20% para 5% da saturação após 8 horas de cultivo e pH inicial 8,0.

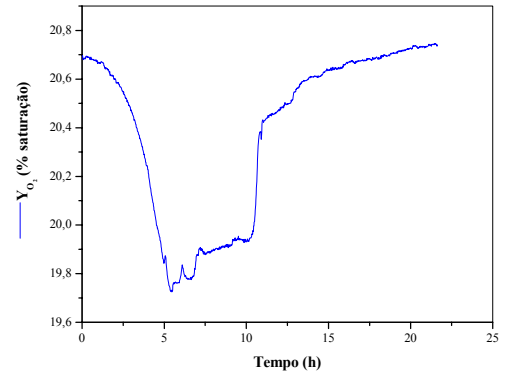
Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{aa}$ (g/L)	$C_{AFA}$ (g/L)
Inóculo	8,26	2,10	-	-	-
0	7,61	0,26	0	9,26	3,29
2	7,76	0,5	0	9,09	3,13
4	8,16	1,11	23	8,23	2,88
6	8,30	2,22	109	5,92	2,31
8	8,40	3,25	131	5,22	1,79
10	8,52	4,33	285	-	0,68
12	8,71	4,92	346	3,83	0,00
14	8,83	4,14	327	3,26	0,00
16	8,89	4,24	319	3,20	0,00
18	8,92	4,12	292	3,36	0,00
20	8,97	3,90	279	3,08	0,00
22	9,04	3,92	261	-	0,00
24	9,06	3,88	269	-	0,00
Shaker 24 h	8,43	4,09	461	3,12	0,00



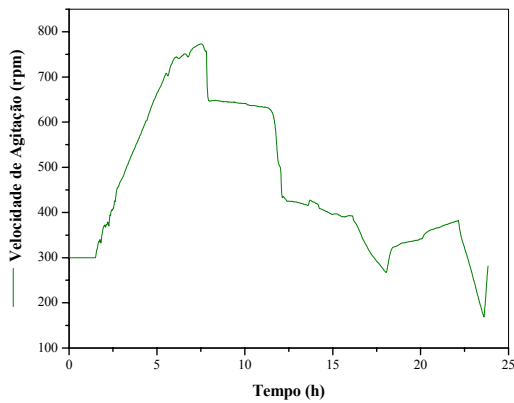
**Figura 5b.17:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em meio padrão partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a  $-70^{\circ}\text{C}$ , com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 – Ensaio 15.



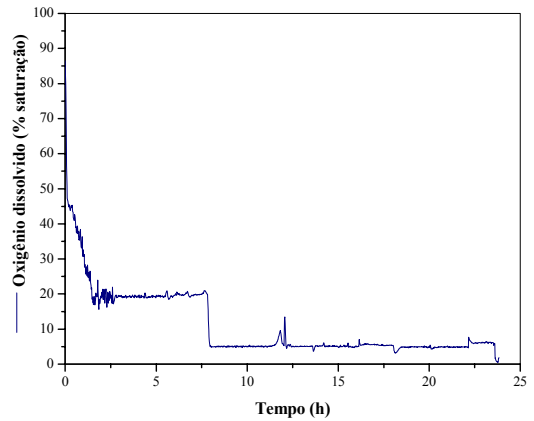
(A)



(B)

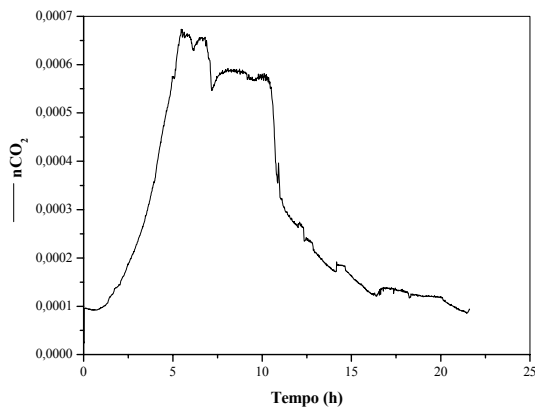


(C)

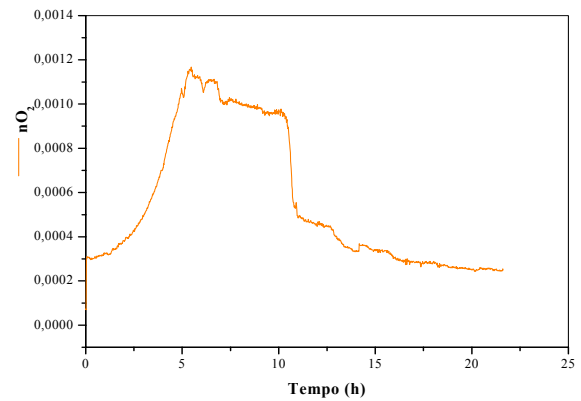


(D)

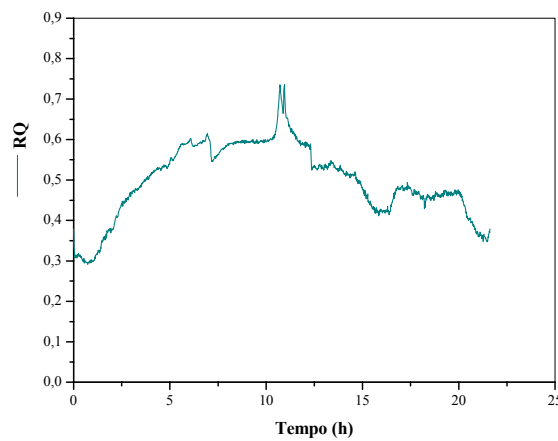




(E)

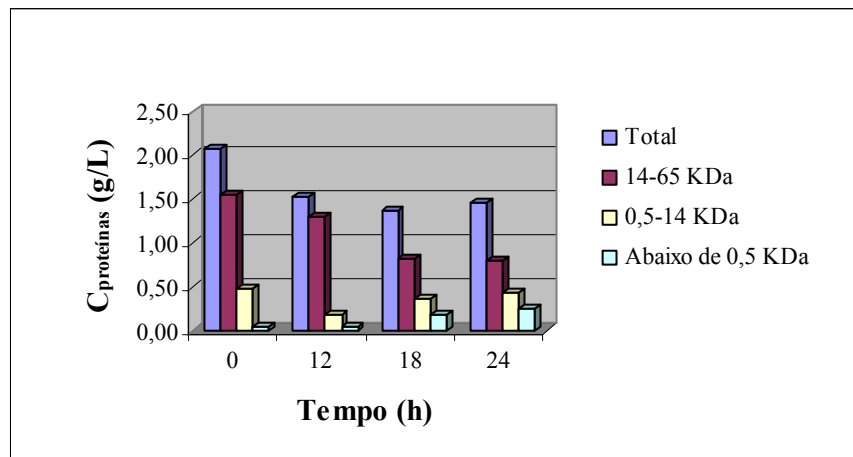


(F)

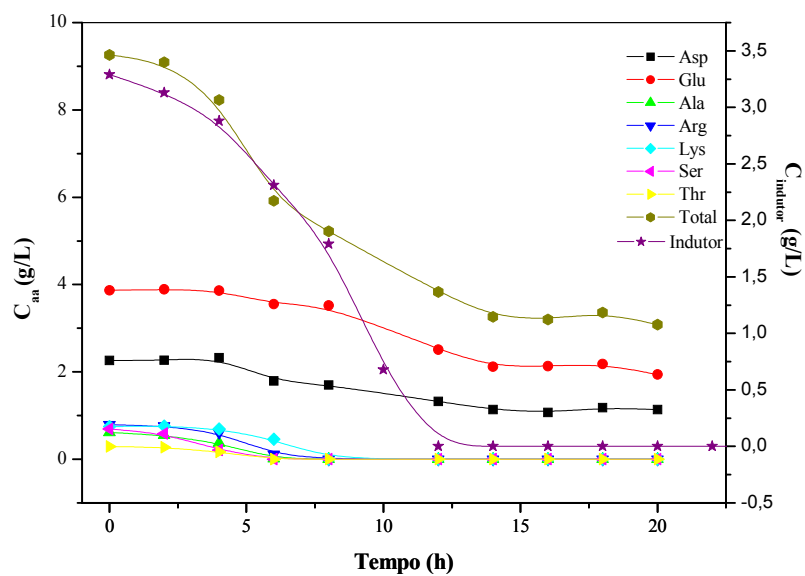


(G)

**Figura 5b.18:** Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de  $\text{CO}_2$  –  $Y_{\text{CO}_2}$ , (B) velocidade de agitação, (C) fração molar de  $\text{O}_2$  –  $Y_{\text{O}_2}$ , (D) Concentração de oxigênio dissolvido, (E) velocidade de formação de  $\text{CO}_2$  –  $n_{\text{CO}_2}$ , (F) velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  –  $n_{\text{O}_2}$  e (G) coeficiente respiratório – RQ – Ensaio 15.

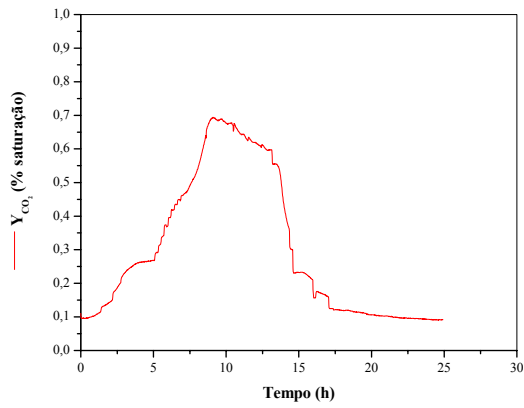


**Figura 5b.19:** Distribuição de massas moleculares obtidas no cultivo de *Bacillus megaterium* partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 15: Meio de cultivo padrão com limitação na concentração de oxigênio dissolvido de 20 para 5% da saturação.

