



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

**Otimização do cultivo de *Bacillus megaterium* recombinante em
bateladas alimentadas**

Carlos Alberto Galeano Suárez

São Carlos – SP

Março/ 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA

QUÍMICA

**Otimização do cultivo de *Bacillus megaterium* recombinante em
bateladas alimentadas**

Carlos Alberto Galeano Suárez

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

Orientador:

Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano

Co-orientadora:

Dra. Mônica Rosas da Costa lemma

São Carlos – SP

Março/2010

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

G152oc

Galeano Suárez, Carlos Alberto.

Otimização do cultivo de *Bacillus megaterium* recombinante em bateladas alimentadas / Carlos Alberto Galeano Suárez. -- São Carlos : UFSCar, 2010. 116 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

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

CDD: 660.63 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **CARLOS ALBERTO GALEANO SUAREZ** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 31 DE MARÇO DE 2010.

BANCA EXAMINADORA:



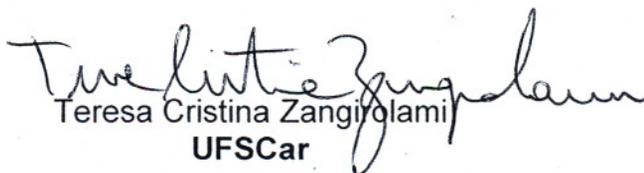
Roberto de Campos Giordano
Orientador, UFSCar



Monica Rosas da Costa Lemma
Co-orientadora, UFSCar



Laura Marina Pinotti
UFES



Teresa Cristina Zangiolami
UFSCar

Dedico este trabalho a meus pais, Magdalena e Orlando, a meu irmão Jorge, e em especial a Inti por todo o apoio e compreensão durante estes anos.

AGRADECIMENTOS

A Deus por dar-me a vida e forças para no desistir.

Ao Prof. Dr. Roberto de Campos Giordano por permitir-me a oportunidade de realizar este trabalho, além da orientação, amizade e confiança no meu trabalho.

Muito Obrigado.

À professora Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano e a Dra. Mônica Rosas da Costa lemma pelos esclarecimentos, os quais foram importantes na elaboração deste trabalho.

A minha mãe por seu carinho, apoio e amor por eu estar realizando este trabalho.

A o Adilson pelo treinamento no laboratório e sua amizade, a meus amigos Edson, Antonio Carlos, Dasciana, Lionete, a todos os companheiros, colegas e amigos de departamento, que de uma forma ou de outra colaboraram para a realização dessa dissertação, mas especialmente a Inti, pela ajuda em cada um de meus experimentos durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Penicilinas acilases são enzimas de grande importância industrial, sendo utilizadas principalmente para produção de ácido 6 - aminopenicilânico, 6-APA, a partir de penicilina G. Em fins da década de 90, seu uso para síntese de antibióticos β -lactâmicos semi-sintéticos teve início em nível industrial, como uma alternativa no âmbito da “química verde”, aos processos químicos de síntese, de alto impacto ambiental. Este mestrado teve por objetivo avaliar meios de crescimento celular para linhagens de *Bacillus megaterium* que foram usadas na clonagem de seu gene *pac* no próprio *B. megaterium*, visando a um maior número de cópias do gene, aumentando assim os níveis de expressão da enzima penicilina G acilase (PGA). Foram determinados os principais metabólitos produzidos pelas linhagens ATCC 14945, QB 1551 e PV 361 (este último cedido pela Profa. Patrícia Vary, correspondendo à linhagem selvagem QB 1551 com todos os megaplasmídeos deletados, na qual será clonada a enzima PGA). Avaliou-se a influência do meio sobre o metabolismo do microrganismo, com o objetivo de otimizar a produção da enzima em cultivos de altas concentrações celulares. A análise dos dados experimentais permitiu identificar que o meio no qual a linhagem PV 361 atingiu a maior concentração celular em cultivos em batelada alimentada foi o SNB com soro de queijo (10,0 g/L), alcançando concentração celular de 16,6 g/L (massa seca), comparado com os 12,5 g/L sem a presença do soro e 9,60 g/L no meio LB-B. Em cultivos no meio SNB com soro, a concentração de ácido láctico atingiu de 22,1 g/L, comparado com 13,2 g/L na ausência do soro. Já para o meio LB-B o produto principal foi o ácido acético com uma concentração de 6,7 g/L. Os parâmetros cinéticos ajustados foram: $\mu_{\max} = 0,285 \text{ h}^{-1}$ e $0,106 \text{ h}^{-1}$ com e sem o soro respectivamente, obtidos utilizando o algoritmo *simulated annealing* (SA) junto com o algoritmo de *Levenberg-Marquardt* (LM). Foram calculados parâmetros cinéticos como μ_{\max} , $Y_{x/s}$, na fase de batelada alimentada em cultivos em biorreator tipo tanque agitado e aerado, em escala de bancada (2L e 5 L). O modelo cinético de crescimento e de produção de metabólitos foi definido a partir de ensaios em biorreator na fase batelada. A operação do cultivo em batelada alimentada e o controle de pH não se mostraram efetivos para melhorar a produção da biomassa, pois se teve uma alta produção de ácido láctico (acima de 8 g/L na fase batelada com o meio SNB) e acético (acima de 6 g/L ao final da batelada com meio LB-B), concentrações que levaram à inibição do crescimento do microrganismo e induziram sua esporulação, fenômeno biológico que uma vez iniciado é de difícil reversão, e que dificulta ainda mais a produção em alta densidade.

ABSTRACT

Penicillin Acylases are enzymes of great industrial importance, being used mainly for production of 6-aminopenicillanic acid, 6-APA from penicillin G. In the late 90's, its use for synthesis of β -lactam semisynthetic antibiotics began on an industrial scale, an alternative in the context of "green chemistry" to the chemical synthesis of high environmental impact. The aiming thesis was to evaluate the influence of the growth media on the strains of *Bacillus megaterium* that will be used in the cloning of the gene *pac* in own *B. megaterium*, aiming at a larger number of copies of the gene, thus increasing the levels of expression of the enzyme penicillin G Acylase (PGA). It was determined the main metabolites produced by strains ATCC 14945 QB 1551 and PV 361 (the latter given by Professor Patricia Vary, corresponding to the wild QB 1551 with all megaplasmids deleted, which will be cloned with enzyme PGA). Evaluated medium has some influence on the metabolism of the organism, in order to optimize the production of the enzyme in cultures of high cell concentrations. The analysis of experimental data showed the strain PV 361 reached the highest cell concentration 16,6 g / L (dry weight), in fed-batch cultivation with the SNB medium with cheese whey (10,0 g / L), compared with 12,5 g / L without the presence of whey and 9,6 g / L in the LB-B medium. In cultures in SNB medium with whey the concentration of lactic acid reached 22,1 g/L, compared with 13,2 g/L in the absence of whey. However for the LB-B medium, the main product was acetic acid with a concentration of 6,7 g /L. Kinetic parameters were calculated as μ_{max} , $Y_{x/s}$, during the fed-batch cultivations in a bioreactor in stirred tank and aerated in a bench scale (5 L and 2L). The kinetic model for growth and production of metabolites was defined from the test phase in bioreactor batch. The operation of fed-batch culture and pH control were not effective for improving the production of biomass, because it had a high lactic acid production (up to 8 g / L in phase with the batch means SNB) and acetic acid (above 6 g / L at the end of the batch with LB medium-B), concentrations that led to the inhibition of growth of the microorganism and induced its sporulation, biological phenomenon that once started is difficult to reverse and that hinders the production in high cell density (HCDC).

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Estrutura química comum das penicilinas. _____	16
Figura 2.2. Diferentes penicilinas com o 6-APA como núcleo em comum. ____	16
Figura 2.3. Estrutura em 3D da PGA obtida por difração de raio-X _____	18
Figura 2.4. Hidrolise enzimática da Penicilina G _____	18
Figura 2.5. Foto micrografia do <i>Bacillus megaterium</i> e <i>E. coli</i> _____	21
Figura 2.6. Esporo do <i>Bacillus megaterium</i> . _____	22
Figura 2.7. Ciclo de vida do <i>Bacillus megaterium</i> . _____	24
Figura 2.8. Vias Metabólicas: Catabolismo e Anabolismo. _____	28
Figura 2.9. As vias principais de utilização da glicose nas células _____	31
Figura 2.10. Primeiro estágio da glicólise _____	32
Figura 2.11. Segundo estágio da glicólise. _____	33
Figura 2.12. Ciclo do ácido tricarboxílico. _____	34
Figura 2.13. A via das pentoses fosfato. _____	35
Figura 2.14. Fermentação Láctica. _____	40
Figura 2.15. Esquema de um biorreator operando em batelada alimentada. _	41
Figura 3.1. Esquema do procedimento utilizado para a preparação do inóculo para experimentos realizados em uma etapa em meio líquido _____	53
Figura 3.2. Esquematização da preparação do experimento para produção de massa celular em biorreator _____	56
Figura 4.1. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC utilizando meio LB “A” _____	62
Figura 4.2. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> ATCC utilizando meio LB “B” _____	62
Figura 4.3. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> PV-361 utilizando meio LB “A” _____	64
Figura 4.4. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> PV-361 utilizando meio LB “B” (sem triptona). _____	64

Figura 4.6. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de <i>B. megaterium</i> QM B1551 utilizando meio LB “A”	66
Figura 4.7. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de <i>B. megaterium</i> QM B1551 utilizando meio LB “B”	66
Figura 4.7. Crescimento celular, consumo de glicose durante cultivo de <i>B. megaterium</i> ATCC 14945 utilizando meio semi-sintético	68
Figura 4.8. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de <i>B. megaterium</i> PV 361 utilizando meio Semi-sintético	69
Figura 4.9. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de <i>B. megaterium</i> QM B1551 utilizando meio Semi-sintético	70
Figura 4.10. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de <i>B. megaterium</i> PV 361 utilizando meio SNB	72
Figura 4.11. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de <i>B. megaterium</i> PV 361 utilizando meio SNB com soro de queijo (10 g/L).	73
Figura 4.12. Crescimento celular, consumo de glicose e produção de metabólitos no ensaio em biorreator para o <i>B. megaterium</i> PV 361 utilizando meio LB-B	75
Figura 4.15. Crescimento celular, consumo de glicose e produção de metabólitos no ensaio em Biorreator para o <i>B. megaterium</i> PV 361 utilizando meio Semi-sintético.	79
Figura 4.16. Variações da porcentagem de CO ₂ (a), da frequência de agitação (b) durante o cultivo aeróbio para o <i>B. megaterium</i> PV 361 em meio Semi-sintético	80
Figura 4.17. Variações do pH (a), da porcentagem de oxigênio dissolvido (b) durante o cultivo do <i>B. megaterium</i> PV 361 em meio Semi-sintético.	81
Figura 4.18. Crescimento celular, consumo de glicose e produção de metabólitos para o cultivo do <i>B. megaterium</i> PV 361 em meio SNB.	82
Figura 4.19. Variações da porcentagem de CO ₂ (a), da frequência de agitação (b) durante o cultivo aeróbio para o <i>B. megaterium</i> PV 361 em meio SNB.	84

Figura 4.20. Variações da porcentagem de oxigênio dissolvido durante o cultivo do <i>B. megaterium</i> PV 361 em meio SNB. _____	85
Figura 4.21. Crescimento celular, consumo de glicose e produção de metabólitos para o cultivo do <i>B. megaterium</i> PV 361 em meio SNB + Soro de Queijo (10 g/L) _____	86
Figura 4.22. Evolução da produção de ácido láctico durante o cultivo de <i>Bacillus megaterium</i> PV 361, no meio SNB + Soro de queijo. _____	88
Figura 4.23. Evolução no processo de esporulação do <i>B. megaterium</i> PV 361 durante o cultivo aeróbio em meio SNB e Soro de Queijo. _____	91
Figura 4.24. Variações da porcentagem de CO ₂ (a), da frequência de agitação (b) durante o cultivo aeróbio para o <i>B. megaterium</i> PV 361 em meio SNB com 10 g/L de soro de queijo. _____	92
Figura 4.25. Variações da porcentagem de O ₂ durante o cultivo aeróbio para o <i>B. megaterium</i> PV 361 em meio SNB com 10 g/L de soro de queijo. _____	93
Figura 4.26. Comparação do crescimento celular e a adição de Base (NH ₄ OH) durante as 50 horas de cultivo aeróbio para o <i>B. megaterium</i> PV 361 em meio SNB + Soro de Queijo. _____	94
Figura 4.27. Comparação entre os valores estimados pelo SA dos parâmetros com o modelo de Monod sem inibição. _____	98
Figura 4.28. Comparação entre as equações usadas para ajuste de parâmetros e simulação do crescimento celular com inibição. _____	99
Figura 4.29. Comparação entre os valores estimados pelo SA dos parâmetros com o modelo de Monod com inibição (equação 7). _____	100
Figura 4.30. Comparação entre os valores estimados pelo SA dos parâmetros com o modelo de Monod sem inibição (equação 3). _____	102
Figura 4.31. Comparação entre os valores estimados pelo SA dos parâmetros com o modelo de Monod sem inibição (equação 3). _____	104
Figura 4.329. Comparação entre os valores estimados pelo SA dos parâmetros com o modelo de Monod com inibição (equações 7, 8 e 9). _____	104
Figura 4.33. Comparação entre os valores estimados pelo SA dos parâmetros com o modelo de Monod com inibição (equação 9). _____	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Alguns microorganismos e suas diferentes formas de produção da enzima _____	19
Tabela 2.2. Valores de Km das Penicilinas G Acilase de diferentes microrganismos. _____	20
Tabela 2.3. Ciclo de vida do <i>Bacillus subtilis</i> _____	24
Tabela 2.4. Parâmetros fisiológicos do cultivo de diferentes linhagens de <i>Bacillus</i> , na presença de glicose _____	30
Tabela 2.5. Taxa de consumo de oxigênio por <i>E. Coli</i> Bruxelles _____	38
Tabela 3.1. Composição de Meios complexos _____ para crescimento do Microorganismo _____	48 48
Tabela 3.2. Composição de Meio Semi- sintético. _____	49
Tabela 3.3. Composição de Meio Suplementar para o cultivo em meio Semi-sintético. _____	49
Tabela 3.4. Composição da solução de compostos traços para o meio Semi-sintético _____	49
Tabela 3.5. Composição do meio SNB _____	50
Tabela 4.1. Comparação de parâmetros de crescimento celular, produção de metabólitos e de alguns parâmetros cinéticos para cultivo de <i>B. megaterium</i> ATCC 14945 nos dois meios LB “A” e LB “B”. _____	63
Tabela 4.2. Comparação de crescimento, produção de metabólitos e cálculo de alguns parâmetros cinéticos para cultivo do <i>B. megaterium</i> PV 361 nos dois meios LB “A” e LB “B”. _____	65
Tabela 4.3. Comparação de crescimento, produção de metabólitos e cálculo de alguns parâmetros cinéticos para cultivo do <i>B. megaterium</i> PV 361 nos dois meios LB “A” e LB “B”. _____	67
Tabela 4.4. Comparação de crescimento, produção de metabólitos e calculo de alguns parâmetros cinéticos para cultivo do <i>B. megaterium</i> PV 361 nos dois meios LB “A” e LB “B”. _____	71
Tabela 4.5. Balanço de carbono para cultivo aeróbio (Cultivo 3), considerando 12 horas de cultivo e 1,1 L de volume _____	82

Tabela 4.6 Balanço de carbono para cultivo aeróbio (Cultivo 4), considerando 10 horas de cultivo em batelada e 1,1 L de volume	95
Tabela 4.7. Restrições nos valores dos parâmetros, limites inferior e superior.	96
Tabela 4.8. Valores estimados pelo SA dos parâmetros do modelo de Monod.	97
Tabela 4.9. Valores estimados pelo SA dos parâmetros do modelo de Monod com inibição (equação 7).	99
Tabela 4.10. Valores estimados pelo SA dos parâmetros do modelo de Monod.	101
Tabela 4.11. Valores estimados pelo SA dos parâmetros do modelo de Monod simples.	103
Tabela 4.12. Valores estimados pelo SA dos parâmetros do modelo de Monod com inibição (equação 9).	105