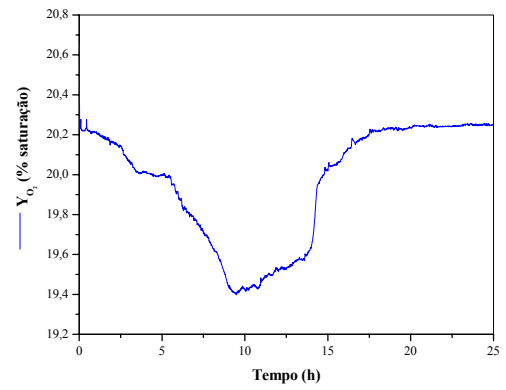


**Figura 5b.20:** Consumo de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e indutor fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) durante o cultivo de *B. megaterium* partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 15: Meio de cultivo padrão com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0.

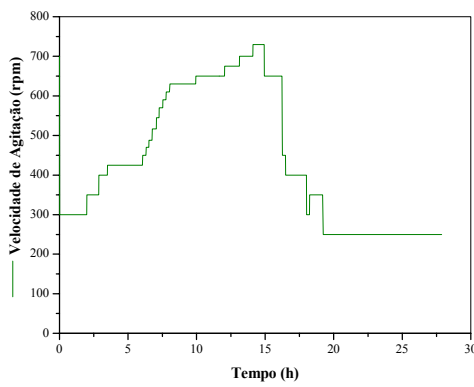
**Ensaio 15:** Perfil crescente de agitação com soro de queijo hidrolisado e pH inicial 8,0 partindo de células vegetativas da linhagem tradicional de *B. megaterium*.



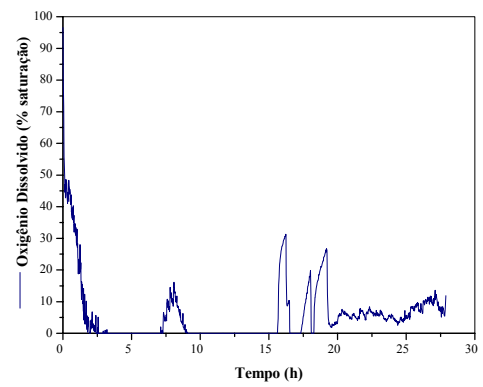
(A)



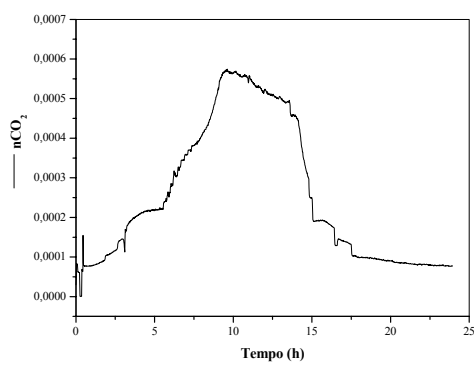
(B)



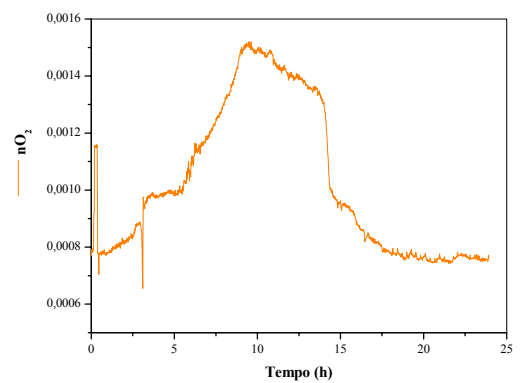
(C)



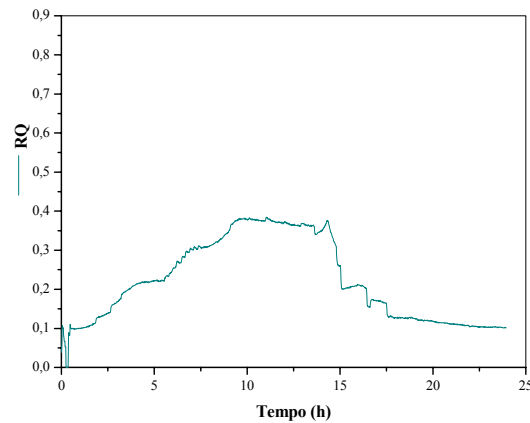
(D)



(E)

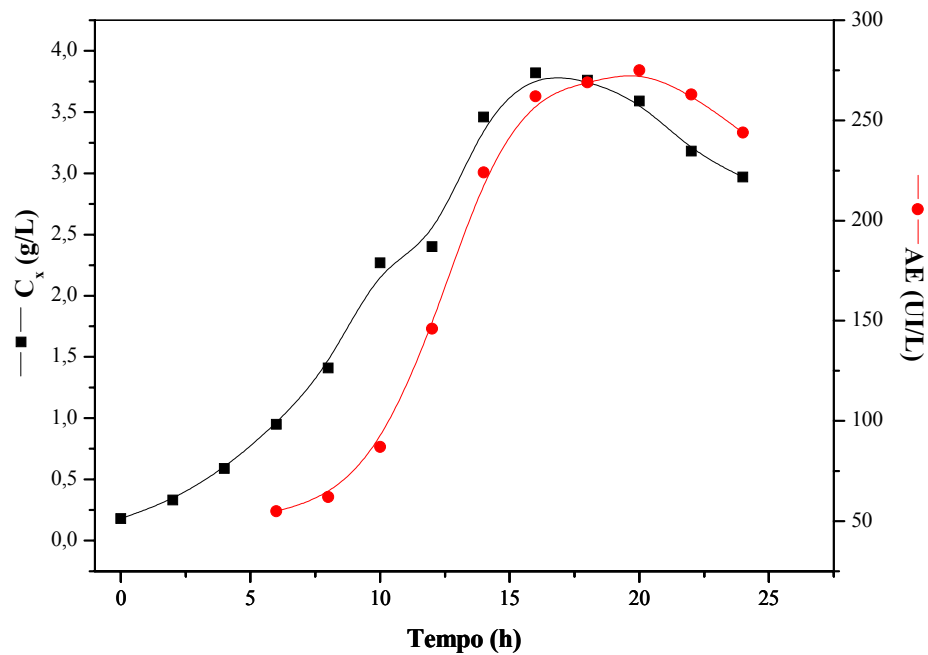


(F)



(G)

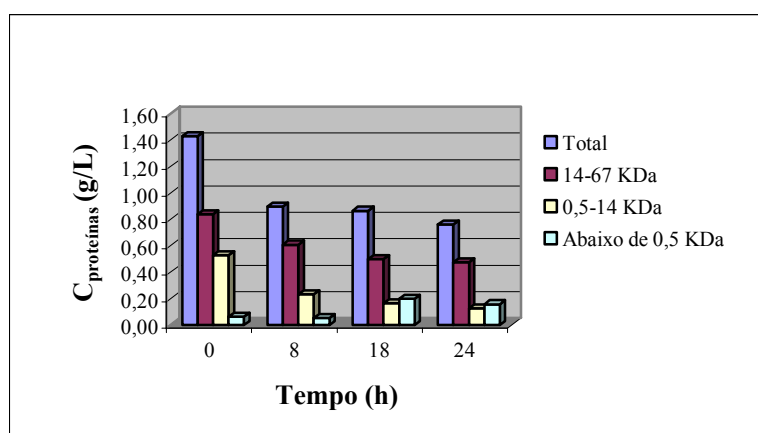
**Figura 5b.21:** Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de  $\text{CO}_2$  –  $Y_{\text{CO}_2}$ , (B) velocidade de agitação, (C) fração molar de  $\text{O}_2$  –  $Y_{\text{O}_2}$ , (D) Concentração de oxigênio dissolvido, (E) velocidade de formação de  $\text{CO}_2$  –  $n_{\text{CO}_2}$ , (F) velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  –  $n_{\text{O}_2}$  e (G) coeficiente respiratório – RQ.



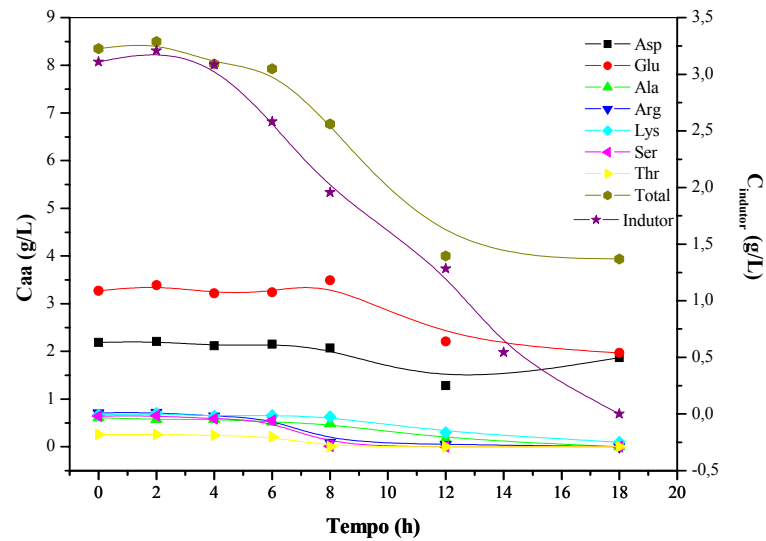
**Figura 5b.22:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em biorreator com soro de queijo hidrolisado partindo de células vegetativas conservadas a  $-70^\circ\text{C}$ , com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 – Ensaio 15.

**Tabela 5b.9:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE), concentrações de aminoácidos totais e indutor fenilacetato de potássio ao longo do cultivo partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 15: Perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 em meio de cultivo contendo soro de queijo hidrolisado

Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{aa}$ (g/L)	$C_{AFA}$ (g/L)
Inóculo	8,41	2,18	-	-	-
0	7,91	0,18	0	8,35	3,11
2	7,98	0,33	0	8,5	3,21
4	8,10	0,59	0	8,03	3,08
6	8,27	0,95	55	7,93	2,58
8	8,42	1,41	62	6,77	1,96
10	8,42	2,27	87	-	-
12	8,53	2,40	146	4,00	1,28
14	8,62	3,46	224	-	0,55
16	8,88	3,82	262	-	0,00
18	8,97	3,76	269	3,94	0,00
20	8,99	3,59	275	-	0,00
22	9,07	3,18	263	-	0,00
24	9,11	2,97	244	3,94	0,00
Shaker 24 h - Padrão	8,78	4,06	619	3,56	0,00
Shaker 24 h - Hidrolisado	8,75	4,11	660	3,64	0,00

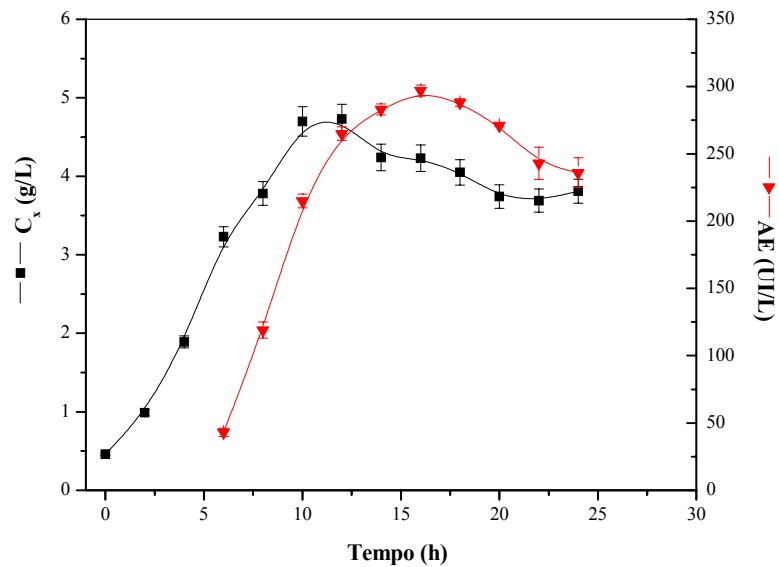


**Figura 5b.23:** Distribuição de massas moleculares obtidas no cultivo de *B. megaterium* partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 15: Soro de queijo hidrolisado com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0.



**Figura 5b.24:** Consumo de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e indutor fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) durante o cultivo de *B. megaterium* partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 15: Soro de queijo hidrolisado com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0.

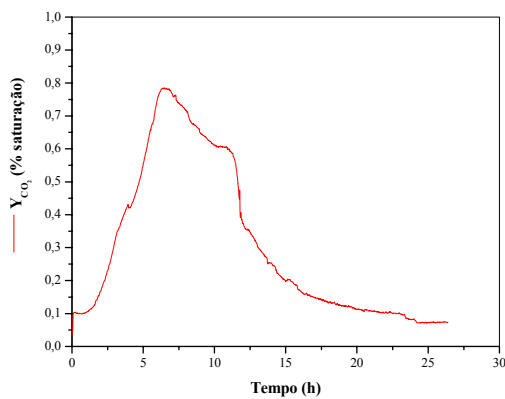
**Ensaio 16:** Manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação durante todo cultivo com soro de queijo hidrolisado e pH inicial 8,0 partindo de células vegetativas conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .



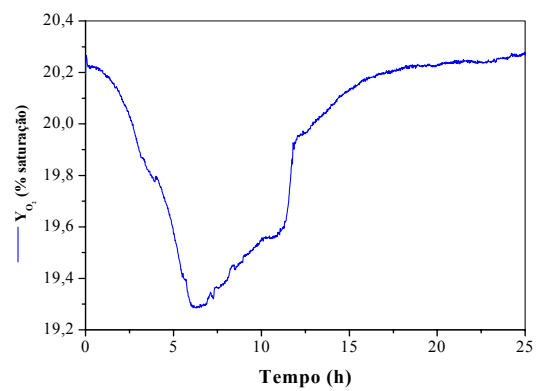
**Figura 5b.25:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em biorreator utilizando soro hidrolisado partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a  $-70^{\circ}\text{C}$ , com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 – Ensaio 16.

**Tabela 5b.10:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo com soro de queijo hidrolisado partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 16: controle da concentração de oxigênio dissolvido em 10% da saturação durante todo e pH inicial 8,0.

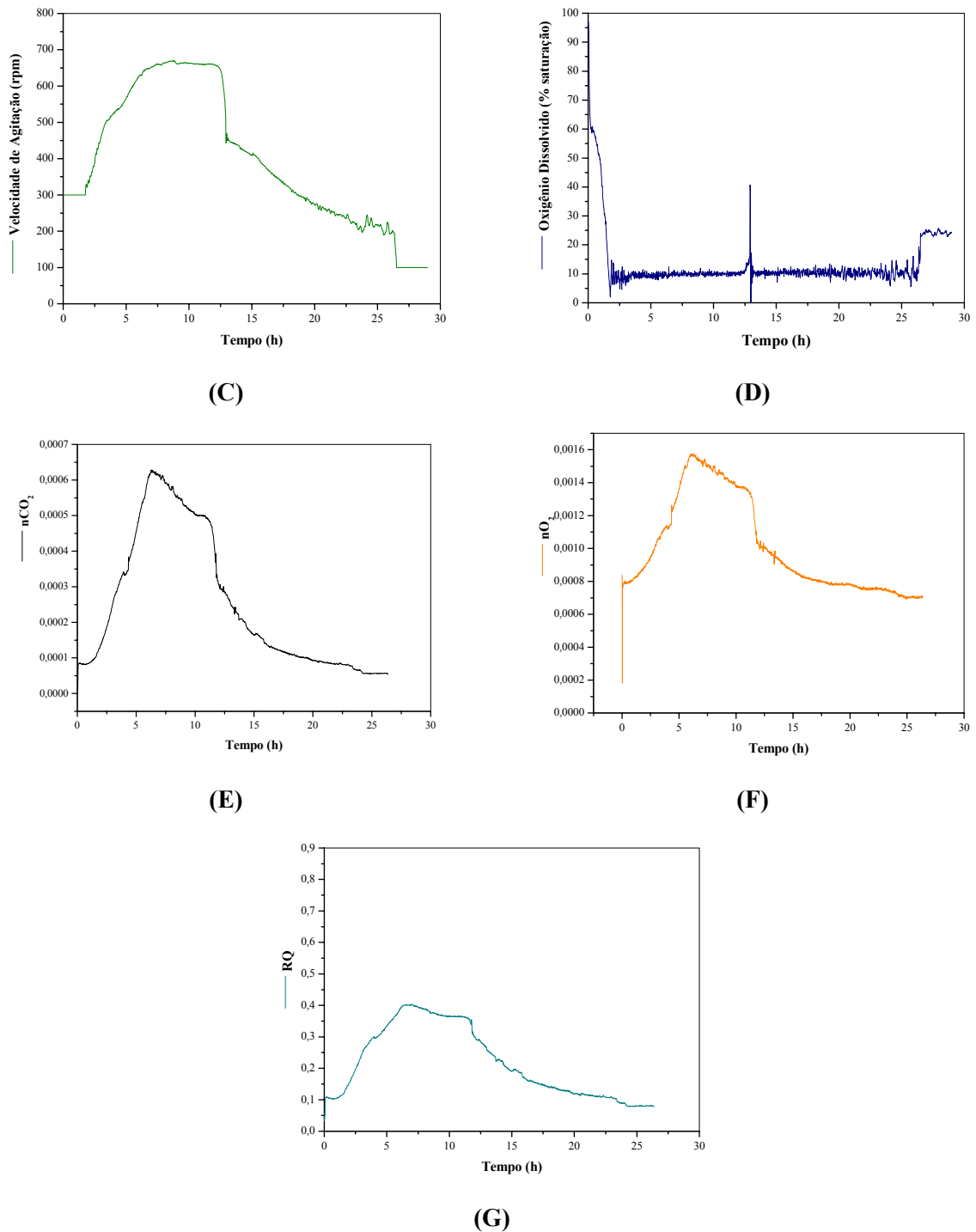
Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)
Inóculo	8,17	2,10	-
0	7,67	0,20	0
2	7,77	0,46	0
4	8,15	0,99	0
6	8,23	1,89	43
8	8,37	3,23	119
10	8,52	3,78	215
12	8,61	4,70	265
14	8,84	4,73	283
16	8,89	4,24	297
18	8,97	4,23	288
20	9,04	4,05	271
22	9,05	3,74	243
24	9,07	3,69	236
Shaker – 24 h - padrão	8,67	3,81	661
Shaker – 24 h - hidrolisado	8,69	4,00	606



(A)



(B)