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Penicilinas	15
2.2	Penicilina G Acilase	18
2.3	<i>Bacillus megaterium</i>	20
2.3.1	Esporulação	23
2.4	Produção de PGA por microrganismos geneticamente modificados..	25
2.5	Produção de proteínas recombinantes em alta densidade celular	26
2.6	Metabolismo celular	28
2.6.1	Glicólise.....	30
2.6.2	Ciclo de Krebs	34
2.6.3	Via das Pentoses Fosfato.....	35
2.6.4	O Efeito Pasteur e o Efeito Crabtree	36
2.6.5	Produção de Ácido Lático.....	39
2.7	Modelo matemático	40
2.7.1	Modelo matemático de crescimento	40
2.7.2	Otimização dinâmica de cultivos de alta densidade celular.....	43
2.7.3	Ajuste de Parâmetros	45
2.7.3.1	45
3.	MATERIAL e MÉTODOS	48
3.1.	MATERIAL	48
3.1.1.	Microorganismo.....	48
3.1.2.	Meios de Crescimento celular	48
3.1.3	Equipamentos	51
3.1.4.	Reagentes	52
3.2	METODOLOGIA	52
3.2.1	Cultivo do Microrganismo em Shaker.....	52
3.2.1.1	Armazenamento em meio sólido.....	52
3.2.1.2	Preparação do inóculo	53

3.2.1.3. Cultivo em shaker	54
3.2.2. Cultivo do Microrganismo em Biorreator de 2L (Produção de biomassa)	54
3.2.2.1. Preparação do inóculo para cultivo em biorreator.....	54
3.2.2.2. Preparação do Cultivo em biorreator	55
3.2.2.2.1 Cultivo em biorreator em meio complexo	55
3.2.2.2.2. Cultivo em meio Semi-sintético	56
3.2.3 Análises.....	57
3.2.3.1 Massa Celular	57
3.2.3.2 Análise das concentrações de carboidratos e de ácidos orgânicos ...	57
3.2.3.3. Aminoácidos.....	58
3.2.4. Determinação de parâmetros cinéticos e outros cálculos	58
3.2.4.1 Velocidade de Produção de Dióxido de Carbono.....	58
3.2.4.2. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular	59
3.2.4.3 Determinação do coeficiente de rendimento de substrato a células ..	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
4.1 Cultivos em Shaker	61
4.1.1 Meios LB	61
4.1.2 Meio Semi-sintético (SS).....	67
4.1.3 Cultivo no Meio SNB: linhagem PV361	71
4.1.3.1 Linhagem PV361, shaker , Meio SNB e Soro de queijo.....	73
4.2. Cultivos em Biorreator	74
4.2.1 Cultivo 1: Batelada alimentada, linhagem PV361, Meio LB-B.....	74
4.2.2 Cultivo 2: Meio Semi – sintético – linhagem PV361, batelada alimentada	79
4.2.3 Cultivo 3: Meio SNB, linhagem PV361, batelada alimentada	81
4.2.4 Cultivo 4: Meio SNB e Soro de Queijo, batelada alimentada	85
4.3 Estimativa de parâmetros	96
4.3.1 Estimativa de parâmetros para o Cultivo 1.....	97
4.3.2 Estimativa de parâmetros para o Cultivo 2.....	101
4.3.3 Estimativa de parâmetros para o Cultivo 3.....	103
5. CONCLUSÕES.....	107
6. SUGESTÕES.....	108

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 109

1. INTRODUÇÃO

Penicilina G acilase (PGA) é uma das mais importantes enzimas utilizadas em escala industrial. Ela catalisa a hidrólise de penicilina G (benzil penicilina) obtendo ácido fenilacético (AFA) e ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), este último um composto-chave para síntese de antibióticos β -lactâmicos (Yang *et al.*, 2006). Os antibióticos β -lactâmicos são dos mais importantes clinicamente, além de serem utilizados na medicina veterinária. O crescimento do mercado mundial de semi-sintéticos foi expressivo desde seu aparecimento, passando de 1.000 ton./ano em 1970 para 45.000 ton./ano em 2000 (BRUGGINK; ROY, 2001).

PGA pode ser produzida por diferentes microrganismos, entre os quais *Escherichia coli* e *Bacillus megaterium*. Embora o cultivo de *E.coli* seja a principal rota industrial para produção de PGA, esse microrganismo não libera a enzima para o meio, retendo-a em seu espaço periplasmático. *B. megaterium* secreta a enzima no meio, com conseqüente redução dos custos de produção da enzima.

A produção de PGA com o microrganismo selvagem está sujeita aos mecanismos regulatórios típicos de metabólitos secundários, sendo induzida por ácido fenilacético (AFA) e severamente reprimida por substratos de rápido consumo, especialmente glicose. A produção dessa enzima por *B. megaterium* vem sendo estudada há vários anos no DEQ/UFSCar, com os mais altos níveis de produção da enzima obtidos usando-se aminoácidos como fonte de nitrogênio e carbono e AFA como fonte de carbono e indutor (PINOTTI,2006). Tentativas de alimentação contínua de aminoácidos para aumento da massa celular e conseqüente aumento da produção associada de PGA conduziram a aumento da massa celular, mas não dos níveis de expressão da enzima (SILVA, 2006, 2007), foi iniciado, por isso, no DEQ/UFSCar, estudo visando produção heteróloga de PGA de *B. megaterium*, pois a produção da enzima recombinante dependeria apenas do promotor utilizado no sistema de expressão escolhido, evitando-se assim a severa repressão catabólica por fontes de carbono de fácil assimilação, que ocorre no microrganismo selvagem. Assim, altas concentrações do microrganismo recombinante no meio deverão conduzir a altos níveis de expressão da enzima. O cultivo na presença de glicose,

importante na obtenção de altas densidades celulares, tornar-se-ia então possível, com conseqüente aumento na produtividade do processo.

Foi estudada inicialmente a utilização de *E.coli* como hospedeira, concluindo-se, contudo, pela impossibilidade da expressão ativa de PGA de *B. megaterium* por *E.coli* (IEMMA et al, 2010). Houve assim necessidade de busca de outros hospedeiros. *Bacillus megaterium* oferece vantagens que tornam esta bactéria gram-positiva uma candidata promissora para a produção e secreção de proteínas recombinantes: utiliza grande variedade de substratos, apresenta alta capacidade de secreção (VARY, 1994), ausência de proteases alcalinas (RYGUS; HILLEN, 1991) estabilidade de plasmídeo em comparação com *Bacillus subtilis* (MEINHARDT et al, 1989) e não gera endotoxinas.

O processo de clonagem do gene *pac* do *B. megaterium* 14945 no próprio *B. megaterium* foi então iniciado, utilizando-se os plasmídeos pHIS1522 e pHIS1525 (Mobitec, USA), vetores construídos especificamente para clonagem e expressão em *B. megaterium* salvagem via indução por xilose, doados gentilmente pelo Dr Simon Stammen, Alemanha. Já foram efetuadas a subclonagem e propagação do gene *pac*, estando em estudo, no momento, a etapa de transformação de *B. megaterium* (inserção no microrganismo do plasmídeo contendo o gene *pac* clonado).

Embora no cultivo de microrganismos recombinantes a produção da enzima deixe de estar sujeita aos mecanismos de regulação tradicionais, o cultivo aeróbio de alta densidade pode ser dificultado por problemas de inibição pelo substrato e por produtos metabólicos ou pela instabilidade das condições de transporte de oxigênio. Alimentação contínua do substrato, numa vazão mássica tal que mantenha a sua concentração baixa no meio é a estratégia usada para contornar o problema de inibição. Previsão adequada da estratégia de alimentação é, pois, essencial para um cultivo bem sucedido. Essa previsão, contudo, requer conhecimento prévio dos padrões de consumo de substratos e de geração de metabólitos. Assim, paralelamente aos estudos de clonagem e expressão do gene *pac* de *B.megaterium*, tornava-se importante iniciar estudos de cultivo desse microrganismo na presença de glicose, uma vez que o uso desse substrato é

importante para obtenção de alta densidade celular e que a grande maioria dos cultivos efetuados no DEQ/UFSCar com *B.megaterium* foram na ausência desse substrato.

Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar padrões de consumo de substratos, crescimento celular e geração de metabólitos para três diferentes linhagens de *B. megaterium* cultivadas em frascos agitados e em biorreator, em três diferentes meios, na presença de glicose.

Modelagem

Finalmente como ferramenta para futuros cultivos, este trabalho buscou associar um enfoque aplicado, na medida em que dados obtidos em experimentos realizados no laboratório em técnicas alternativas para simulação e modelagem de processos foram utilizados nas simulações aqui realizadas. Desta maneira, implementou-se um modelo baseado em equações simples de crescimento e produção de metabólitos para simular o crescimento do microrganismo durante o processo de produção de massa celular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Penicilinas

Os antibióticos são produtos do metabolismo secundário de microrganismos, que inibem o processo de crescimento de outros microrganismos, inclusive quando utilizados em baixas concentrações. Eles interferem no metabolismo celular e por mecanismos diversos levam à interrupção da atividade das células, inibindo seu crescimento ou eliminando os microrganismos patogênicos (OGURI, 2006).

A penicilina, como antibiótico derivado do fungo *Penicillium notatum*, foi descoberta em 1928 pelo bacteriólogo britânico Alexander Fleming. Esta descoberta revolucionaria o tratamento de infecções causadas por bactérias patogênicas, além de induzir a procura de novos compostos com atividade farmacológica, produzidos através de bioprocessos (SWARTZ, 1985).

Assim, essa descoberta trouxe para a indústria de base biotecnológica um novo produto comercial, de uso terapêutico, além dos tradicionais alimentos e bebidas já existentes na época. Dessa forma, iniciou-se uma revolução no tratamento de infecções bacterianas, que serviu de modelo para o surgimento de numerosos compostos produzidos por via fermentativa (SILVA, 2003).

As várias penicilinas existentes são constituídas de um anel tiazolidina fundido a um núcleo comum, o anel β -lactâmico. O núcleo β -lactâmico corresponde a uma amida cíclica (lactama) contendo quatro lados e um anel tiazolidinico, que contém enxofre (SEBEK et al, 1987). Esse grupamento, se isolado, denomina-se ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Ao 6-APA podem se ligar diferentes cadeias laterais, por uma ligação peptídica, dando origem a diferentes antibióticos penicilâmicos. A Figura 2.1 mostra a estrutura química do ácido 6-aminopenicilânico, 6-APA.

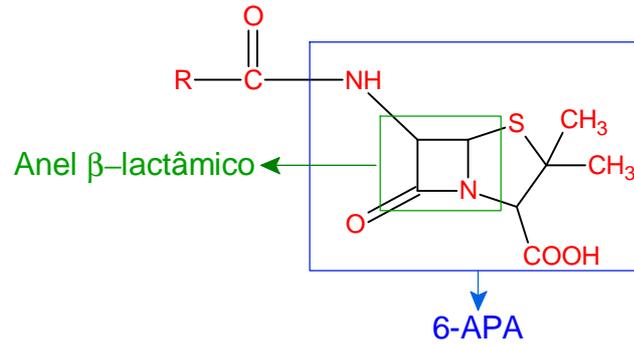


Figura 2.1 Estrutura química comum das penicilinas.

Penicilinas biosintéticas, com diferentes estruturas, podem ser obtidas diretamente dos caldos de cultura do biorreator. As mais conhecidas são as penicilinas G e V, pois possuem maior interesse clínico (SWARTZ, 1985).

A figura 2.2 mostra as diferentes penicilinas, que têm o 6-APA como grupamento comum.

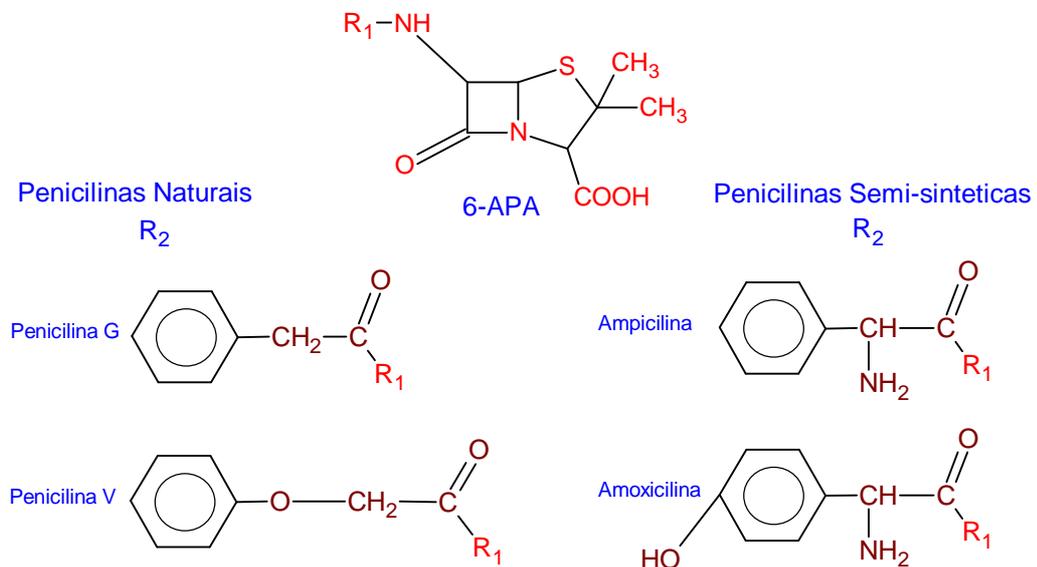


Figura 2.2. Diferentes penicilinas com o 6-APA como núcleo em comum.

As penicilinas semi-sintéticas são obtidas após a substituição da cadeia lateral das penicilinas biosintéticas por via química ou enzimática. O processo industrial padrão, atualmente, utiliza a penicilina G acilase, PGA (também denominada penicilina amido hidrolase) para hidrólise enzimática da penicilina G,

obtendo-se assim o 6-APA que será posteriormente ligado a diferentes cadeias laterais (HERSBACH et al, 1984; APUD HOJO, 1997; BRUGGINK et al, 2001).

As penicilinas semi-sintéticas vêm sendo obtidas industrialmente pela “rota química”, a qual emprega solventes tóxicos e geram resíduos não-recicláveis de alto impacto ambiental (TONIN, 2005).

Desde 1994 o Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar realiza estudos relativos à produção, purificação e imobilização da enzima penicilina G acilase (PGA) de *Bacillus megaterium*. Paralelamente, estudos utilizando PGA imobilizada estão sendo realizados com o objetivo de produzir antibióticos semi-sintéticos via “Rota Verde”, empregando essa enzima na síntese de ampicilina e amoxicilina a partir de 6-APA e de ésteres das respectivas cadeias laterais. Essa rota possui como atrativos o uso de reações em meio aquoso, à temperatura ambiente e que geram como resíduos do processo industrial sais de baixo impacto ambiental. PGA pode ser produzida por uma variedade de microrganismos incluindo bactérias, fungos e leveduras. O mais estudado é *E. coli*.

A produção da enzima de forma extracelular é vantajosa, já que simplifica as etapas de separação e purificação, favorecendo a viabilidade econômica da produção industrial da enzima (SOUZA, 2003). Esta característica torna particularmente interessante o estudo do processo de produção de PGA por *B. megaterium*.

A enzima penicilina G acilase (PGA) é uma amido hidrolase que tem sido empregada para obtenção de 6-APA e ácido fenilacético (AFA) a partir de penicilina G por várias empresas no mundo, que empregam a enzima imobilizada (SAVIDGE, 1984; BRUGGINK et al, 2001; GIORDANO et al, 2007).

Penicilinas G acilase de *E. coli* e de *B. megaterium* são dímeros, com o sítio catalítico localizado na sub-unidade beta. A serina terminal dessa sub-unidade é o *locus* de formação do complexo acil-enzima, etapa elementar essencial para a atividade catalítica (GIORDANO et al, 2007) A figura 2.3 mostra a estrutura da enzima; a Figura 2.4 mostra a reação de hidrólise da Penicilina G catalisada pela PGA para produção de 6-APA.