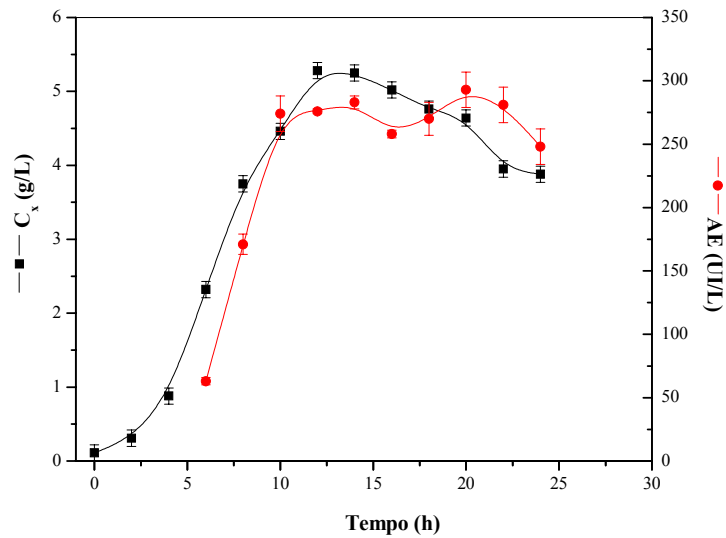
**Figura 5b.26:** Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de  $\text{CO}_2$  –  $Y_{\text{CO}_2}$ , (B) velocidade de agitação, (C) fração molar de  $\text{O}_2$  –  $Y_{\text{O}_2}$ , (D) Concentração de oxigênio dissolvido, (E) velocidade de formação de  $\text{CO}_2$  –  $n_{\text{CO}_2}$ , (F) velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  –  $n_{\text{O}_2}$  e (G) coeficiente respiratório – RQ – Ensaio 16.



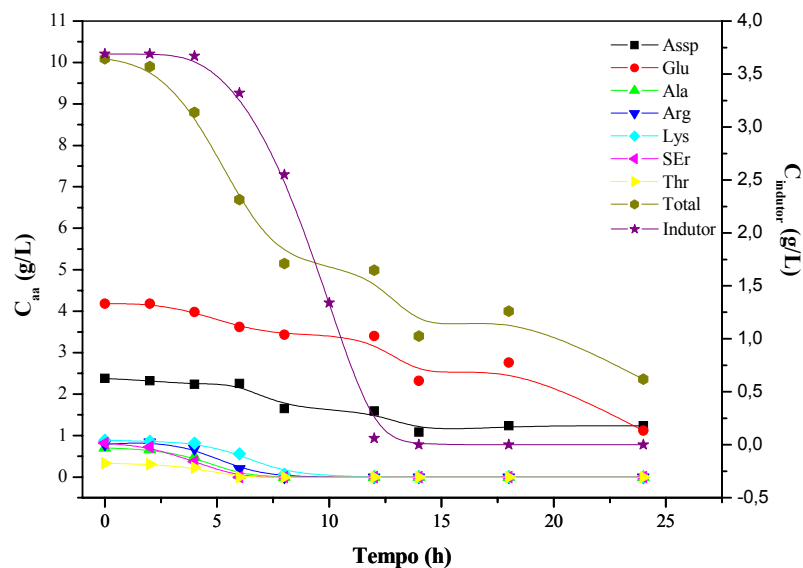
**Ensaio 17:** Manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação durante todo cultivo com soro de queijo hidrolisado e pH inicial 8,0 partindo de células vegetativas conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Tabela 5b.11:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (AE), concentração de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) ao longo do cultivo com soro de queijo hidrolisado partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 17: Controle da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação e pH inicial 8,0.

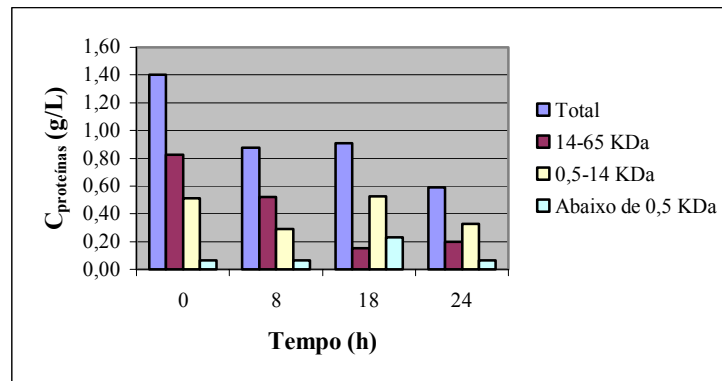
Tempo (h)	pH	$C_x$ (g/L)	AE (UI/L)	$C_{aa}$ (g/L)	$C_{indutor}$ (g/L)
Inóculo	8,32	1,84	-	-	-
0	7,74	0,11	0	10,09	3,69
2	7,84	0,31	0	9,90	3,69
4	7,89	0,88	0	8,8	3,67
6	8,02	2,32	63	6,69	3,32
8	8,13	3,75	171	5,15	2,55
10	8,27	4,46	274	-	1,34
12	8,34	5,28	276	4,99	0,06
14	8,53	5,25	283	3,4	0,00
16	8,58	5,02	258	-	0,00
18	8,63	4,76	270	4,00	0,00
20	8,68	4,64	293	-	0,00
22	8,66	3,95	281	-	0,00
24	8,75	3,88	248	2,36	0,00
Shaker 24 h - padrão	8,25	3,59	665	3,12	0,00
Shaker 24 h - hidrolisado	8,22	3,46	669	3,38	0,00



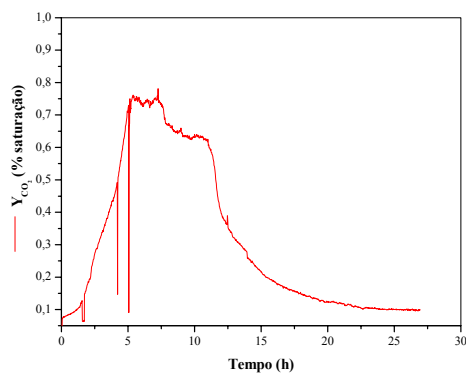
**Figura 5b.27:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em biorreator utilizando meio padrão partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a  $-70^\circ\text{C}$ , com perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 – Ensaio 17.



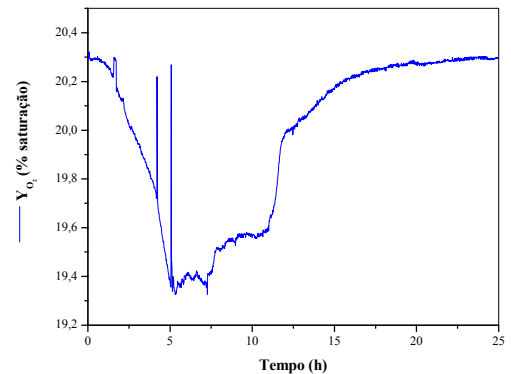
**Figura 5b.28:** Consumo de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{indutor}$ ) durante o cultivo de *B. megaterium* partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 17: Soro de queijo hidrolisado e manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação em todo cultivo e pH inicial 8,0



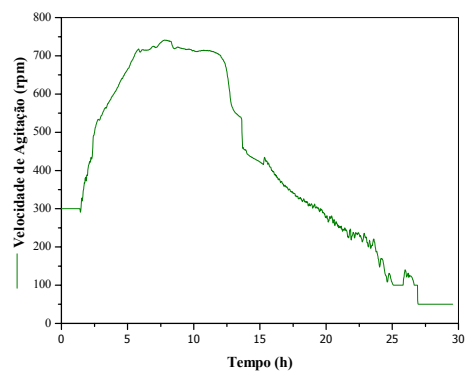
**Figura 5b.29:** Distribuição de massas moleculares obtidas no cultivo de *B. megaterium* partindo de células vegetativas armazenados em eppendorf – Ensaio 17: Meio de cultivo comm soro de queijo hidrolisado e manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação em todo cultivo e pH inicial 8,0.



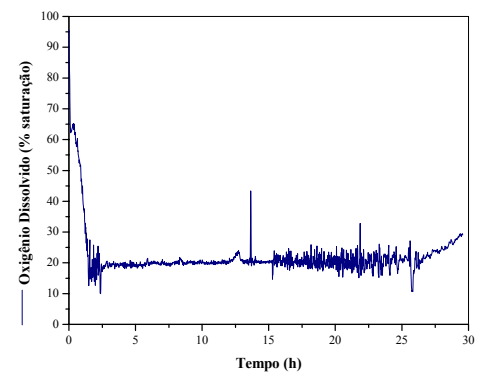
(A)



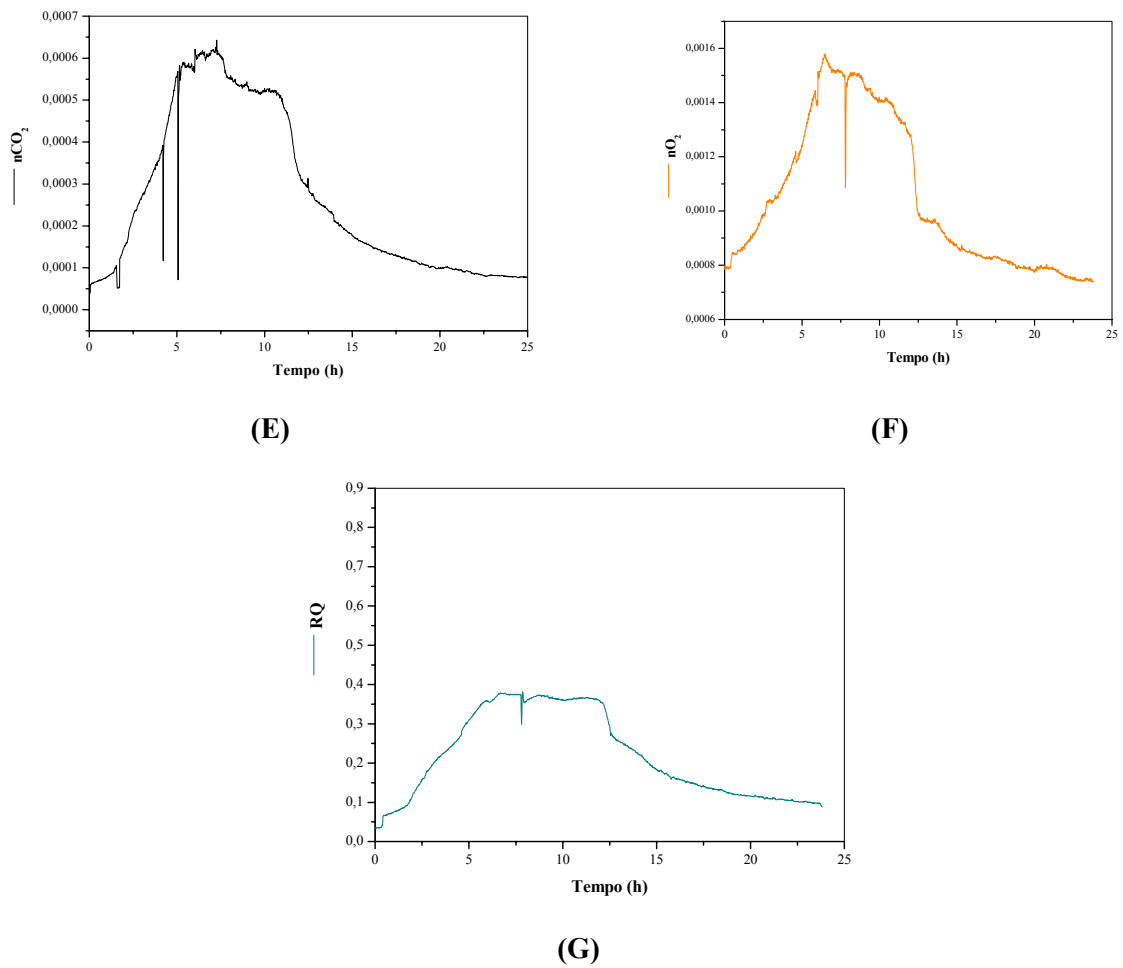
(B)



(C)



(D)

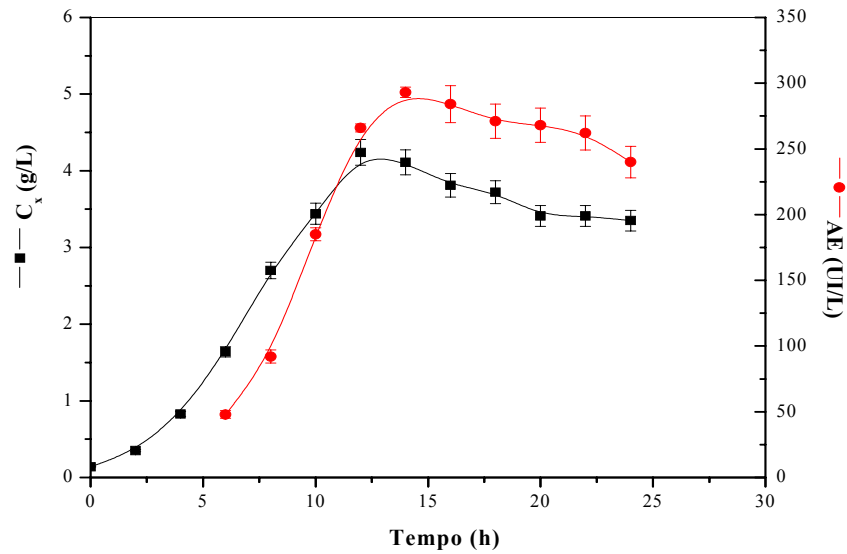


**Figura 5b.30:** Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de  $\text{CO}_2$  –  $Y_{\text{CO}_2}$ , (B) velocidade de agitação, (C) fração molar de  $\text{O}_2$  –  $Y_{\text{O}_2}$ , (D) Concentração de oxigênio dissolvido, (E) velocidade de formação de  $\text{CO}_2$  –  $n_{\text{CO}_2}$ , (F) velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  –  $n_{\text{O}_2}$  e (G) coeficiente respiratório – RQ – Ensaio 17.

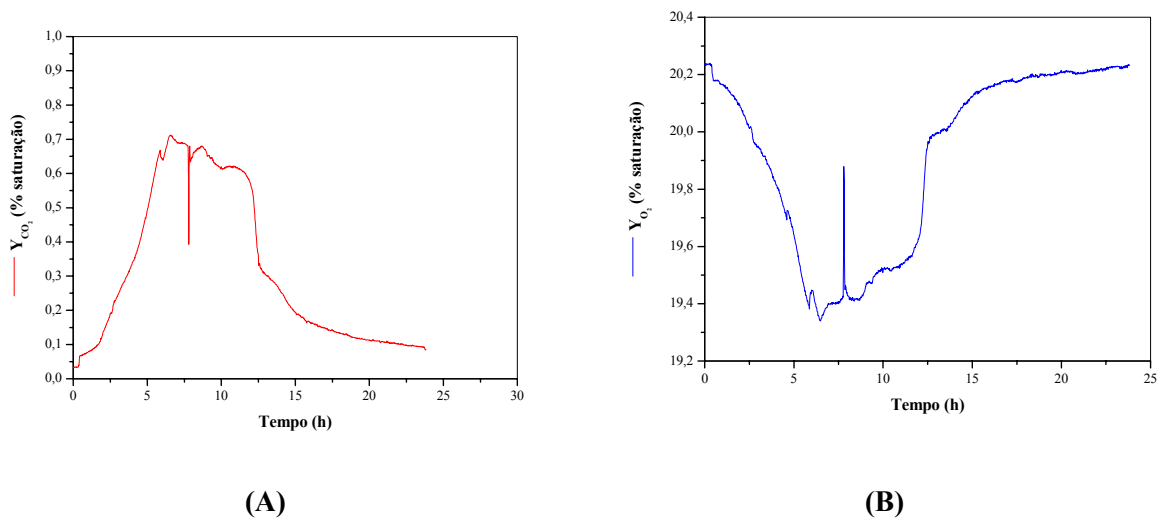
**Ensaio 18:** Limitação na concentração de oxigênio dissolvido de 20% para 5% da saturação após 8 horas de cultivo com soro de queijo hidrolisado e pH inicial 8,0 partindo de células vegetativas conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

**Tabela 5b.12:** Valores de pH, concentração celular ( $C_x$ ), atividade enzimática (A.E), concentração de aminoácidos ( $C_{aa}$ ) e fenilacetato de potássio ( $C_{AFA}$ ) ao longo do cultivo com soro hidrolisado partindo de células vegetativas armazenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  – Ensaio 18: limitação na concentração de oxigênio dissolvido de 20% para 5% após 8 horas de cultivo e pH inicial 8,0.

<b>Tempo (h)</b>	<b>pH</b>	<b><math>C_x</math> (g/L)</b>	<b>AE (UI/L)</b>
Inóculo	8,28	1,38	0
0	7,96	0,14	0
2	7,98	0,35	0
4	8,02	0,83	0
6	8,28	1,64	48
8	8,38	2,70	92
10	8,74	3,44	185
12	8,84	4,24	266
14	8,95	4,11	293
16	8,98	3,81	284
18	9,03	3,72	271
20	9,09	3,41	268
22	9,12	3,41	262
24	9,15	3,35	240
Shaker 24 h - padrão	8,70	3,95	612
Shaker 24 h - hidrolisado	8,77	3,86	581