2.2 Penicilina G Acilase

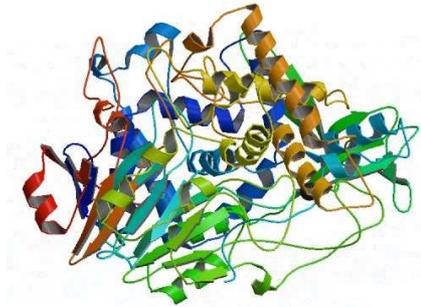


Figura 2.3. Estrutura em 3D da PGA obtida por difração de raio-X (<http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3K3W>)

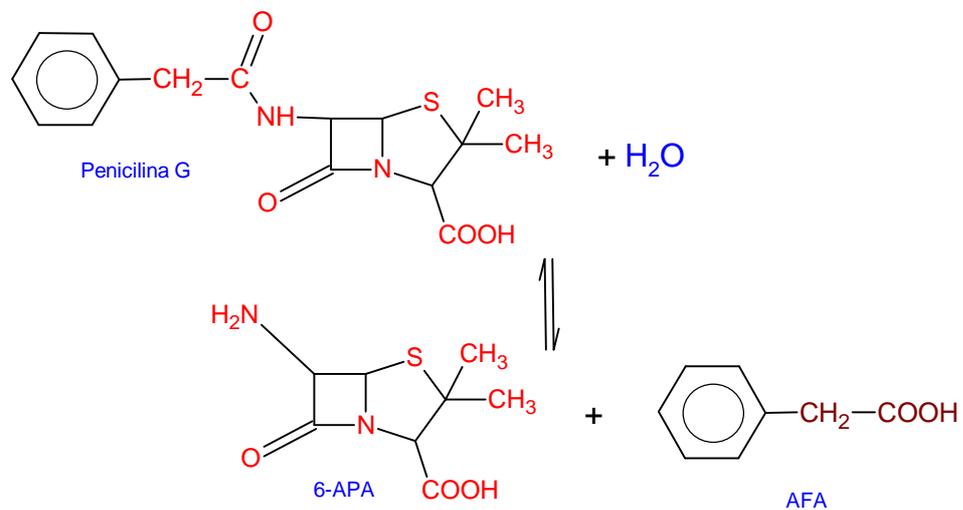


Figura 2.4. Hidrólise enzimática da Penicilina G (SAVIGDE, 1975)

Segundo Illanes et al., 1994, mais de 15 penicilinas semi-sintéticas derivadas do 6-APA são comercializadas, sendo as ampicilinas e amoxicilinas as de maior importância. O 6-APA também pode ser obtido pela hidrólise da Penicilina V, embora o substrato preferencialmente utilizado seja a Penicilina G. Note-se que penicilinas acilases provenientes de bactérias têm maior afinidade para hidrolisar

Penicilina G, enquanto que as provenientes de fungos e actinomicetos tem maior afinidade para hidrolisar a Penicilina V (SAVIDGE, 1984). A literatura reporta que a produção microbiana de PGA é induzida pelo ácido fenil acético (AFA) (ACEVEDO; COONEY, 1973; SAVIDGE; COLE, 1975; ILLANES et al, 1994).

Penicilina G Acilase pode ser obtida de vários microrganismos, algumas das bactérias produtoras são: *Acromobacter spp*, *Actinoplanes spp*, *Bovista plúmbea*, *Fusarium spp*, *Kluyvera citrophila*, *Proteus rettgeri*, *Pseudomonas melanogenum*, *Streptomyces lavendulae*, *Escherichia coli* e *Bacillus megaterium* (SHEWALE; SIVARAMAN, 1989). A tabela 2.1 mostra alguns dos microrganismos produtores da penicilina G acilase.

Tabela 2.1. Alguns microrganismos e suas diferentes formas de produção da enzima (PGA) (Souza, 2003)

Microorganismo	Tipo de enzima
<i>Escherichia coli</i>	Intracelular
<i>Kluyvera citrophila</i>	Intracelular
<i>Proteus rettgeri</i>	Intracelular
<i>Bacillus megaterium</i>	Extracelular

Savidge e Cole (1975), relataram que as enzimas produzidas a partir de diferentes organismos apresentam características, propriedades e valores de parâmetros cinéticos diferentes.

A Tabela 2.2 apresenta a constante de Michaelis-Menten para Penicilina G Acilase produzida por diferentes microrganismos.

Tabela 2.2. Valores de Km das Penicilinas G Acilase de diferentes microrganismos. (Souza, 2003)

Microorganismo	K _m (Mm)
<i>Escherichia coli</i>	7,7
<i>Escherichia coli</i> NCIB 8743 A	0,67
<i>Escherichia coli</i> NCIB 8743 A imobilizada	30,0
<i>Bacillus megaterium</i>	4,5

Estudos referentes a produção de PGA mostram que Illanes et al (1994), relataram que a presença de glicose no meio de fermentação não favorece a produção da PGA, ocorrendo repressão catabólica. Sendo assim, a produção da enzima ocorre principalmente após o consumo da glicose pelo microrganismo. Por esta razão a indução para a produção da enzima tem que ser feita depois que o microrganismo atingiu alta densidade celular e que a concentração de glicose seja zero.

Uma vantagem considerável é que o *Bacillus megaterium* produz a enzima extracelularmente, embora que a maioria das publicações reporta o uso de penicilina acilase de *Escherichia coli* (produzida intracelularmente, portanto). Sendo que a produção por *E. coli* demanda a ruptura das células, aumentando o número de etapas de separação e purificação, com impacto negativo sobre os custos de produção (SHEWALE; SIVARAMAN, 1989).

2.3 *Bacillus megaterium*

Bacillus megaterium é usado amplamente na produção de mais de 40 diferentes enzimas de interesse industrial, incluindo amilases, proteases, glucanases, lipases, nucleases e fosfatases (PRIEST, 1977). Por ser um microrganismo não patogênico para a maioria das espécies (incluindo a humana) e que tem a habilidade de secretar grande variedade de proteínas, esta bactéria é usada nos processos de produção de fármacos, alimentos e cosméticos, como também em aplicações químicas.

Algumas dificuldades que foram apresentadas anteriormente no uso de cepas como transformação, análise genética e sistemas de produção de DNA recombinante para *B. megaterium*, agora estão sendo reduzidas rapidamente, já que estão se desenvolvendo novas técnicas para transformar o microrganismo, como por exemplo, fusão de protoplastos, eletroporação, plasmídeos de conjugação e a utilização de fagos.

B. megaterium apresenta a versatilidade de várias outras espécies de *Bacillus* em clonagem e engenharia genética para uso industrial. Há, é claro, vantagens em se dispor de várias espécies com características distintas para escolher como hospedeiros de produção. Por exemplo, *B. megaterium* não secreta proteases de forma significativa, enquanto que as proteínas secretadas por *B. stearothermophilus* têm alta termoestabilidade (VARY, 1992). Como o conhecimento da genética de cada espécie se desenvolve continuamente, as oportunidades de novas aplicações certamente irão aumentar.

A figura 2.5 mostra uma micrografia de *Bacillus megaterium*, comparando seu grande tamanho frente a *E. coli*.

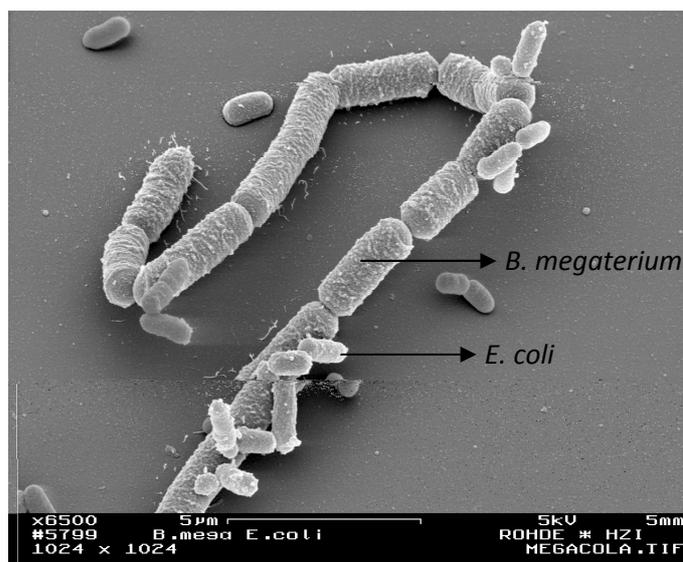


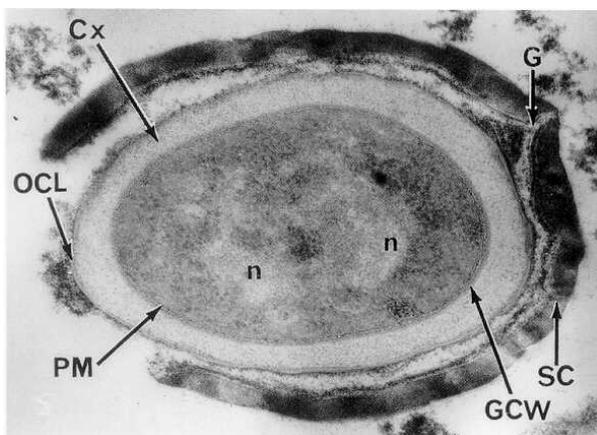
Figura 2.5. Foto micrografia do *Bacillus megaterium* e *E. coli*
(http://www.bios.niu.edu/b_megaterium/presentations/bmeg101_vary.pdf)

B. megaterium tem capacidade de esporulação e destaca-se dentro do gênero *Bacillus* pelo grande tamanho de suas células vegetativas e esporos (veja-se figura 2.5), (VARY, 1994). É um microrganismo procarioto gram positivo, que também vem sendo utilizado para a produção de biomoléculas recombinantes tais como toxina A (BURGER et al, 2003) piruvato ,(HOLLMANN; DECKWER, 2004) dextranasacarase (MALTEN et al, 2005) levanasacarase de *Lactobacillus* (MALTEN et al, 2006).

B. megaterium não transformado também tem sido utilizado pela indústria na produção de algumas enzimas e produtos químicos, tais como amilases, vitamina B12, penicilina amidase, e glicose desidrogenase (VARY, 1992).

A espécie foi descrita pela primeira vez por De Bary (1884) . O *B. megaterium* é encontrado em diversas zonas de temperatura por todo o mundo, na terra, água do mar, em sedimentos, arrozais, alimentos secos, leite (VARY, 1992). As células vegetativas desse microrganismo são cilindros de extremidades arredondadas. Em agar nutriente, tem diâmetros em torno de 1,5 μm e comprimento na faixa de 2,5-6,0 μm .

O *B. megaterium* possui capacidade de esporulação, seus esporos são elipsoidais, com dimensões de 0,8-1,2 por 1,5-2,0 μm . Cresce de forma ordenada, abundante, aparência lisa gordurosa, translúcida para opaca, branca leitosa para amarelo, sem escurecimento com o tempo (MURAO et al, 1964). A figura 2.6 mostra o um esporo de *Bacillus megaterium* e a estrutura que o compõe.



Cx	Cortex
OCL	Capa externa do cortex
PM	Membrana plasmática
GCW	Parede celular
SC	Cobertura de esporo
G	Extremo germinativo
n	Nucleóide

Figura 2.6. Esporo do *Bacillus megaterium*.

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=mmed&part=A305&rendertype=figure&id=A309>)

Quanto às propriedades fisiológicas, sabe-se que a temperatura ótima de crescimento desta bactéria está entre 28°C e 35°C, não ocorrendo nenhum crescimento acima de 45°C. O pH ótimo está entre 7,0 e 8,5 e nenhum crescimento ocorre a pH abaixo de 5,0 (MURAO et al, 1964).

Na respiração do microrganismo, alguns reportam que é um microrganismo estritamente aeróbio, mas também tem algumas publicações nas quais se apresenta o crescimento anaeróbico, (MACRAE, 1958) e (ROTH, 1955).

Este microrganismo apresenta as vantagens de naturalmente não ser patogênico, produzir pouquíssimas proteases, e não produzir endotoxinas na membrana da parede celular. Biedendieck et al, (2006) desenvolveram um sistema plasmidial para a produção intracelular e purificação em *B. megaterium*.

PGA de *B. megaterium*, como as de outras bactérias Gram-positivas, é secretada para o meio. O gene que codifica a PGA de *B. megaterium* (gene *pac*) apresenta 2406 nucleotídeos. A subunidade alfa apresenta aproximadamente 29 KDa e a subunidade beta 60 KDa. A seqüência de aminoácidos do gene *pac* revelou grande similaridade com a de outras beta-lactâmases (MARTIN et al, 1995; RIBEIRO; COL, 2006; SOUZA, 2005).

2.3.1 Esporulação

A figura 2.7 ilustra os três tipos de célula que existem no ciclo de vida do *Bacillus*: células vegetativas, esporângios e esporos. Quando os nutrientes se encontram em grandes quantidades, as células vegetativas podem crescer rapidamente por divisão, mas quando os nutrientes são esgotados algumas das células morrerão, enquanto outras vão sobreviver porque se encontram em um estado intermediário entre o vegetativo e a esporulação conhecido como esporângio. Então os esporângios representam o estado de diferenciação entre o processo de crescimento vegetativo e o processo de esporulação.

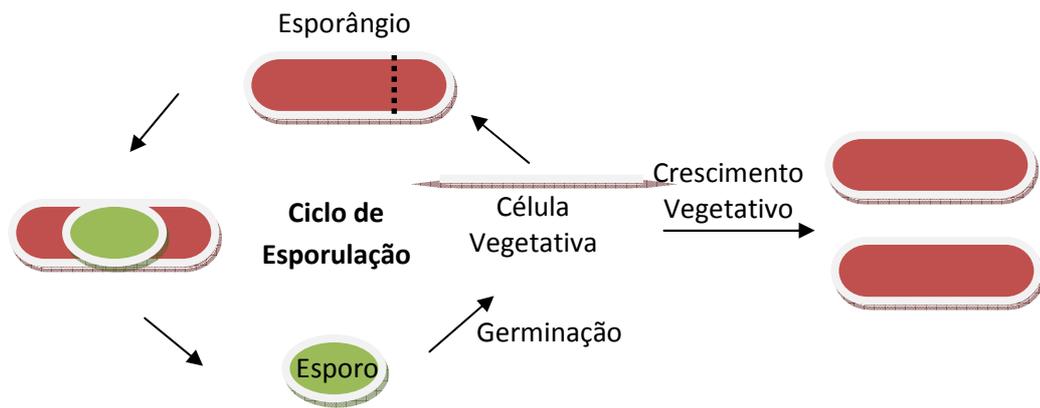


Figura 2.7. Ciclo de vida do *Bacillus megaterium*.

(Fordyce and Rawlings, 1996)

Na tabela 2.3 se apresentam os sete estados nos quais o ciclo de vida pode-se dividir, de acordo com a morfologia e a bioquímica.

Tabela 2.3. Ciclo de vida do *Bacillus subtilis* (Huang, 2002).

Estado da Esporulação	Condição
Estado 0	Crescimento vegetativo normal
Estado 2	septação assimétrica
Estado 3	Protoplasto pré-esporo
Estado 4	Formação de cortex
Estado 5	Formação de cobertura
Estado 6	Maduração
Estado 7	Relaxação

Alguns pesquisadores têm reportado que o tempo para alcançar o período de maduração leva aproximadamente dez horas (HUANG, 2002).

Ollis (2003) modelou a esporulação de *Bacillus thuringiensis* e descreveu a produção de uma exotoxina usando a equação de Luedeking-Piret, e a formação de esporo como uma função de atraso de primeira ordem na concentração celular.

A esporulação é um processo biológico complexo. Com efeito, Jeong et al, (1990), propuseram modelo estruturado que descreve a transição entre o crescimento vegetativo e a esporulação, mas incorporando 39 equações diferenciais não-lineares com quase 200 parâmetros, o que torna essa abordagem impraticável para aplicações em otimização e controle do cultivo.

2.4 Produção de PGA por microrganismos geneticamente modificados

A tecnologia do DNA recombinante tem sido largamente utilizada para aumentar a produção de proteínas em microrganismos naturalmente produtores dessas biomoléculas. Dentre os microrganismos mais utilizados, está a bactéria *Escherichia coli*, devido às suas boas características como hospedeira (MARTIN et al, 1995)Huang et al., (1998), amplificaram o gene de PGA de *B. megaterium* CA 4098 através de PCR, com clonagem em um vetor (pKK223-3) e expressão em *E. coli* HB101.