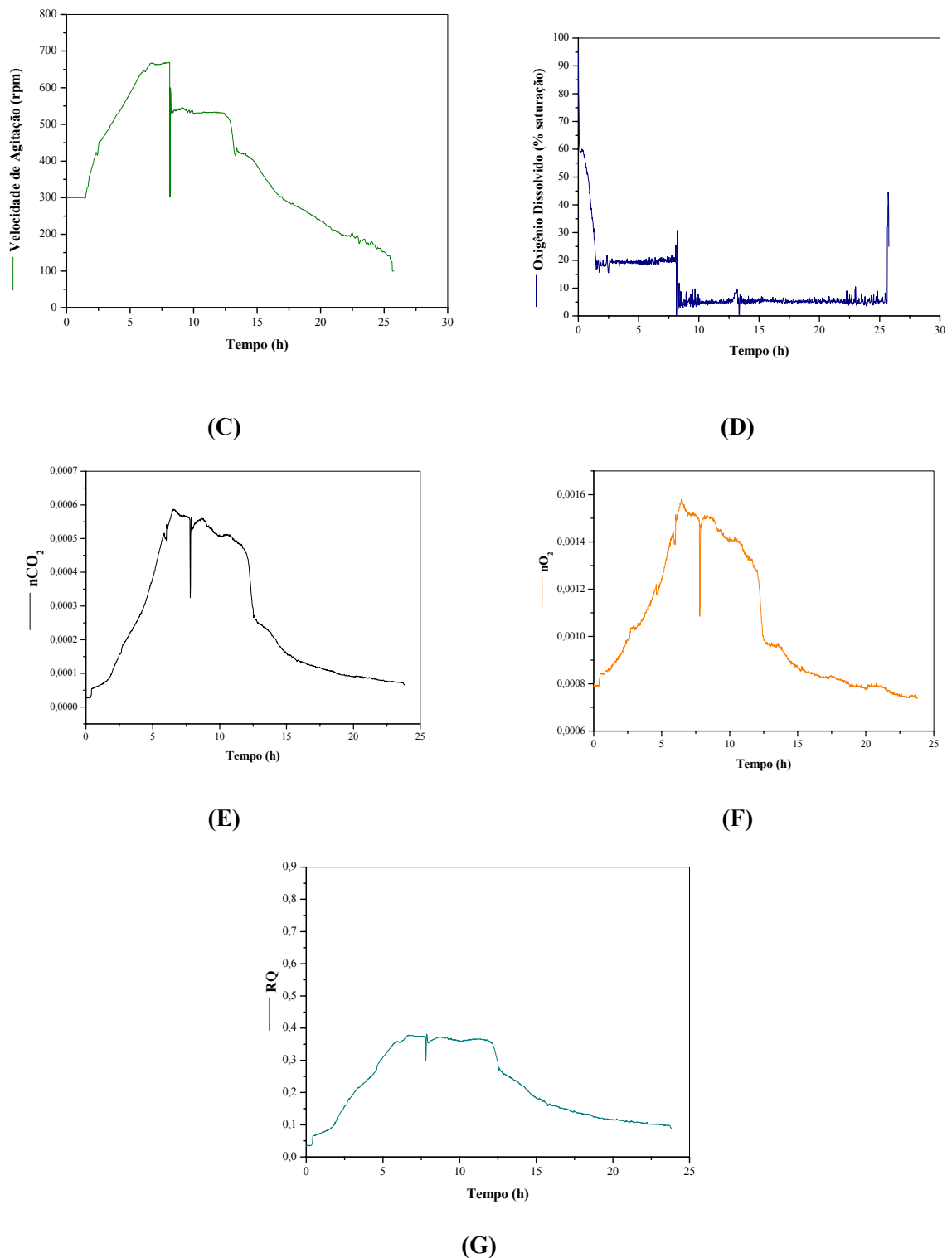


**Figura 5b.31:** Valores de concentração celular ( $C_x$ ) e atividade enzimática (AE) ao longo do cultivo em biorreator utilizando soro de queijo hidrolisado partindo de células vegetativas conservadas em glicerol 8% v/v a  $-70^{\circ}\text{C}$ , com limitação da concentração de oxigênio dissolvido de 20 para 5% da saturação após 8 horas de cultivo e pH inicial 8,0 – Ensaio 18.



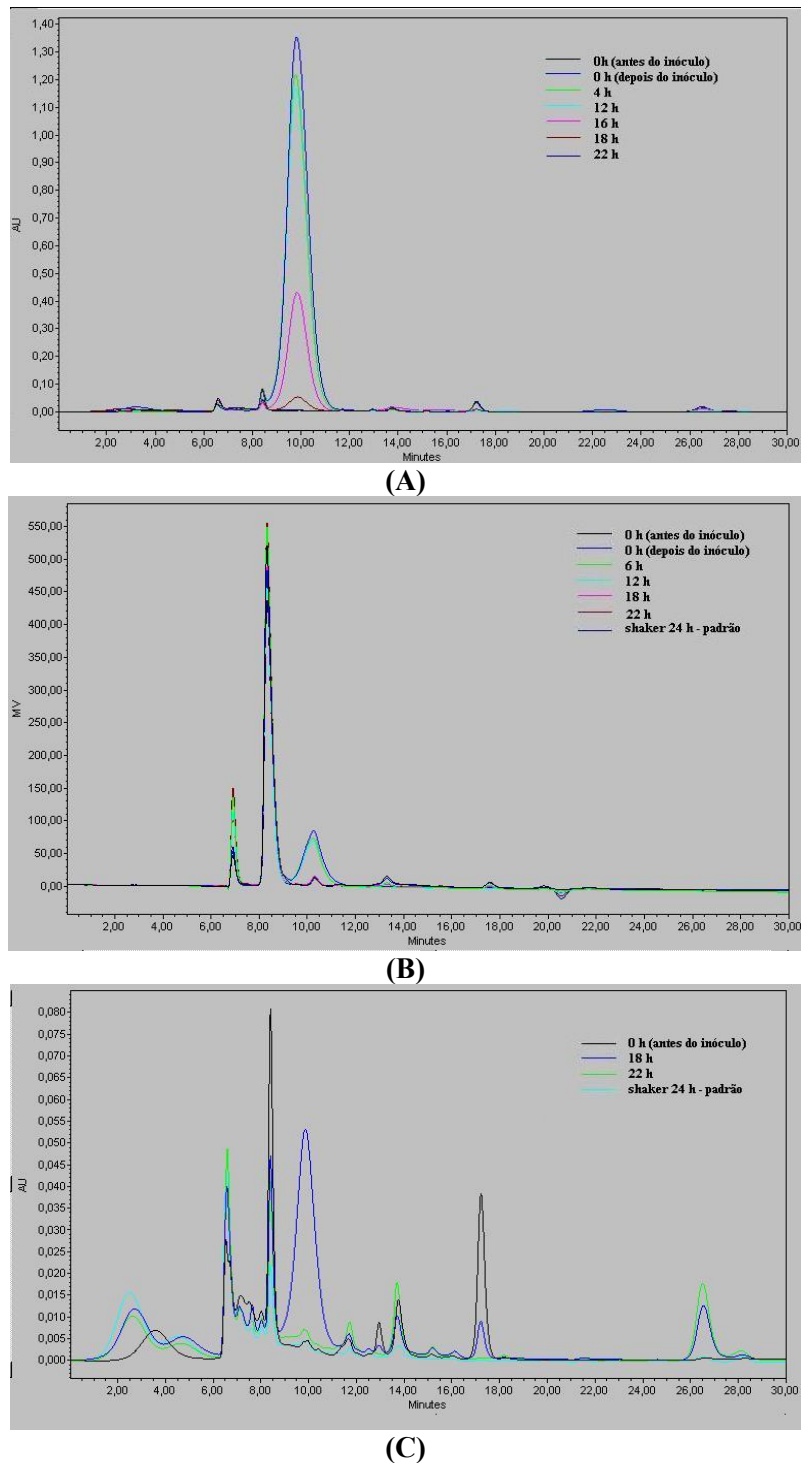
(A)

(B)



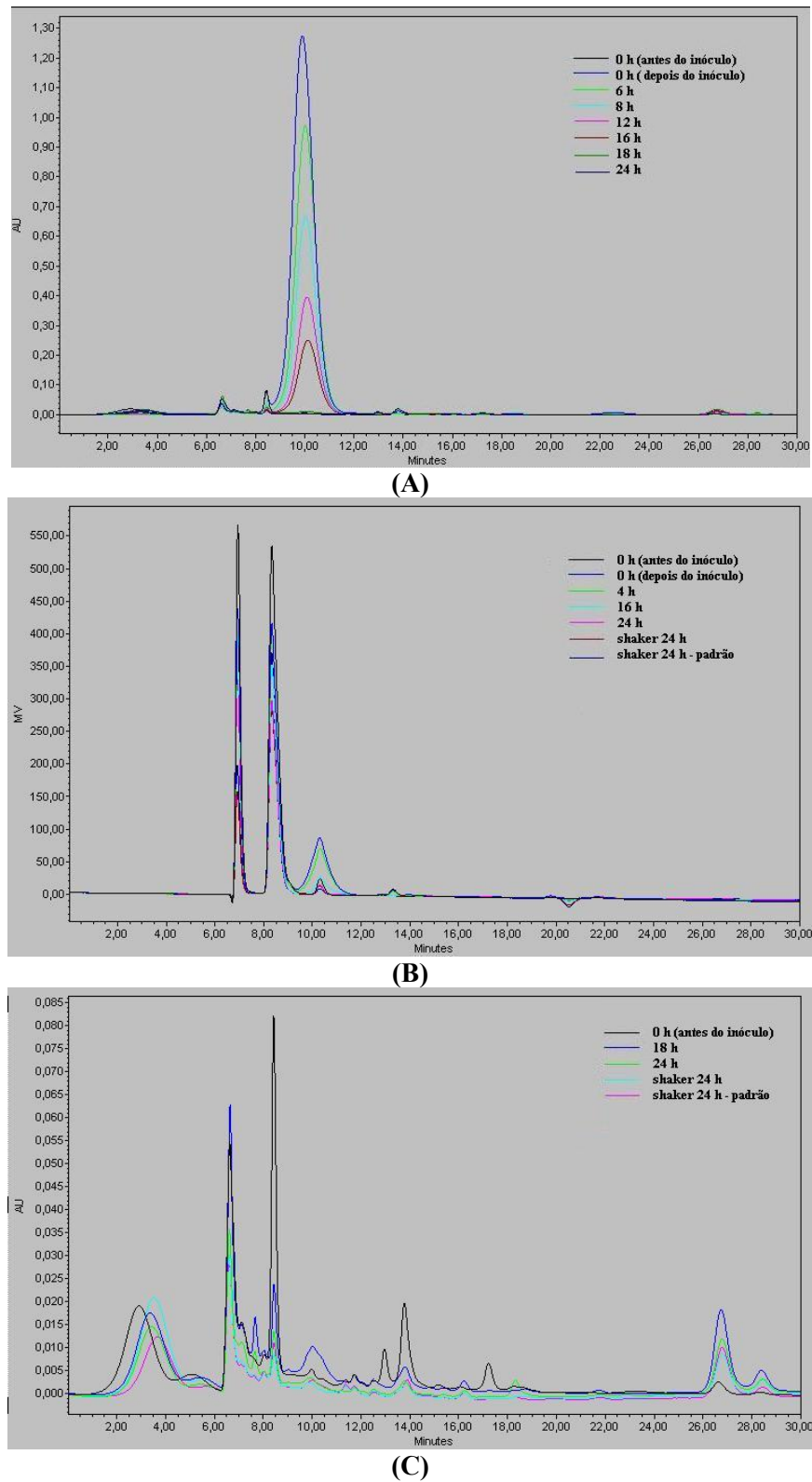
**Figura 5b.32:** Acompanhamento ao longo do tempo de cultivo das variáveis experimentais adquiridas pelo sistema de aquisição de dados – (A) Fração molar de  $\text{CO}_2$  –  $Y_{\text{CO}_2}$ , (B) velocidade de agitação, (C) fração molar de  $\text{O}_2$  –  $Y_{\text{O}_2}$ , (D) Concentração de oxigênio dissolvido, (E) velocidade de formação de  $\text{CO}_2$  –  $n_{\text{CO}_2}$ , (F) velocidade de consumo de  $\text{O}_2$  –  $n_{\text{O}_2}$  e (G) coeficiente respiratório – RQ – Ensaio 18.

## Anexo 6: Cromatogramas das amostras de caldos de cultivo para identificação de metabólitos

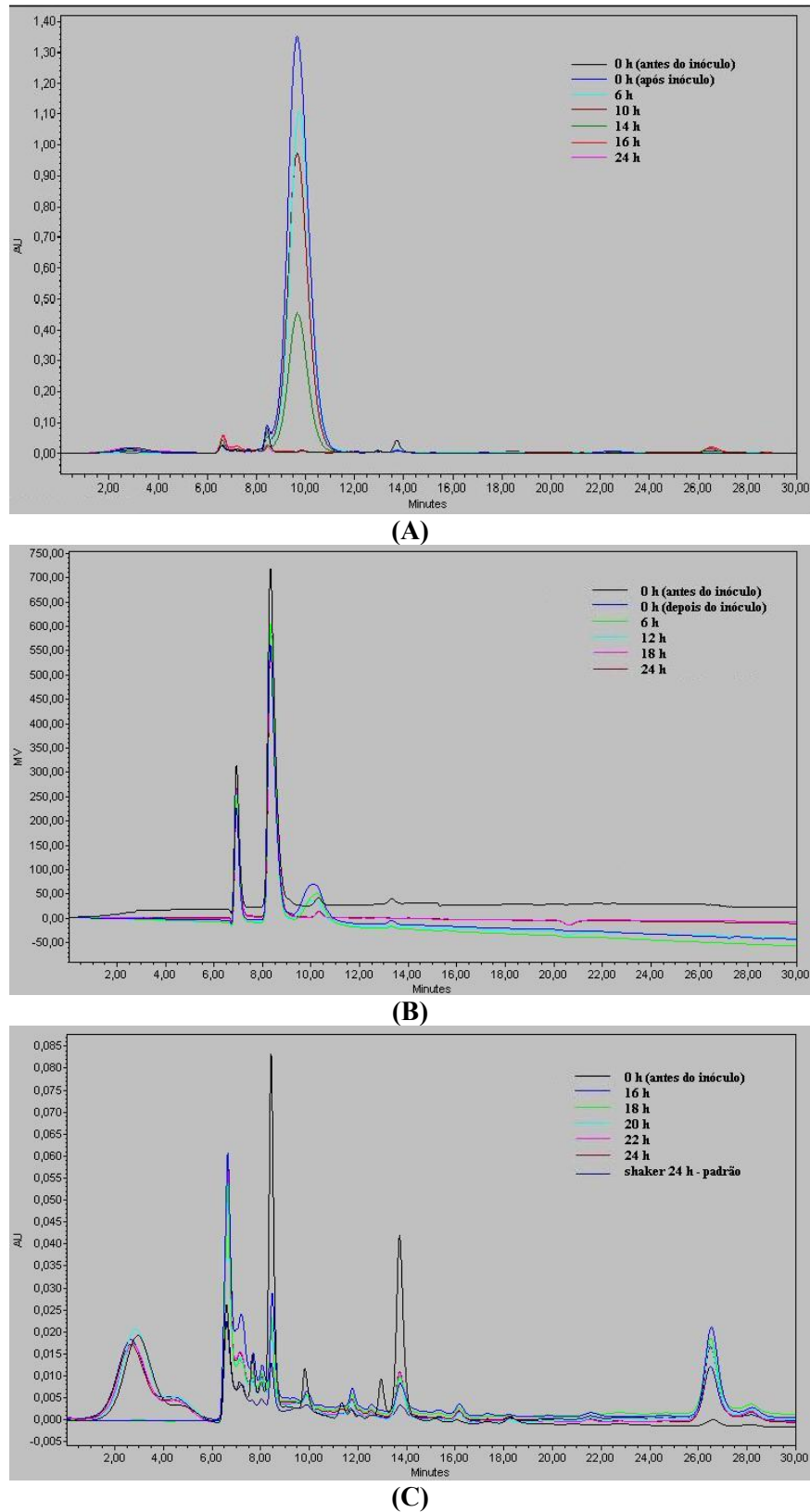


**Figura 5.1:** Acompanhamento do consumo e/ou formação de metabólitos ao longo do tempo de cultivo de *B. megaterium* em biorreator. (A) metabólito-chave, (B) lactose, galactose e ácido láctico e (C) demais metabólitos não identificados. Ensaio 11: Meio de cultivo padrão com perfil crescente de agitação e pH inicial 9,0