Bacillus subtilis também vem sendo testado como hospedeiro. Yang et al, (1999), amplificaram o gene de PGA de *B. megaterium* por PCR e subclonando em um vetor de expressão pPZW103. O plasmídeo recombinante era transferido para *B. subtilis* DB104. Enquanto a produção de PGA é induzida pelo ácido fenilacético em *B. megaterium*, na linhagem transformada (*B. subtilis*) a enzima era produzida constitutivamente. Procedimento semelhante foi realizado por Yang et al., 2001 para expressar PGA de *B. megaterium* em *B. subtilis* WB600. O nível de PGA atingido foi de 40 UI/mL sob condições otimizadas.

A utilização do próprio *B. megaterium* para expressão do gene *pac* de *B. megaterium* também vem sendo estudada. Panbangred et al, (2000), utilizando

Bacillus megaterium UN1 e cepas mutantes do mesmo microorganismo, clonaram o gene *pac* e obtiveram uma produção de PGA com atividade de 20.4 Uml^{-1} em 36 h de cultivo. Yang et al, (2006), produziram PGA recombinante de *Bacillus megaterium* 14945, utilizando *B. megaterium* MS941. A produção da enzima foi de 40mg por litro de meio de cultura, utilizando biorreator de 2 L.

Visando a maximizar a capacidade de *B. megaterium* para a secreção de exoenzimas em grandes quantidades para o meio, vetores utilizando os peptídeos sinais da esterase LipA de *B. megaterium* (MALTEN et al, 2006) e PGA (BIEDENDIECK et al, 2007a) foram desenvolvidos.

Gamer et al, (2007), desenvolveram um vetor que permite a produção e secreção de proteínas recombinantes em *B. megaterium*. Diversos sistemas promotores (xilose ou sacarose-induzíveis, T7 RNA polimerase dependente) podem ser empregados para a expressão de genes recombinantes, enquanto que uma série de diferentes peptídeos sinais podem ser usados para a secreção de proteínas. Seqüências codificantes para peptídeos de fusão tornam possível a purificação direta por afinidade.

2.5 Produção de proteínas recombinantes em alta densidade celular

De forma geral, a produção de proteínas recombinantes em cultivos aeróbios de alta densidade enfrenta três problemas: inibição pelo substrato, inibição por subprodutos metabólicos e instabilidade das condições de transporte de oxigênio, principalmente quando a alimentação é de ar enriquecido (ou O_2 puro).

A inibição por substrato é comumente contornada com a operação em batelada alimentada, mas a definição do perfil de alimentação e, eventualmente, de aeração, é determinante para evitar o acúmulo de produtos de metabolismo indesejados. Busca-se evitar sua formação e/ou consumi-los após a indução, quando possível, como estratégia de processo

Uma estratégia clássica para esse tipo de processo é manter a velocidade específica de crescimento abaixo de um valor crítico, minimizando-se a formação de metabólitos não desejados (LEE, 1996; GOMBERT; KILIKIAN, 1998; REISENBERG; GUTHKE 1999; SUÁREZ; KILIKIAN, 2000; FAULKNER et al, 2006). Com isso, a operação do biorreator é normalmente dividida em três fases: cultivo descontínuo; alimentação controlada do substrato limitante (em geral a fonte de carbono); indução da síntese da proteína recombinante.

A definição do caminho ótimo de alimentação de meio suplementar e, eventualmente, da aeração, tal que conduza o cultivo a elevadas massas celulares, evitando-se inibição pelos metabólitos secundários, torna-se assim vital para se obterem elevados níveis de expressão da enzima recombinante. A teoria de controle ótimo pode ser empregada para definir a parametrização das trajetórias das variáveis de controle (vazão/composição de meio suplementar e, eventualmente, de aeração). O funcional (função-objetivo, custo) a ser maximizado é, em geral, produtividade, massa celular e/ou da proteína desejada, dentre outros

A literatura descreve alguns cultivos de *B. megaterium* recombinante. Yoon et al, (1994) reportaram que a produção de carboxi-metil celulase por *B. megaterium* recombinante crescendo em glicose foi fortemente inibida por propionato e isobutirato. Hollman e Deckwer, (2004), utilizando alimentação exponencial de forma a sustentar velocidades específicas de crescimento entre 0,10 e 0,15 h⁻¹, para minimizar o acúmulo de piruvato e outros metabólitos, chegaram a 80 g/L de massa seca. Malten et al, (2005), apresentaram cultivos de *B. megaterium* em meio semi-definido (com glicose como fonte de carbono) para produção de dextranasacarase heteróloga e obtiveram resultados acima de 80 g/L de massa seca. Yang et al, (2006), já enfocando a produção de PGA recombinante, apresentam resultados com meio mínimo, empregando aminoácidos definidos, obtendo produtividades de PGA acima de 40 mg /L de meio de crescimento.

Para a definição da melhor estratégia de alimentação na obtenção de altas densidades celulares, torna-se importante um melhor entendimento do metabolismo do microrganismo, assunto que enfocaremos a seguir.

2.6 Metabolismo celular

Para manterem-se vivos e desempenharem diversas funções biológicas, os organismos necessitam continuamente de energia. De fato, qualquer organismo vivo constitui, no seu conjunto, um sistema estável de reações químicas e de processos físico-químicos mantidos afastados do equilíbrio. A manutenção deste estado contraria a tendência termodinâmica natural de atingir o equilíbrio e só pode ser conseguida a custa de energia, retirada do meio ambiente. Como, por outro lado, os organismos também perdem energia para o meio ambiente, sua estabilidade deve ser vista como um processo dinâmico (MARZZOCO, 2007).

Assim, o metabolismo é o conjunto de transformações que as substâncias químicas sofrem no interior dos organismos vivos. As enzimas regulam as vias metabólicas em resposta a mudanças no ambiente celular ou a sinais de outras células. O metabolismo é normalmente dividido em dois grupos: anabolismo e catabolismo, conforme mostrado na figura 2.8.

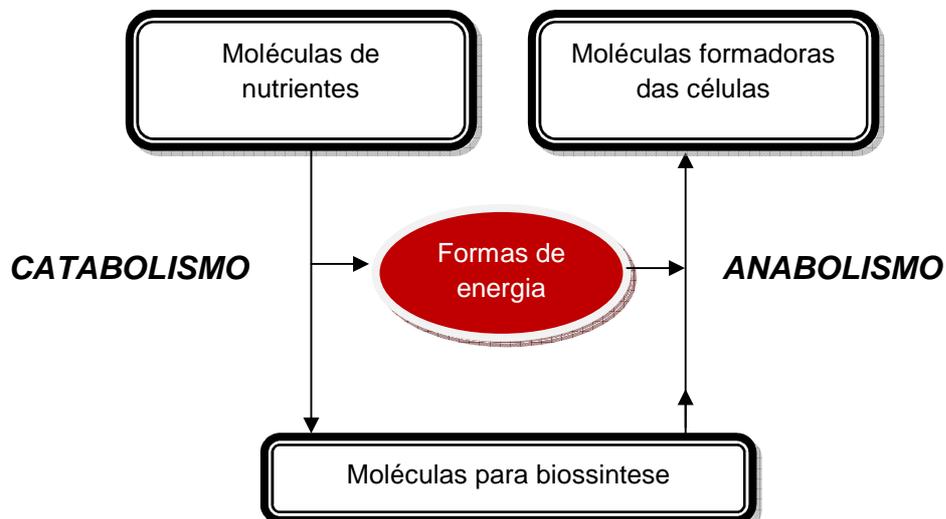


Figura 2.8. Vias Metabólicas: Catabolismo e Anabolismo.

O catabolismo é a fase degradativa do metabolismo e é acompanhado pela liberação da energia livre inerente à estrutura complexa das grandes moléculas orgânicas, a qual é conservada principalmente na forma da molécula transportadora de energia adenosina trifosfato (ATP). Alguma energia também pode ser

conservada na forma de átomos de hidrogênio ricos em energia transportados pela coenzima nicotinamida adenosina dinucleotídeo fosfato em sua forma reduzida NADPH.

No anabolismo, a fase construtiva do metabolismo; as pequenas moléculas precursoras, ou unidades fundamentais, são reunidas para formar as grandes macromoléculas componentes das células, como as proteínas e os ácidos nucléicos, com consumo da energia armazenada na célula.

Pode-se tratar o metabolismo como sendo uma rede de reações catalisadas enzimaticamente. Quando o fluxo de nutrientes através de uma parte dessa rede é perturbado ou diminuído, o sistema todo sofre mudanças para contrabalançar, ou compensar, a mudança inicial (LEHNINGER, 2002).

Em *Bacillus megaterium*, a glicólise, a via das pentoses fosfato e o ciclo de Krebs são as principais vias do metabolismo central do carbono. O catabolismo de carboidratos pela via da glicólise e a das pentoses fosfato conduz aos metabólitos intermediários fosfoenolpiruvato, piruvato e acetil-CoA. Além disso, as reações do ciclo de Krebs são muito importantes na oxidação completa do acetil-CoA para CO₂, formando diretamente ATP e também NADH, que será utilizado nos processos respiratórios para a geração de ATP adicional (HOLLMAN, et al, 2004; FURCH et al, 2006).

A tabela 2.4 apresenta dados experimentais da velocidade específica de crescimento, fator de conversão de substrato e velocidade de produção de ácido acético para diferentes espécies de *Bacillus* cultivados em um meio mínimo, com glicose como fonte de carbono.

Tabela 2.4. Parâmetros fisiológicos do cultivo de diferentes linhagens de *Bacillus*, na presença de glicose (Tannler et al, 2008).

Linhagem	Vel. específica h ⁻¹	Rendimento g _{C_{el.seca}} /g _{glicose}	Consumo de glicose mmol g ⁻¹ h ⁻¹	Vel. produção Acetato mmol g ⁻¹ h ⁻¹
<i>B. subtilis</i> selvagem	0,67 ±2,0×10 ⁻²	0,44±3,0×10 ⁻²	8,71±6,4×10 ⁻¹	4,28±2,9×10 ⁻¹
<i>B. subtilis</i> spo0A	0,71 ±3,0×10	0,33±2,0×10 ⁻²	11,30±1,4×10 ⁻¹	7,02±2,1×10 ⁻¹
<i>B. subtilis</i> sigE	0,67 ±1,0×10	0,48±6,0×10 ⁻²	7,90±7,4×10 ⁻¹	3,60±8,0×10 ⁻²
<i>B. amyloliquefaciens</i>	0,32 ±1,0×10	0,23±2,0×10 ⁻²	6,05±2,4×10 ⁻¹	n/a
<i>B. licheniformis</i> T218a	0,37 ±2,0×10	0,44±1,0×10 ⁻²	4,63±2,4×10 ⁻¹	3,03±2,0×10 ⁻¹
<i>B. licheniformis</i> T380B	0,49 ±2,0×10	0,41±3,0×10 ⁻²	6,67±3,1×10 ⁻¹	4,17±9,4×10 ⁻¹
<i>B. pumilus</i>	0,28 ±2,0×10	0,33±4,0×10 ⁻²	4,17±3,3×10 ⁻¹	1,40±6,0×10 ⁻¹
<i>B. subtilis</i> natto	0,69 ±2,0×10	0,35±5,0×10 ⁻²	10,83±2,0×10 ⁻¹	9,60±1,10

Esses autores também apresentam alguns valores experimentais de coeficientes de manutenção para algumas linhagens. Destaca-se o valor apresentado por *B. subtilis*, que apresenta um alto requerimento energético para sua manutenção. Esse é um dado importante para processos de produção em grande escala, tal como ocorre na produção de penicilina, no qual acima de 70% da fonte de carbono é usada para manutenção. Da mesma forma, durante o processo de produção de riboflavina com a linhagem RB50::pRF69, a manutenção demanda 45% de glicose que é consumida. É por esta razão que as exigências para obter sucesso nos processos biotecnológicos usando microrganismos hospedeiros são diversas e dependem em grande parte do produto de interesse (Tannler et al, 2008).

2.6.1 Glicólise

A glicose ocupa uma posição central no metabolismo, sendo energeticamente muito importante para os microorganismos, já que em sua oxidação completa até dióxido de carbono e água ocorre uma variação de energia livre padrão de - 2.480 kJ/mol. A glicólise é processo biológico no qual uma molécula de glicose é degradada para liberar duas moléculas de piruvato, contendo cada uma

delas três átomos de carbono. Durante as reações seqüenciais da glicólise, parte da energia livre liberada da glicose é conservada na forma de ATP e de NADH.

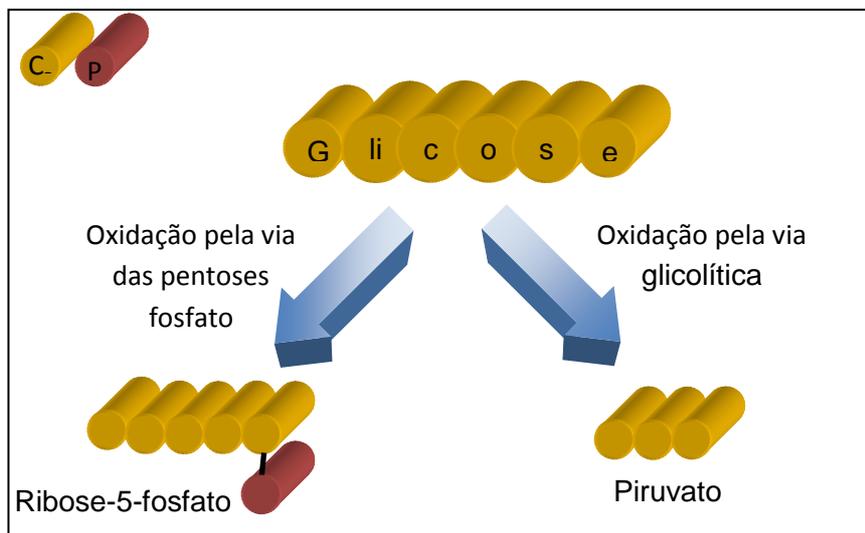


Figura 2.9. As vias principais de utilização da glicose nas células

Nos microrganismos aeróbicos, a glicólise é apenas o primeiro estágio da degradação aeróbica completa da glicose a CO_2 e H_2O . Assim, o piruvato gerado é oxidado, com perda de seu grupo carboxila na forma de CO_2 , formando o grupo acetil da acetil-CoA. A figura 2.10 ilustra a primeira fase da glicólise, a qual consome ATP para desestabilização da molécula da glicose, que é fosforilada, isomerizada e novamente fosforilada, para ser então clivada formando duas moléculas de D-gliceraldeído-3-fosfato.

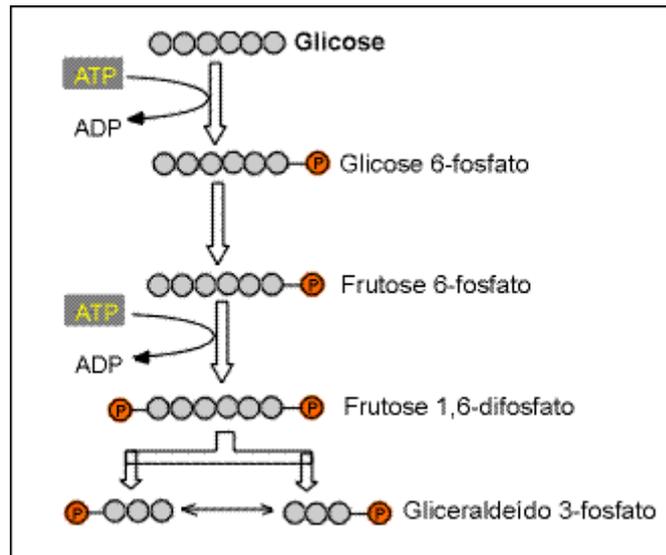


Figura 2.10. Primeiro estágio da glicólise.
 (<http://www.livronline.com/servicos/gratuitos/mb1504/imagens/c810.gif>)

No segundo estágio da glicólise, etapa produtora de energia, gliceraldeído-3-fosfato é oxidado pelo NAD^+ , com entrada de fosfato-inorgânico, pela ação da gliceraldeído-fosfato-desidrogenase, formando o ácido 1,3-disfosfoglicérico. Este último doa seu grupo acilfosfato ao ADP, formando ATP e ácido 3-fosfoglicérico, que é, logo, transformado para o ácido 2-fosfoglicérico. Após a desidratação deste último pela enolase, o ácido fosfoenolpirúvico formado cede seu grupo fosfato ao ADP dando finalmente origem ao ácido pirúvico ou piruvato.

Duas moléculas de ATP são consumidas no primeiro estágio da glicólise e quatro são formadas a partir de ADP no segundo estágio, dando uma produção efetiva de dois ATP a partir de uma molécula de glicose. Também, dois pares de hidrogênio altamente carregados de energia são gerados e entregues ao NAD, formando $\text{NADH} + \text{H}^+$. Uma vez que o número de moléculas de NAD^+ existentes na célula é limitado os hidrogênios deverão ser transferidos para outra molécula de modo a liberar as moléculas de NAD^+ . Na figura 2.11 ilustra-se o segundo estágio da glicólise, partindo desde o Gliceraldeído-3-fosfato e chegando até o piruvato (LEHNINGER, 2002).

O piruvato é uma encruzilhada no metabolismo, pois a rota que ele vai seguir irá depender do destino que a célula poderá dar aos hidrogênios provisoriamente entregues ao NAD^+ . Se houver disponibilidade de oxigênio, os hidrogênios serão entregues à cadeia de enzima da fosforilação oxidativa, que utilizarão a energia livre dos hidrogênios para formação de ATP (03 ATPs a cada

par de hidrogênios que percorre a cadeia completa de enzimas) com os hidrogênios sendo entregues ao final para o oxigênio, formando água. Na ausência de oxigênio, a célula possui alguns caminhos alternativos para sobreviver, em função de possuir uma ou mais enzimas capazes de transferir os hidrogênios do NAD^+ para outras moléculas. Por exemplo, a enzima lactato desidrogenase catalisa a transferência dos hidrogênios do NADH para o próprio piruvato, formando lactato, numa rota conhecida como fermentação láctica. O microrganismo passa assim a sobreviver produzindo apenas duas moléculas de ATP por molécula de glicose e secretando o ácido láctico formado. Nesse caso, há um grande aumento na velocidade de consumo da glicose, comparativamente ao observado na rota aeróbia, para que seja possível a quantidade de ATP necessária para manutenção dos processos vitais, já que 38 ATPs por molécula de glicose podem ser produzidas na presença de oxigênio. Da mesma forma, na presença de desidrogenase alcoólica, piruvato é descarboxilado a acetaldeído, que recebe o par de hidrogênios do $\text{NADH} + \text{H}^+$, gerando etanol, a conhecida fermentação alcoólica (LEHNINGER, 2002).

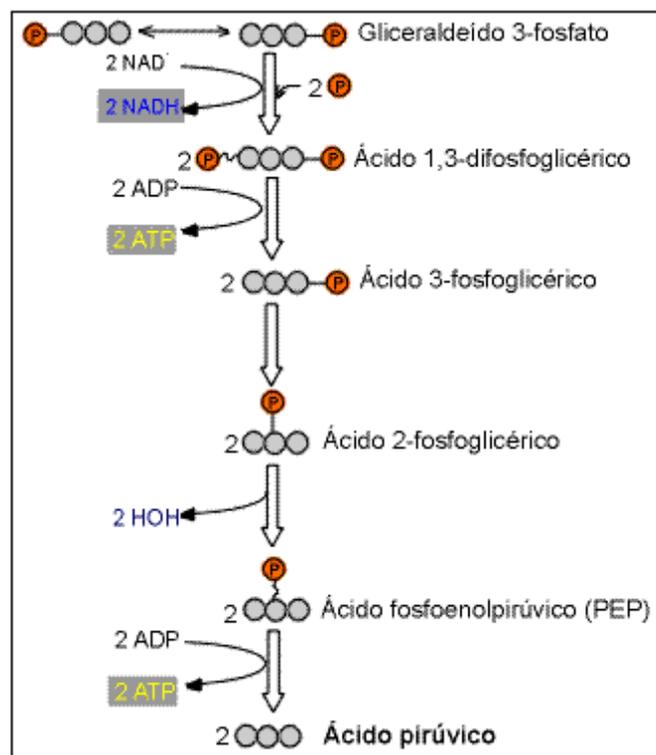


Figura 2.11. Segundo estágio da glicólise.

(<http://www.livronline.com/servicos/gratuitos/mb1504/imagens/c810.gif>)

2.6.2 Ciclo de Krebs

O ciclo de Krebs ou ciclo dos ácidos tricarboxílicos é uma seqüência cíclica de reações, de ocorrência quase total nos organismos aeróbicos. Antes de entrar nesse ciclo, o piruvato é descarboxilado, com o acetil produzido reagindo com a coenzima A, gerando Acetil-CoA, o verdadeiro substrato de entrada no ciclo. São produtos desse ciclo 2 moléculas de CO_2 , um par $\text{NADPH} + \text{H}^+$ e vários pares $\text{NADH} + \text{H}^+$, que irão também gerar ATPs através da fosforilação oxidativa. Assim a função principal do ciclo do ácido cítrico é produzir elétrons com alta energia, gerando CO_2 . Outra importante função desse ciclo é gerar intermediários para a síntese de componentes celulares. A Figura 2.12 ilustra o processo do ciclo de Krebs.

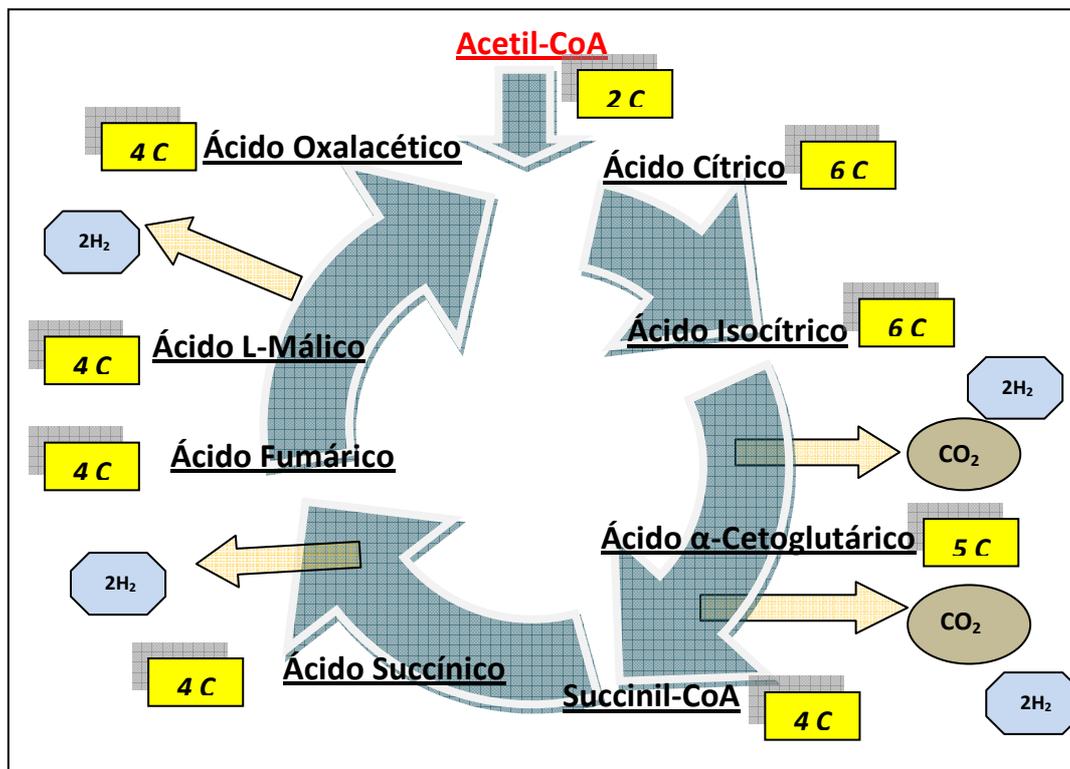


Figura 2.12. Ciclo do ácido tricarboxílico.

Devido aos mecanismos reguladores que a célula utiliza para controlar a velocidade do ciclo, pode ocorrer acúmulo no meio de cultivo dos ácidos do ciclo

de Krebs. Por exemplo, o isocitrato produzido é logo oxidado a α -cetogluturato e CO_2 pela isocitrato-desidrogenase ligada ao NAD, uma enzima alostérica que é ativada pelo ADP. O α -cetogluturato é oxidado a succinil-CoA, que depois reage com GDP e fosfato para formar succinato livre, sendo este succinato um dos metabólitos reportados na literatura (HOLLMANN; DECKWER, 2004; YANG et al, 2006) com uma alta produção no cultivo de uma linhagem de *B. megaterium*.

É importante ressaltar que a velocidade do ciclo do ácido cítrico é controlada pela quantidade de ATPs formados, ou seja, quanto mais ATPs formados menor a velocidade do ciclo e quanto menor a quantidade de ATPs formados maior a velocidade do ciclo.

2.6.3 Via das Pentoses Fosfato

A via das pentoses fosfato é uma via alternativa de oxidação de glicose, também chamada de rota anaplerótica, pois leva à produção de dois compostos importantes: ribose-5-fosfato e a forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), uma coenzima com estrutura semelhante à do NADH. A ribose-5-fosfato é a pentose constituinte dos nucleotídeos que compõem os ácidos nucléicos e da varias coenzimas (NAD^+ , NADP^+ , FAD, FMN, ATP, etc.) (MARZZOCO, 2007).

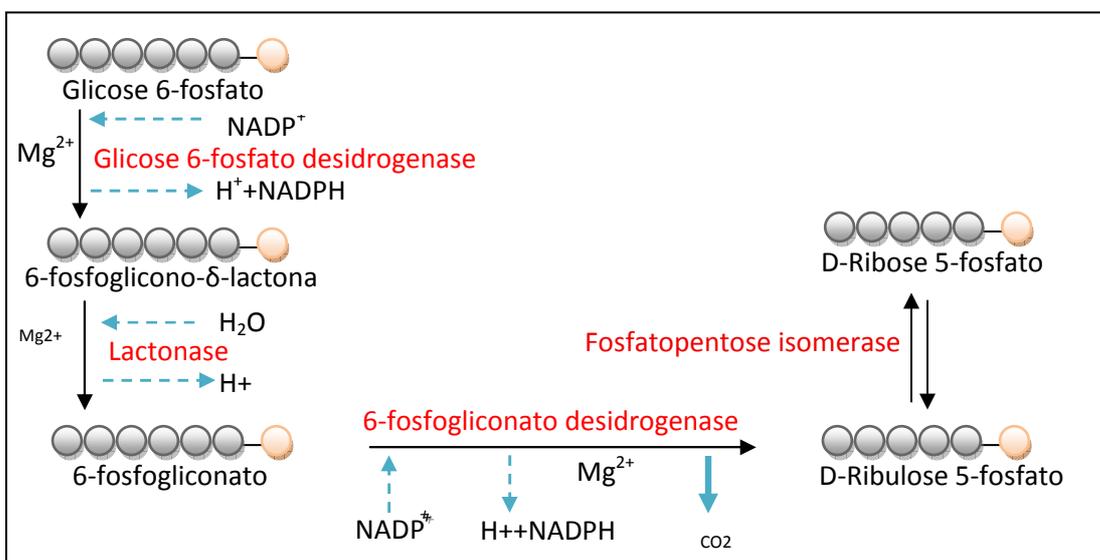


Figura 2.13. A via das pentoses fosfato.

A figura 2.13 ilustra a rota das pentoses-fosfato. Segundo estudos feitos por Furch, (2006, 2007) e Tannler, (2008), para diferentes linhagens de *Bacillus*, além dos intermediários mostrados na figura 13, também foram produzidos através dessa rota outros dois compostos intermediários, Eritrose 4-fosfato e Sedoheptulose 7-fosfato.

2.6.4 O Efeito Pasteur e o Efeito Crabtree

As relações mútuas entre a glicólise e a fosforilação oxidativa são refletidas nos efeitos Pasteur e *Crabtree*. O efeito Pasteur é a inibição da glicólise pela fosforilação oxidativa ou a inibição da fermentação pela adição de oxigênio. Este efeito ocorre na maioria dos tecidos. Já o efeito *Crabtree* é a inibição da fosforilação oxidativa que ocorre quando se estimula a glicólise. Este efeito é observado somente nos tipos de células com alta atividade glicolítica como as leveduras e as células tumorais (<http://www.medicinacomplementar.com.br/temaAgo04.asp>).

Em alguns casos nos quais há uma alta concentração de substrato facilmente utilizável como é o caso da glicose e na presença de oxigênio alguns microrganismos podem experimentar uma saturação das vias metabólicas da respiração, o que possibilita o catabolismo do açúcar via respiratória, e a célula passa a usar esta fonte de carbono por uma via metabólica alternativa, levando ao processo fermentativo (exemplo: produção de ETOH).

O ATP das células é derivado de duas fontes: glicólise e fosforilação oxidativa. A fosforilação oxidativa é característica dos organismos aeróbios e fabrica 17 vezes mais ATP por mol de glicose do que a glicólise anaeróbia. Essas duas vias promovem a fosforilação do ADP pelo fósforo inorgânico (Fi), para gerar ATP. A fosforilação oxidativa é regulada pela energia livre da hidrólise do ATP. Assim a fosforilação oxidativa aumenta se a relação ATP/ADP x Fi diminui e a fosforilação oxidativa diminui se a relação ATP/ADP x Fi aumenta.

As enzimas reguladoras da glicólise são ativadas pelo ADP, AMP e o F_i e inibida pelo ATP. Assim a glicólise aumenta se a relação $ATP/ADP \times F_i$, diminui e a glicólise diminui se a relação $ATP/ADP \times F_i$, aumenta. O papel do fósforo inorgânico (P_i) intracelular como variável independente pode ser assim entendido.

Então quando a concentração intracelular de F_i cai a níveis muito baixos (1 milimol) a utilização celular de ATP torna-se severamente inibida, aumentando o ATP disponível o que leva a um grande aumento da relação $ATP/ADP \times F_i$, por alteração no numerador e denominador, com a conseqüente inibição de ambas as vias produtoras de ATP, glicólise e fosforilação oxidativa.

Por outro lado, quando a concentração de F_i intracelular está elevada, ela estimula a velocidade de utilização do ATP. Quando o F_i intracelular é alto os níveis de ATP são baixos e coexistem com glicólise e fosforilação oxidativa elevados (<http://www.medicinacomplementar.com.br/temaAgo04.asp>).

Atualmente não se tem estudos na literatura especificando ou analisando efeito *crabtree* em *B. megaterium*. Já para bactérias como *E. Coli* existem alguns estudos. Mustea, 1966, estudou o efeito *crabtree* para algumas linhagens de *E. Coli* e outros microrganismos como *Proteus vulgaris*, *Micrococcus pyogenes*, entre outros, Mustea propos a seguinte equação para o calculo de %efeito *crabtree*:

$$\%Efeito\ Crabtree = (Q_{O_2}(\text{sem glicose}) - Q_{O_2}(\text{com glicose})) \times (Q_{O_2}(\text{sem glicose}))^{-1} \times 100$$

(1)

Esse autor também apresenta os valores de %Efeito *crabtree* para o cultivo de *E.Coli*, observando-se que o Maximo valor de %efeito *crabtree* ocorre no período inicial da face exponencial do crescimento, tal como mostrado na tabela 2.5.

Tabela 2.5. Taxa de consumo de oxigênio por *E. Coli* Bruxelles
(Mustea, 1966).

Incubação (h)	Consumo de Oxigênio em caldo ($\mu\text{LO}_2 / 100 \mu\text{g}$ microrganismos secos)		% Efeito Crabtree
	Sem glicose*	Com Glicose	
3	39,1	19,3	50,7
4	22,0	12,1	45,0
5	21,0	14,05	33,1

*Fonte de carbono (extrato de carne do meio de cultura)

Finalmente, segundo este estudo, o efeito *crabtree* foi positivo para algumas linhagens de *E. Coli* e *Proteus*, e negativo para outros microrganismos como *Micrococcus* e *Serratia*. Evidenciou-se assim que este processo está presente em algumas bactérias e não só em algumas leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae*.