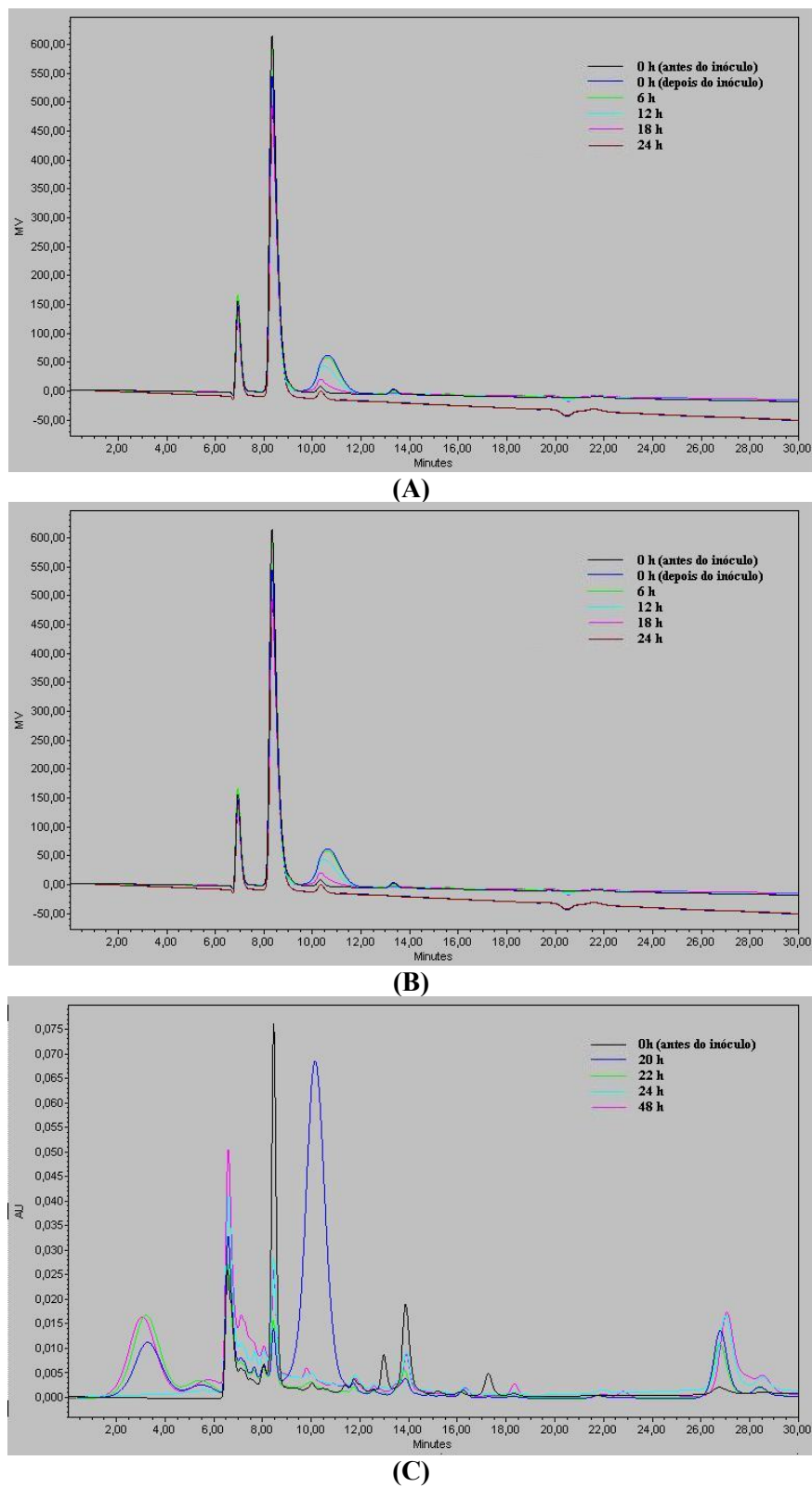




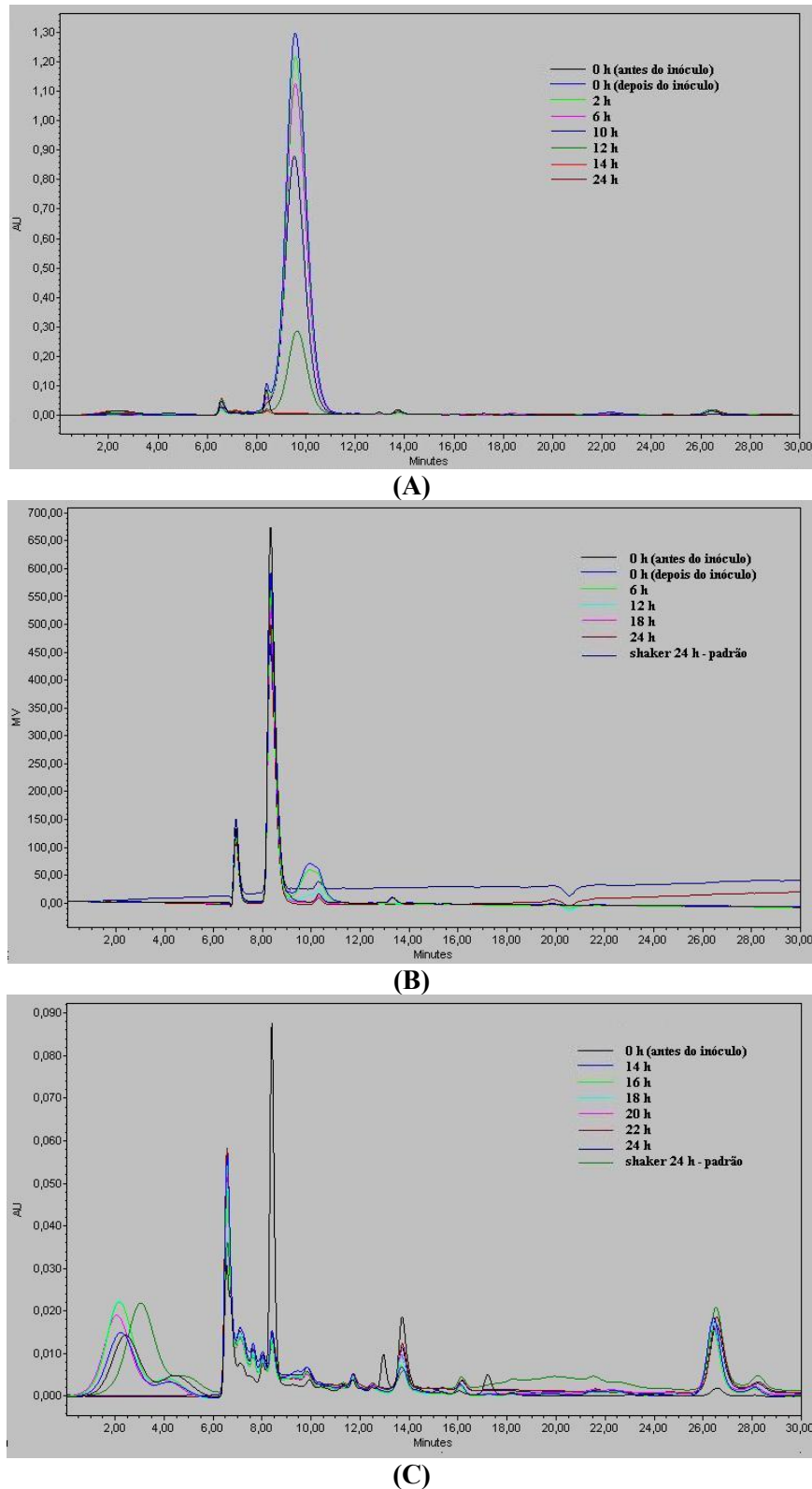
**Figura 6.2:** Acompanhamento do consumo e/ou formação de metabólitos ao longo do tempo de cultivo de *B. megaterium* em biorreator. (A) metabólito-chave, (B) lactose, galactose e ácido láctico e (C) demais metabólitos não identificados. Ensaio 15: Perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 em meio de cultivo contendo soro de queijo hidrolisado



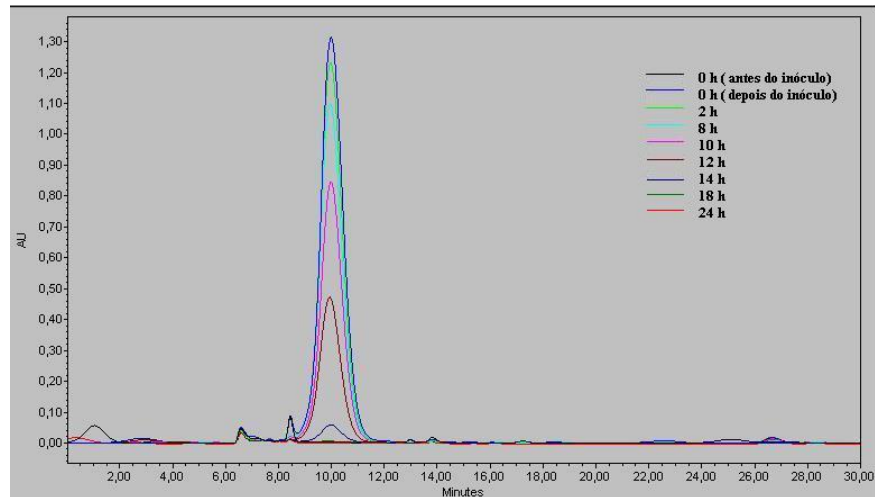
**Figura 6.3:** Acompanhamento do consumo e/ou formação de metabólitos ao longo do tempo de cultivo de *B. megaterium* em biorreator. (A) metabólito-chave, (B) lactose, galactose e ácido láctico e (C) demais metabólitos não identificados. Ensaio 12: Perfil crescente de agitação e pH inicial 8,0 em meio de cultivo padrão



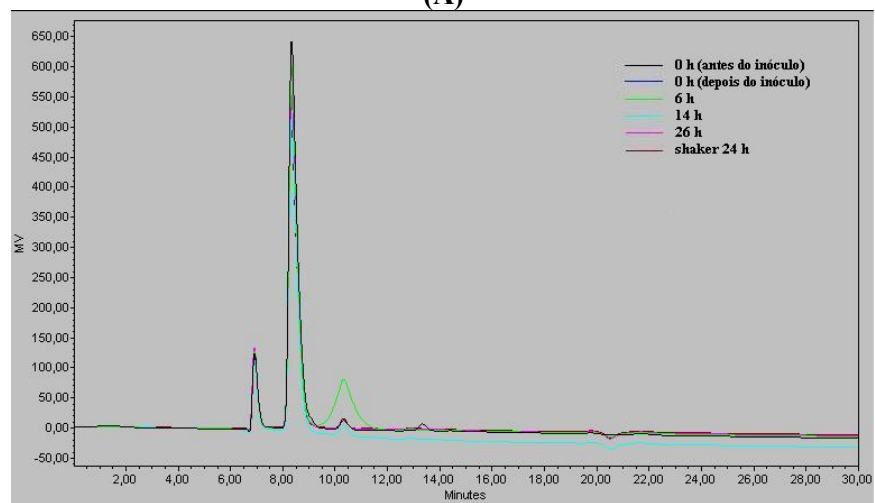
**Figura 6.4:** Acompanhamento do consumo e/ou formação de metabólitos ao longo do tempo de cultivo de *B. megaterium* em biorreator. (A) metabólito-chave, (B) lactose, galactose e ácido láctico e (C) demais metabólitos não identificados. Ensaio 13: Perfil crescente de agitação e suplementação do meio após 8 horas de cultivo com meio padrão a 180 mL/h.



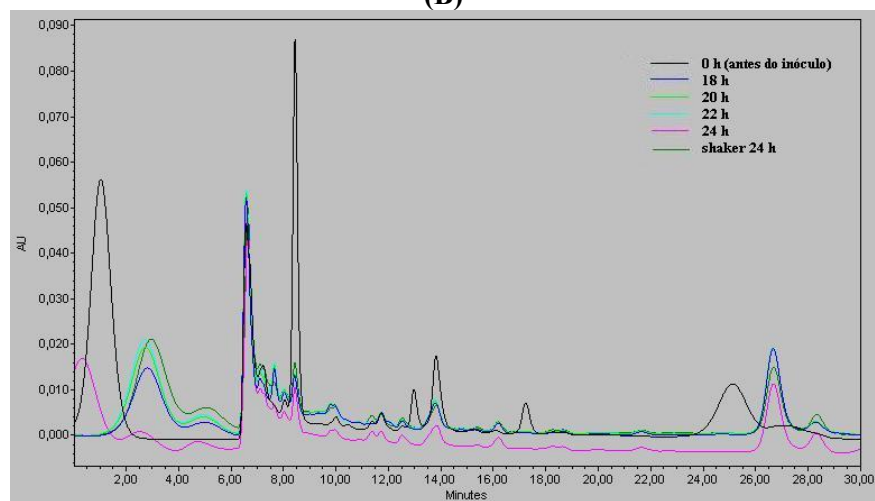
**Figura 6.5:** Acompanhamento do consumo e/ou formação de metabólitos ao longo do tempo de cultivo de *B. megaterium* em biorreator. (A) metabólito-chave, (B) lactose, galactose e ácido lático e (C) demais metabólitos não identificados. Ensaio 14: limitação na concentração de oxigênio dissolvido de 20% para 5% da saturação após 8 horas de cultivo e pH inicial 8,0.



(A)



(B)



(C)

**Figura 6.6:** Acompanhamento do consumo e/ou formação de metabólitos ao longo do tempo de cultivo de *B. megaterium* em biorreator. (A) metabólito-chave, (B) lactose, galactose e ácido láctico e (C) demais metabólitos não identificados. Ensaio 17: Manutenção da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação e pH inicial 8,0 com soro hidrolisado.