Thierie et al, (2004) expõem em seu trabalho um possível efeito *crabtree* na produção de ácido láctico por flocos bacterianos (*E. coli*, *Lactobacillus plantarum*, *Clostridium novyi*, *Enterobacter agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Proteus vulgaris*), ao avaliar a mudança na concentração de oxigênio dissolvido no bioreator, após mudar o valor do μ_{set} . Foi observado que nos experimentos com taxas de diluição inferiores ao valor crítico de $0,3 \text{ h}^{-1}$, um pulso de substrato dentro de meio foi acompanhado de uma diminuição da concentração do oxigênio dissolvido, mas para valores maiores que $0,3$ esse fenômeno não aconteceu e a concentração do oxigênio dissolvido permaneceu constante, um comportamento típico de um metabolismo com respiração pela via fermentativa (efeito *crabtree*). Thiere argumenta que esse possível efeito pode ser causado pelas bactérias presentes no conjunto de flocos de bactérias, entre as quais se encontram a *E. Coli* com uma composição relativa que se encontra entre 40% e 50% do total das bactérias presentes. Assim, evidenciou-se que *E.coli* tem um metabolismo de respiração fermentativo, e produz ácidos orgânicos como produtos da fermentação.

Em estudos mais recentes (HOLLMANN; DECKWER, 2004; MALTEN et al, 2005a) durante o cultivo de uma linhagem de *B. megaterium* WH320

mantendo uma concentração de oxigênio dissolvido de 20% em um Biorreator de 2L, observaram que para concentrações de glicose acima de 5,0 g/L, havia formação de acetato simultânea ao início do crescimento. Após o início da alimentação, ao ocorrer acúmulo de glicose, que atingiu concentração maior que 5 g/L, observou-se aumento da produção do acetato, comportamento comum no caso de efeito *crabtree* positivo. Nesse mesmo estudo, Hollmann conseguiu controlar a produção de acetato, primeiro na batelada usando uma concentração inicial de glicose de 4,4 g/L (inferior a 5 g/L) e na fase de batelada alimentada, com uso de $\mu_{\text{set}} = 0,12 \text{ h}^{-1}$. Sob essas condições o cultivo não apresentou concentrações maiores que 1 g/L de acetato, atingindo-se uma concentração celular máxima de 80 g/L.

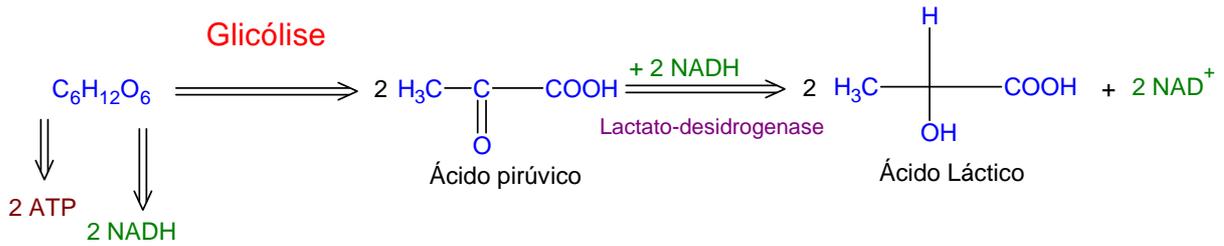
Os estudos de Yang et al, (2006), também apresentam produção de acetato bem associada ao crescimento durante o cultivo do *B. megaterium* WH323, usando uma concentração inicial de glicose de 30 g/L durante a batelada, e $\mu_{\text{set}} = 0,14 \text{ h}^{-1}$ na batelada alimentada.

Estes são alguns exemplos do possível efeito *crabtree* em cultivos de *B. megaterium* usando a glicose como fonte de carbono.

2.6.5 Produção de Ácido Láctico

O ácido láctico é um subproduto do metabolismo anaeróbio. Este processo é utilizado por bactérias (e, também, por células de tecido muscular) para obter energia através da oxidação incompleta da glicose, sem usar oxigênio livre.

Bactérias estritamente anaeróbicas que têm essa rota catabólica são, por exemplo, os lactobacilos, utilizados na produção de iogurte por fermentação láctica (figura 2.14).



Fermentação Láctica

Figura 2.14. Fermentação Láctica.

Após a glicólise, a redução do piruvato é catalisada pela enzima lactato-desidrogenase. O equilíbrio global dessa reação favorece fortemente a formação de lactato. Microrganismos fermentadores regeneram continuamente o NAD^+ pela transferência dos elétrons do NADH para formar um produto final reduzido, como o é o lactato.

Vasala, (2005), reporta produção de ácido láctico em altas concentrações (> 60 g/L) com *Bacillus megaterium* e usando soro de queijo no meio de cultivo.

2.7 Modelo matemático

2.7.1 Modelo matemático de crescimento

Neste trabalho, é proposto um modelo preliminar para a descrição do processo de crescimento de *B. megaterium* PV 361, não estruturado e não segredado, composto por um conjunto de equações diferenciais ordinárias não lineares, de primeira ordem. Para tanto, parte-se do enfoque proposto por Rocha, (2003), seguindo a formulação de Nielsen et al, (2003), levando em conta os ensaios de validação, em biorreator, que foram realizados. Os parâmetros do modelo serão estimados, ao longo deste trabalho, utilizando esses resultados experimentais de cultivos.

A figura 2.15 mostra um esquema do biorreator, com as vazões mássicas usadas nos diferentes balanços de massa.

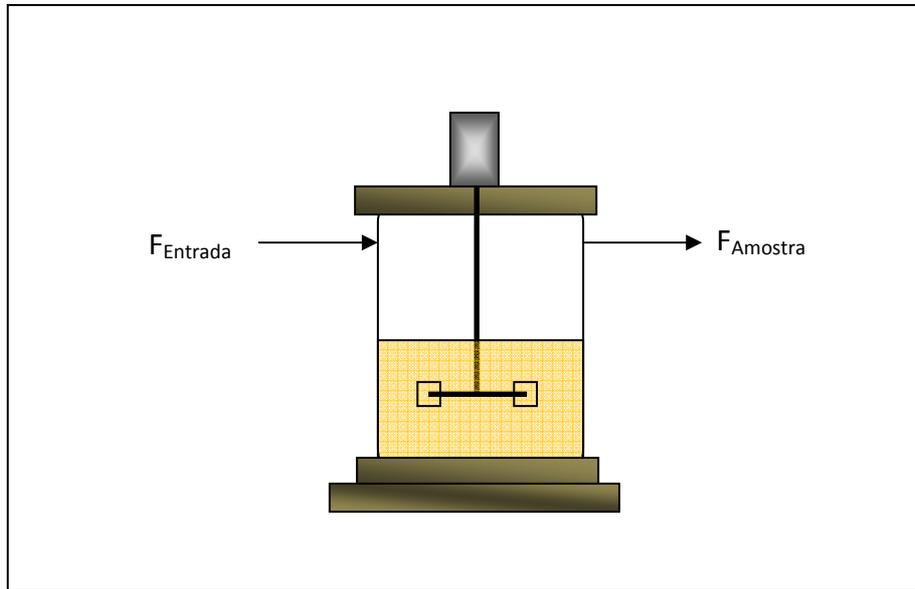


Figura 2.15. Esquema de um biorreator operando em batelada alimentada.

Foram consideradas as hipóteses: a densidade dos líquidos é constante e não varia com a temperatura. Além disso a quantidade de base e ácido adicionada ao meio para controle de pH, junto com os vapores, foram considerados não significativos. Só foi considerado o fluxo de entrada de alimentação ($F_{Entrada}$) e a retirada de amostra denotada por $F_{Amostra}$. Assim temos a seguinte equação para o balanço de massa:

$$\frac{dM}{dt} = F_{Entrada} - F_{Amostra} = F_{Total} \quad (2)$$

As cinéticas de crescimento foram definidas usando a equação de Monod (3), sem termos de inibição.

$$\mu = \frac{\mu_{max} C_S}{K_S + C_S} \quad (3)$$

Assim o modelo matemático não estruturado proposto baseado no balanço de massa do processo (Equações 4 a 6), as rotas metabólicas consideradas para o crescimento de *B. megaterium*, assumindo implicitamente que

os demais nutrientes presentes no preparo do meio de cultivo, com exceção de glicose, não são limitantes estão descritas a seguir:

$$\frac{dC_X}{dt} = \left(\mu - k_D - \frac{F}{V} \right) \cdot C_X \quad (4)$$

$$\frac{dC_S}{dt} = \left(\frac{F}{V} \right) \cdot (C_{SF} - C_S) - \left(\frac{1}{Y_{X/S}} + \frac{\alpha}{Y_{P/S}} \right) \cdot \mu \cdot C_X \quad (5)$$

$$\frac{dC_P}{dt} = (\alpha \cdot \mu + \beta) \cdot C_X - \frac{F}{V} \cdot C_P \quad (6)$$

As cinéticas de crescimento também foram definidas usando as equação de Monod(3), mas adicionado o termo de inibição.

$$\mu = \left(\frac{\mu_{\max} C_S}{K_S + C_S} \right) \cdot \left(1 - \frac{C_P}{K_i} \right) \quad (7)$$

$$\mu = \left(\frac{\mu_{\max} C_S}{K_S + C_S + \frac{K_S}{K_i} C_P^2} \right) \quad (8)$$

$$\mu = \left(\frac{\mu_{\max} C_S}{K_S + C_S} \right) \cdot \left(\frac{K_i}{K_i + C_P} \right) \quad (9)$$

Outra equação para a expressão cinética é a proposta por Andrews-Levenspiel (SHULER; KARGI, 2002) com inibição mista pelo substrato e produto (Equação 10)

$$\mu = \left(\frac{\mu_{\max} C_S}{K_S + C_S + \frac{C_S^2}{K_i}} \right) \cdot \left(1 - \frac{C_P}{C_P^*} \right)^n \quad (10)$$

Onde,

μ (h^{-1}): velocidade específica de crescimento;

μ_{max} (h^{-1}): velocidade específica máxima de crescimento;

C_S (g/L): concentração de substrato;

C_P (g/L): concentração de produto;

C_X (g/L): concentração celular;

V (L): volume de trabalho do biorreator;

F (L/h): vazão de alimentação;

C_{SF} (g/L): concentração de glicose no meio suplementar;

α ($g_{lactato}/g_{células}$): coeficiente pseudo-estequiométrico para formação de lactato associada ao crescimento;

$Y_{X/S}$ ($g_{células}/g_{glicose}$): fator de conversão de substrato em células;

$Y_{P/S}$ ($g_{lactato}/g_{glicose}$): fator de conversão de substrato em lactato;

K_D (h^{-1}): coeficiente de morte celular;

K_S (g/L): constante de saturação;

K_I (g/L): constante de inibição pelo substrato;

C_{p^*} (g/L): concentração crítica de produto para efeito de inibição pelo produto;

n : parâmetro do modelo de Levenspiel com inibição pelo produto.

2.7.2 Otimização dinâmica de cultivos de alta densidade celular

Para definição de perfis otimizados de alimentação de meio suplementar, pode-se lançar mão de tentativas simples, parametrizando o controle (vazão de meio) em funções-degrau (FAULKNER et al, 2006) solução prosaica,

mas factível. Outra possibilidade é aplicar a teoria clássica de controle ótimo e controle singular, em malha aberta (STIGTER; KEESMAN, 2004; SHIN; LIM, 2007). Uma dificuldade nessas abordagens é sua dependência da acuidade das previsões de modelos não-estruturados de crescimento microbiano/produção: para sistemas biológicos, são freqüentes as discrepâncias modelo-(experimentos de validação). Desvios sistemáticos dos modelos cinéticos aparecem em função de alterações no preparo do inóculo, ruídos e falhas nos sistemas de automação do biorreator e, até mesmo, devido a mudanças nos lotes de insumos (macro e micro-nutrientes) empregados em diferentes cultivos, dentre outras causas. Alternativa para contornar essa dificuldade, ainda dentro do paradigma de controle ótimo, é recorrer a algoritmos de otimização em malha fechada (, COSTA et al, 1998; IYER; WUNSH, 2001; FRAHM et al, 2002; MAHADEVAN; DOYLE, 2003; SRINIVASAN; BONVIN, 2007).

Uma possibilidade para aplicações em malha fechada é utilizar enfoques híbridos, em que o modelo clássico do sistema é, ao menos em parte, substituído por modelos empíricos, baseados em diferentes técnicas: estatística multivariada (CHAN et al, 2003; CIMANDER; MANDENIUS, 2004); cadeias de Markov (SAUCEDO; KARIM, 1998); modelos *fuzzy*; redes neurais ou *neuro-fuzzy*. O estudo dessas técnicas de inteligência computacional, aplicadas ao controle e otimização em tempo real de bioprocessos, vem tendo expressivo crescimento na literatura. Revisões recentes abordando este tópico são: (KARIM et al, 2003; KOMIVES; PARKER, 2003; MANDENIUS, 2004; CHEN et al, 2004a; GALVANAUSKAS et al, 2004; ALFORD, 2006; GNOTH et al, 2008).

Schügerl, (2001), reporta vários trabalhos utilizando filtros de Kalman estendidos (técnica baseada em modelos; Bogaerts; Wouwer, (2004), lógica difusa (*fuzzy logic*, ASCENCIO et al, 2004), redes neurais (THIBAUT et al, 1990, apresentaram trabalho pioneiro nesse campo; GADKAT et al, 2005, usam redes adaptativas), algoritmos genéticos, etc., tanto para inferência direta de variáveis como para estimativa de parâmetros de modelos simplificados do sistema. Esse último enfoque combina, por exemplo, balanços de massa e redes neurais que fornecem o valor de velocidades de reação ou de parâmetros de expressões cinéticas simples, sempre supondo que o processo pode ser bem caracterizado por modelos simplificados, não-estruturados e não-segregados (IYER; WUNSCH, 2001; COSTA et al, 2002; KOMIVES; PARKER, 2003; GALVANAUSKAS et al, 2004;

CHEN et al, 2004b; WOUWER et al, 2004; ARAÚZO-BRAVO et al, 2004; ALFORD, 2006).

Essas técnicas vêm sendo estudadas há algum tempo no LaDABio (CRUZ et al, 2000; SILVA et al, 2001; GONÇALVES et al, 2002; SOUZA Jr et al, 2004; PINTO et al, 2005; NUCCI et al, 2007; GIORDANO et al, 2008; SILVA et al, 2008).

2.7.3 Ajuste de Parâmetros

Para se alcançar bons resultados em um cultivo microbiano, algumas estratégias de otimização do processo devem ser consideradas. Muitas das estratégias disponíveis são baseadas no uso de modelos matemáticos do crescimento celular. Os modelos quantificam a relação entre a velocidade específica de crescimento do microrganismo e a concentração de substrato limitante, além de relacionarem o consumo de substrato ao coeficiente de rendimento do produto (Yurt *et al.*, 2003).

Para a estimativa de parâmetros foi utilizado um método de busca heurística, chamado *simulated annealing* (SA), com este programa realizou-se a identificação do melhor conjunto de valores associados aos parâmetros que governaram os modelos matemáticos que representam o crescimento do *B. megaterium* PV 361 num meio de cultura específico.

2.7.3.1 Busca Heurística de Parâmetros que Otimizam um Modelo Determinístico Via *Simulated Annealing*

A simulação de processos biotecnológicos requer o conhecimento preciso dos parâmetros cinéticos que, em geral, são obtidos pelo ajuste de um conjunto de dados experimentais a uma equação de crescimento. Este ajuste dos dados ao modelo tem sido feito por métodos não lineares de estimativa de parâmetros. Dentre estes métodos, o algoritmo de Levenberg-Marquardt (LM) tem sido o mais utilizado. Este processo de ajuste é feito comparando os valores dos dados medidos experimentalmente aos valores calculados pelo modelo através de uma função objetivo (FO).

O algoritmo estocástico *Simulated Annealing* (SA) é um procedimento computacional de grandes potencialidades que garante a convergência global da função objetivo desde que um determinado número de iterações seja realizado. Em contrapartida, algoritmos determinísticos, tal como o Levenberg-Marquardt (LM), garantem a convergência da FO, porém podem se prender a mínimos locais (MOLES et al, 2003; MENDES; KELL, 1998). Uma alternativa para evitar esse problema, é iniciar o algoritmo inúmeras vezes, de forma aleatória, que é um procedimento muito adotado, porém questionável, uma vez que existe a probabilidade dos mesmos mínimos locais poderem ser encontrados várias vezes (MOLES et al, 2003).

O SA é iniciado com a escolha, pelo usuário, dos dados experimentais, dos parâmetros do modelo a serem ajustados e com a escolha da função objetivo. A partir disso, o algoritmo faz uma busca sobre o espaço de todos os possíveis valores de parâmetros do modelo, com o objetivo de encontrar o conjunto ótimo de valores dos parâmetros. A cada passo a função objetivo é recalculada. Assim uma nova solução durante a busca é aceita ou não, de acordo com o critério Metropolis, representado na equação (11) (CHAO et al, 2007).

$$P_{AB} = \min \left(1, e^{\left(\frac{(SA-SB)}{T} \right)} \right) \quad (11)$$

Onde P_{AB} é a probabilidade de aceitação da solução B em detrimento da solução A, e T é um valor que controla o mínimo de iterações realizadas. A diminuição controlada do valor da variável T tem a finalidade de garantir que o sistema não fique preso em mínimos locais (estado meta-estável), de forma que o estado estável (mínimo global) seja alcançado invariavelmente (CHAO et al, 2007).

Finalmente se o modelo matemático que descreve o processo for apropriado e o método de ajuste de parâmetros for bem sucedido, o resultado é um modelo cuja implementação computacional resulta em uma ferramenta capaz de simular novos experimentos. Uma outra forma de utilização da ferramenta é como

parte de um sistema supervisor, no qual a trajetória de uma ou mais variáveis é monitorada em tempo real durante os experimentos, permitindo a inferência dos valores das variáveis mais importantes, os quais são comparados com os previstos, viabilizando o diagnóstico do desempenho do processo (HORTA, 2008).

3. MATERIAL e MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. Microorganismo

Foram utilizadas três linhagens do *Bacillus megaterium*: *Bacillus megaterium* ATCC 14945, doado pela Fundação Tropical-Campinas/SP; *B. megaterium* PV361 e *B. megaterium* QMB1551, doados pela Profa. Patrícia S. Vary, Northern Illinois University.. A linhagem PV361 é uma variante da QMB1551, na qual os genes dos sete megaplasmídeos constitutivos foram excluídos. As 3 linhagens vem sendo conservadas através de repiques mensais em placas de Agar-nutriente.

Para *B. megaterium* ATCC 14945 o meio de preservação foi o LB “B” e para as outras duas linhagens o meio utilizado foi o SNB.

3.1.2. Meios de Crescimento celular

As composições dos meios de crescimento e produção utilizados neste trabalho estão apresentadas nas Tabelas 3.1, 3.2, 3.3 e 3.4. A tabela 3.1 apresenta as composições dos meios complexos utilizados para o crescimento do microorganismo.

Tabela 3.1. Composição de Meios complexos para crescimento do Microorganismo

NUTRIENTE	Concentração no Meio (g/L)	
	LB “A”	LB “B”
Extrato de levedura ¹	5,0	15,0
Glicose ²	10,0	10,0
Triptona ¹	10,0	-
NaCl ²	10,0	10,0

Provedores: ¹ Acumedia; ² Synth;

Para a elaboração das placas de agar (meio sólido) é utilizado o agar bacteriológico com uma concentração de 20 g/L.

A tabela 3.2 apresenta a composição do meio semi-sintético utilizado para o crescimento do microorganismo (HOLLMANN; DECKWER, 2004).

Tabela 3.2. Composição de Meio Semi- sintético.

NUTRIENTE	Concentração de Meio
Glicose ²	10,0 g/L
Extrato de levedura ¹	1,0 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0 g/L
KH ₂ PO ₄	1,0 g/L
MgSO ₄	0,3 g/L
Compostos traços	1,0 mL/L

Tabela 3.3. Composição de Meio Suplementar para o cultivo em meio Semi- sintético.

NUTRIENTE	Concentração de Meio
Glicose ²	500,0 g/L
Extrato de levedura ¹	1,0 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	100,0 g/L
KH ₂ PO ₄	25,0 g/L
MgSO ₄	0,3 g/L
Compostos traços	25,0 mL/L

Tabela 3.4. Composição da solução de compostos traços para o meio Semi-sintético

Compostos traços	Concentração (g/L)
MnCl ₂ ·4H ₂ O ²	40,0
CaCl ₂ ·2H ₂ O ²	53,0
FeSO ₄ ·7H ₂ O ²	2,5
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O ²	2,0
CoCl ₂ ·6H ₂ O ²	2,0

Provedores: ¹ Acumedia; ² Synth

O meio anteriormente descrito foi denominado semi-sintético devido à baixa concentração de extrato de levedura (1 g/L). A tabela 3.5 apresenta a composição do meio SNB, que foi desenvolvido pela Dr. Patricia Vary para o crescimento do *Bacillus megaterium* PV-361 (STEVESON, 1995).

Tabela 3.5. Composição do meio SNB

NUTRIENTE	Concentração	
	Solução A	Solução B
Glicose ²		10 g/L
Nutrient broth ¹	8,0 g/L	
SNB sais	8,0 mL/L	

Em todos os casos de preparação do meio de crescimento, a fonte de carbono foi esterilizada separadamente dos demais nutrientes. As condições de esterilização foram 121°C durante 20 min.

Para a obtenção de 1L do meio SNB, inicialmente se prepara a solução A, na qual são pesados 8,0 g de *Nutrient broth* e diluídos em água deionizada, após se adiciona 8 mL da solução de sais SNB e se completa até um volume total de 900 mL. A composição da solução de sais SNB é dada a seguir: 50mL 1mM FeSO₄², 100mL 10mM MnCl₂², 200mL 25%(w/v) KCl², 50mL 1mM MgSO₄².

Para a preparação da solução B, 10 g de glicose são diluídos em água deionizada, após se adiciona 10 mL de CaCl₂ 0,1M e finalmente se completa o volume ate 100 mL.

Esteriliza-se na autoclave separadamente e, após alcançada a temperatura do ambiente, misturam-se as soluções assepticamente.

3.1.3 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados foram:

- ♣ Câmara rotativa com controle de temperatura e agitação (“shaker”), marca New Brunswick Scientific.
- ♣ Reator tipo tanque agitado BR5L com capacidade para 5 litros (acoplado a um sistema de aquisição de dados e analisador de gases de saída, CO₂ e O₂).
- ♣ Bioreactor Applikon, The Netherlands, 2,0 L (acoplado a um sistema de aquisição de dados e analisador de gases de saída, CO₂ e O₂).
- ♣ Autoclaves, marca FABBE modelo 103, 2000W e 4000W.
- ♣ Estufa de secagem e esterilização marca FANEM 320 – SE e 315/9.
- ♣ Câmara de fluxo laminar marca VECO.
- ♣ Balanças analíticas marcas METTLER PB – 3002 e KERN 410.
- ♣ pHmetro marca GLI modelo PRO.
- ♣ Fogale Nanotechn, BM 300, Nîmes, France
- ♣ Espectrofotômetro marca PHARMACIA BIOTECH modelo Ultropec 2000
- ♣ Banho termostatizado, marca BROOKFIELD modelo EX – 200
- ♣ Bomba de vácuo marca FABBE modelo 341
- ♣ Centrífuga marca EPPENDORF modelo 5403.

Demais equipamentos e vidraçarias comuns de laboratório (dessecadores, tubos de ensaio, tubos de Follin-Wu, provetas, balões volumétricos, erlenmeyers, béqueres, pipetas, filtro microporoso, cubetas, tampões de algodão, buretas, conta-gotas).

3.1.4. Reagentes

Foram utilizados os seguintes reagentes e nutrientes no cultivo dos microrganismos:

- ♣ Glicose (Synth)
- ♣ Extrato de Levedura (Acumedia)
- ♣ Nutrient Broth (Acumedia)
- ♣ Sais Minerais (Synth)
- ♣ Soro de Queijo (Sigma)
- ♣ Triptona (Acumedia)

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Cultivo do Microrganismo em Shaker

3.2.1.1 Armazenamento em meio sólido

O método de armazenamento para os *Bacillus megaterium* que foram utilizados durante todos os experimentos foi o método de *slant*. Estudos feitos por Pinotti, 2003 mostraram que este método de armazenamento mantém o microrganismo estável até 2 anos quando é conservado em meio sólido em geladeira.

Para preparação da primeira placa para o início do armazenamento em meio sólido, se partiu de um criotubo (glicerol 20% v/v) contendo o microrganismo em forma de esporo, depois em uma placa de Petri estéril era adicionado 20 mL de meio de cultura LB Agar ou SNB Agar, para que o microrganismo se adaptasse ao

meio de crescimento no qual seria feito o experimento. Depois da adição do meio na placa o meio era resfriado a temperatura ambiente. Após a solidificação do meio agar, raspava-se o microrganismo do criotubo e espalhava-se sobre a placa de forma homogênea. As placas eram incubadas a 30°C durante dois dias. Após este tempo já com o microrganismo em forma vegetativa se realizou o mesmo procedimento para uma nova placa petri partindo da placa anterior, partir desta nova placa se iniciaram todos os experimentos. As placas petri que continham o microrganismo eram armazenadas na geladeira e eram repicadas em períodos de 2 meses partindo sempre de uma colônia isolada.

3.2.1.2 Preparação do inóculo

Com o auxílio de uma alça de platina estéril, adicionava-se uma colônia obtida a partir da placa de Petri a erlenmeyer de 500 mL contendo 50 mL de meio de crescimento. O inóculo era cultivado a 30°C e 250 rpm durante 12 h.

A seguir a figura 3.1 ilustra o esquema para a preparação do inóculo para cultivo em shaker e do pré-inóculo para o cultivo em biorreator.

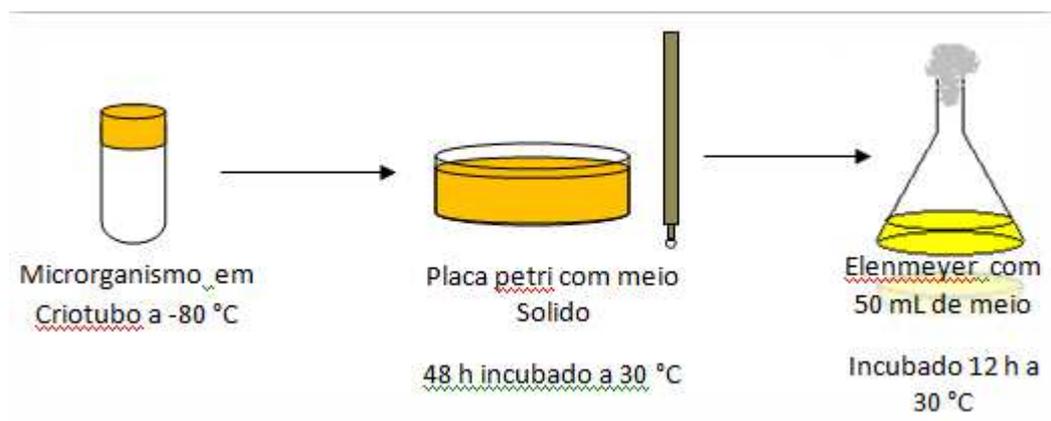


Figura 3.1. Esquema do procedimento utilizado para a preparação do inóculo para experimentos realizados em uma etapa em meio líquido

3.2.1.3. Cultivo em shaker

Após atingir 12 h de incubação, 10mL do inóculo era transferido para um frasco de 1000 mL contendo 90 mL do meio, e incubado em câmara rotativa a 30°C e 250 rpm. O meio partia com um pH inicial de 7,5, o qual era ajustado utilizando soluções de NaOH e HCl 1M (no meio complexo), e medido também ao final dos cultivos. A duração do cultivo em câmara rotativo era entre 12 a 14 horas.

3.2.2. Cultivo do Microrganismo em Biorreator de 2L (Produção de biomassa)

Os experimentos foram realizados em biorreator tipo tanque agitado, encamisado e aerado, com capacidade de 5L e 2L, conectado a um analisador de gases (Sick/Maihak S.710). Fluxômetros de massa (GFC AALBORG) foram empregados para analisar ar e oxigênio. O biorreator equipado com um sensor de capacitância Biomass system (FOGALE nanotech) encarregado de proporcionar on-line dados de viabilidade do microrganismo e de condutividade do meio. A agitação esteve entre 300 e 700 rpm e a vazão de entrada de ar ou ar enriquecido com O₂ entre 1 e 2 VVM. Agitação e aeração foram ajustadas ao longo dos cultivos para garantir que a concentração de O₂ dissolvido fosse mantida em 20% da saturação (eletrodo Metler Toledo, modelo CE, O2 4050). A temperatura foi mantida em 30°C. O controle de pH foi realizado pela adição de solução de 5M de NH₃OH e 1M de H₃PO₄. O conjunto experimental foi monitorado por um sistema que utilizava o ambiente LabView (National Instruments) (REIS, 2009).

3.2.2.1. Preparação do inóculo para cultivo em biorreator

O pré-inóculo foi preparado conforme descrito anteriormente para cultivo em *shaker*. Após 12 h de incubação, 10 mL de pré-inóculo eram transferidos

para dois frascos de 1000 mL (10mL para cada) contendo 90 mL do meio e incubados em câmara rotativa a 30°C e 250 rpm durante 12 h.

Após de 12 h de crescimento na câmara rotativa o inóculo era transferido para o biorreator por gravidade, o biorreator contendo um volume de 3,3 L de meio de crescimento que era transferido por uma bomba de alimentação.

3.2.2.2. Preparação do Cultivo em biorreator

Após esterilização do biorreator, do meio de cultivo e demais soluções, um volume de inóculo aproximado de 200 mL foi adicionado a 3,3 L de volume de meio inicial, dando início ao cultivo. Para cultivos em biorreator de 2L o volume inicial foi de 1,1 L com um inóculo aproximado de 63 mL. Utilizou-se um perfil de alimentação exponencial após a fase de batelada, para prolongar a fase exponencial de crescimento. Esse perfil de alimentação foi obtido por simulações realizadas previamente a partir de dados cinéticos de crescimento celular provenientes de ensaios em *shaker* (para o primeiro cultivo) e de cultivos posteriores em batelada. Amostras retiradas em intervalos definidos de tempo foram utilizadas para determinação da concentração celular. Após a centrifugação, o sobrenadante era utilizado para o acompanhamento do consumo dos nutrientes e da geração de produtos.

3.2.2.2.1 Cultivo em biorreator em meio complexo

Na primeira fase do processo, o reator contendo 3,3 L de meio LB "B", com 10 g/L de glicose como fonte de carbono, foi inoculado como explicado anteriormente. Assim a concentração de substrato atingia valores inferiores a 3 g/L,

após aproximadamente 6 h de cultivo em batelada, era dado início à batelada alimentada. O meio suplementar era composto por meio LB “B” contendo 300 g/L de glicose. A alimentação era feita até que fosse alcançado o volume de trabalho do reator (5L).

3.2.2.2. Cultivo em meio Semi-sintético

Com o objetivo de atingir alta densidade celular, se realizou uma reprodução do procedimento proposto por HOLLMAN; DECKWER, (2004). Aqui o reator era carregado com 3,3 L de meio semi- sintético, contendo 4,4 g/L de glicose como fonte de carbono. A fase de alimentação era iniciada assim que a concentração de substrato (glicose) atingia valores inferiores a 1 g/L. O pH era mantido em 5,2 com uma solução 5M de NaOH e 1M de H₃PO₄. O meio suplementar era composto por uma solução de 500g/L de glicose e demais nutrientes, conforme especificado na tabela 3.3.

Na figura 3.2 apresenta-se diagrama representativo das etapas experimentais envolvidas no cultivo em biorreator, desde a placa de Petri (meio sólido) até o experimento em biorreator.

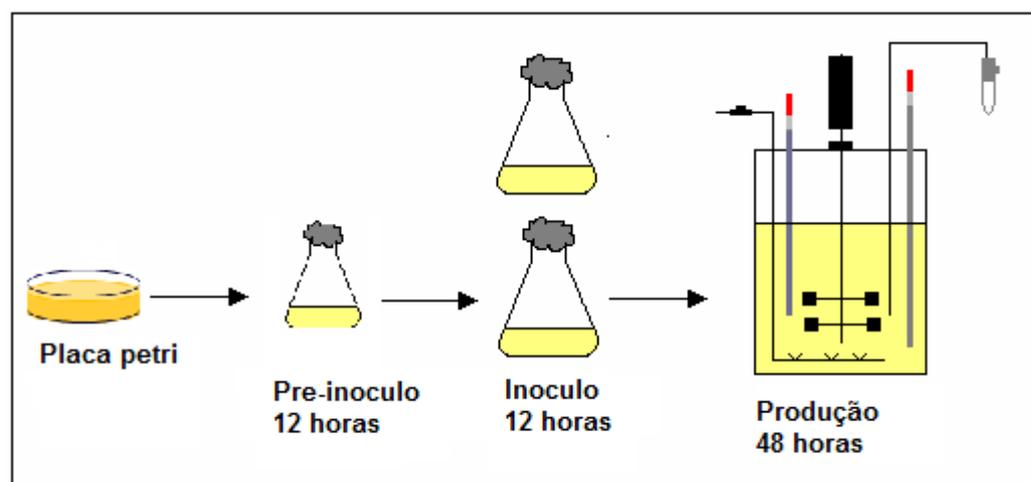


Figura 3.2. Esquemática da preparação do experimento para produção de massa celular em biorreator

3.2.3 Análises

Alíquotas de 2 mL do caldo de fermentação eram posteriormente retiradas em intervalos definidos de tempo e empregadas para medida da densidade ótica, e centrifugadas por 20 min a 11600g (11000 rpm) e 4°C. O sobrenadante era utilizado para a determinação do consumo dos nutrientes e do perfil dos metabólitos, conforme detalhado a seguir.

3.2.3.1 Massa Celular

As concentrações celulares eram determinadas pela medição da densidade ótica (DO), com um espectrofotômetro PHARMACIA BIOTECH modelo Ultrospec 2000, a 600 nm. O peso de biomassa seca era determinado por centrifugação de 2 ml de caldo de cultivo em uma centrífuga refrigerada EPPENDORF, modelo 5403, seguida por duas lavagens com água destilada do pellet obtido, re-suspensão do pellet em 1mL de água destilada e finalmente secagem em estufa a 60 °C durante 24h.

3.2.3.2 Análise das concentrações de carboidratos e de ácidos orgânicos

As concentrações de carboidratos e ácidos orgânicos foram medidas por cromatografia líquida de troca iônica utilizando a coluna Aminex HPX-87H, Bio-Rad, como fase estacionária, e solução de ácido sulfúrico 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 compostos foi realizada em detector UV a um comprimento de onda de 210 nm, e a dos carboidratos por índice de refração.

O consumo de glicose durante os experimentos foi também monitorado por análise enzimática usando o reagente GOD=PAP (Laborlab).

Os ácidos analisados durante todos os cultivos para as 3 linhagens foram: ácido láctico, ácido acético, ácido fórmico, ácido cítrico, ácido pirúvico, ácido succínico, ácido málico.

3.2.3.3. Aminoácidos

A concentração de aminoácidos foi determinada pelo sistema Pico-Tag, por cromatografia de fase reversa, utilizando derivatização pré-coluna para as 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.

3.2.4. Determinação de parâmetros cinéticos e outros cálculos

3.2.4.1 Velocidade de Produção de Dióxido de Carbono

A velocidade de produção de dióxido de carbono (CER) foi determinada através do método do balanço gasoso (Equação 12).

$$CER = \frac{Q}{22,4} \cdot \frac{Y_{CO_2}}{100} 60 \quad (12)$$

Onde:

Q : vazão de ar ou nitrogênio em L/min.

Y_{CO_2} : fração molar de dióxido de carbono (%)

V: Volume de caldo de cultivo (em L)

CER é a velocidade de produção de dióxido de carbono (mol.h^{-1})

Em nenhum dos cultivos em biorreator foi necessário o uso do O_2 puro para manter o O_2 dissolvido em 20%.

3.2.4.2. Determinação da velocidade específica máxima de crescimento celular

A velocidade específica de crescimento celular é definida por meio de um balanço de massa em reator em batelada representado pela Equação 13, conforme descrito em Bailey; Ollis (1986).

$$\frac{dCx}{dt} = \mu \cdot Cx \quad (13)$$

onde:

μ : velocidade específica de crescimento celular

Cx : concentração celular

Considerando a fase exponencial de crescimento celular, quando $\mu = \mu_{\max}$, determina-se o valor da velocidade específica máxima de crescimento integrando-se e rearranjando-se a Equação 13 para obter a Equação 14.

$$\ln\left(\frac{Cx}{Cx_0}\right) = \mu_{\max} \cdot t \quad (14)$$

onde:

Cx_0 : Concentração celular de microrganismo no tempo = 0, e t é o tempo de cultivo.

A Equação 14 é linear, e o valor de μ_{\max} pode ser obtido através do método dos mínimos quadrados.

3.2.4.3 Determinação do coeficiente de rendimento de substrato a células

Para o cálculo do rendimento de substrato a células ($Y_{x/s}$) foi utilizada a Equação 15 (BAILEY; OLLIS, 1986).

$$Cx - Cx_0 = Y_{x/s} \cdot (Cs_0 - Cs) \quad (15)$$

Onde:

Cs: Concentração de substrato

Cs₀: Concentração inicial de substrato

Com os valores de concentração celular e de glicose obtêm-se os valores de $Y_{x/s}$ através da regressão linear. Neste trabalho os cálculos para os $Y_{x/s}$ foram feitos de forma global, onde o Cs e Cx são as concentrações de substrato e células no final do cultivo para ensaios em *shaker*.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos serão apresentados em três itens:

No item 4.1 são apresentados os cultivos em *shaker* para cada um dos meios e microrganismos que foram avaliados durante este estudo.

No item 4.2 são apresentados os cultivos em biorreator para cada meio. Só foi cultivada a linhagem PV 361, pois esta linhagem é a mais indicada para a realização da clonagem.

No item 4.3 são apresentados os cálculos de parâmetros e simulações que foram realizadas para aplicação do controle ótimo para os cultivos em biorreator.

4.1 Cultivos em Shaker

Estes ensaios foram realizados com os meios de cultivo LB-A, LB-B, Semi-sintético, SNB e SNB com soro de queijo, a 30°C, com agitação de 250 rpm. O pH medido ao final de cada cultivo foi $7,0 \pm 5 \times 10^{-2}$ (desvio padrão de três ensaios). Para o meio semi-sintético o pH foi $5,2 \pm 1 \times 10^{-2}$.

4.1.1 Meios LB

Com o objetivo de atingir alta densidade celular se realizaram experimentos com as 3 linhagens de *Bacillus megaterium* avaliando inicialmente o efeito da triptona sobre o crescimento do microorganismo.

As Figuras 4.1 e 4.2 ilustram o comportamento dinâmico da concentração de células, concentração de glicose e de ácidos orgânicos produzidos ao longo do cultivo em meios A e B respectivamente para o *B. megaterium* ATCC 14945 .

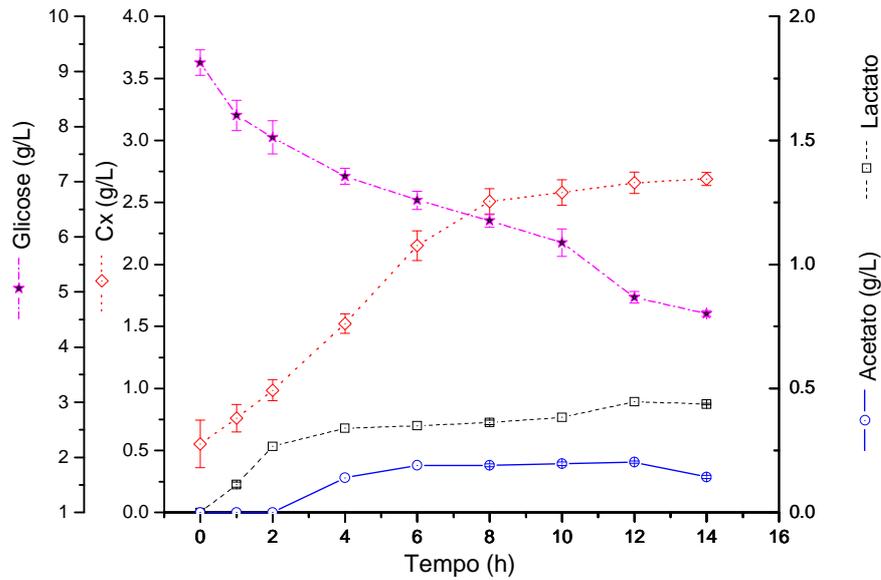


Figura 4.1. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de *Bacillus megaterium* ATCC utilizando meio LB “A”

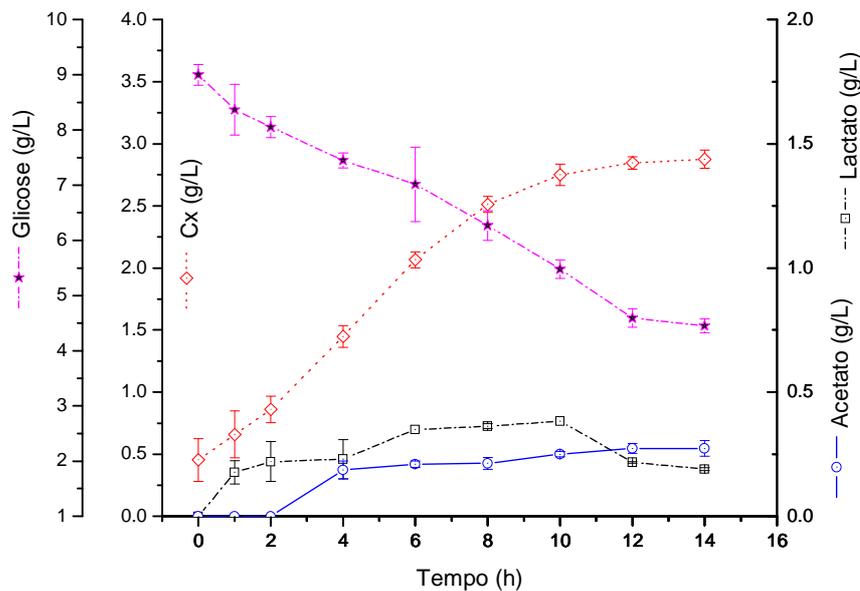


Figura 4.2. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de *Bacillus megaterium* ATCC utilizando meio LB “B” (sem tripton)

As Figuras 4.1 e 4.2 mostram que *B. megaterium* ATCC consumiu aproximadamente a mesma quantidade de glicose (4,5 g/L) com os dois meios, observando-se perfis similares para os dois meios, o que parece indicar que a

triptona não afeta significativamente o metabolismo do microorganismo. Ácido láctico e ácido acético foram os principais metabólitos produzidos. A produção destes metabólitos começa logo no início do ensaio. Pode-se observar uma tendência comum aos dois meios para as curvas de geração dos ácidos orgânicos, as quais, após atingir uma máxima concentração, mostram uma queda, o que indica que esses metabólitos são usados como fonte de carbono. Este comportamento é típico para a *E. coli*, bactéria que apresenta o efeito *crabtree* (*crabtree effect*) na presença de um excesso de glicose, (substrato em altas concentrações), seguido pelo consumo dos ácidos orgânicos (substratos não preferenciais) quando as concentrações de açúcar são baixas. O mesmo comportamento é evidente aqui para *B. megaterium*. Outra observação importante é que nenhuma rota de fermentação alcoólica foi observada para este microorganismo, pois todo excesso da glicose é direcionado para as vias de fermentação ácida.

Por outro lado, a velocidade específica máxima de crescimento (μ_{\max}) e o fator de conversão de glicose em células ($Y_{x/s}$) não apresentaram variações significativas, pois as diferenças entre os valores para os dois meios, se encontram dentro do erro, conforme mostrado na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Comparação de parâmetros de crescimento celular, produção de metabólitos e de alguns parâmetros cinéticos para cultivo de *B. megaterium* ATCC 14945 nos dois meios LB "A" e LB "B".

Microorganismo	<i>B. megaterium</i> ATCC 14945	
	A	B
Meio de cultura		
Cx_i / Cx_{\max} (g _{CEL.SECA} /L)	0,553 / 2.69±2.2×10 ⁻²	0,453 / 2.88 ±7.4×10 ⁻²
Concentração Max. de Acetato (g/L)	0.20 ±4.0×10 ⁻³	0.27±3.2×10 ⁻²
Concentração Max. de Lactato (g/L)	0.44±1.0×10 ⁻⁴	0.38 ±1.0×10 ⁻⁴
μ_{\max} (h ⁻¹)	0.23±1.1×10 ⁻²	0.26±2.0×10 ⁻²
$Y_{x/s}$	0.49±8.3×10 ⁻²	0.53±9.0×10 ⁻²

Contudo, as Figuras 4.3 e 4.4, que apresentam o crescimento da linhagem PV-361, indicam que essa linhagem tem clara preferência por extrato de levedura, atingindo valores maiores de concentração celular no meio B, 3,9 gcél.seca/L, com mais que o dobro do valor de velocidade específica de crescimento, $\mu_{\max B} = 0,42 \text{ h}^{-1}$, enquanto no meio A, atingiu 3,1gcél.seca/L, com

μ_{maxA} de $0,23\text{ h}^{-1}$. Essa linhagem crescendo no meio B parece, assim, ser a mais promissora das três estudadas para se atingir altas densidades celulares em cultivo em biorreator.

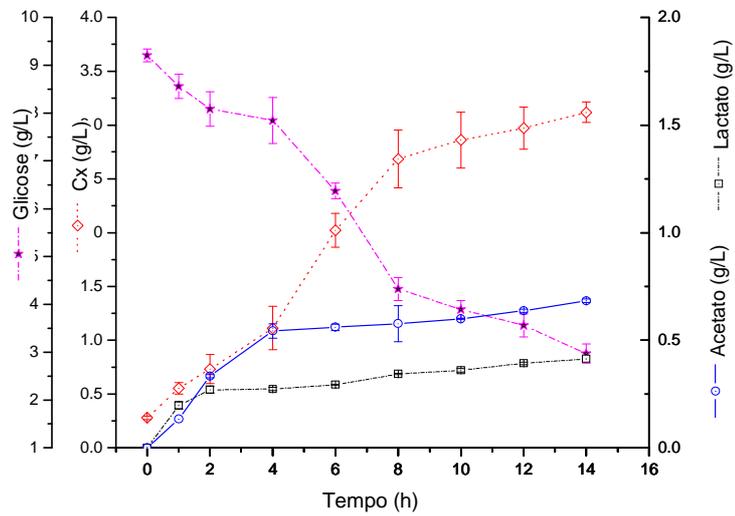


Figura 4.3. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de *Bacillus megaterium* PV-361 utilizando meio LB "A"

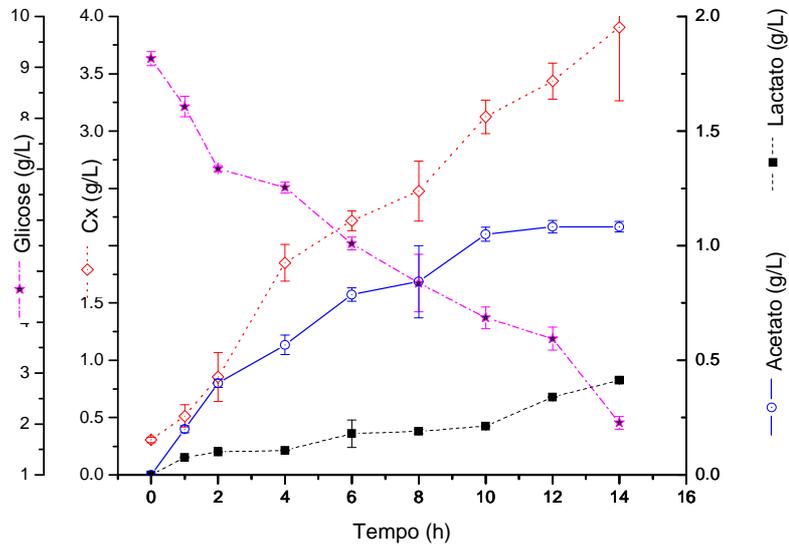


Figura 4.4. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de *Bacillus megaterium* PV-361 utilizando meio LB "B" (sem triptona).

A seguir a tabela 4.2 mostra os dados obtidos para a linhagem PV-361 para o meio A e o meio B.

Tabela 4.2. Comparação de crescimento, produção de metabólitos e cálculo de alguns parâmetros cinéticos para cultivo do *B. megaterium* PV 361 nos dois meios LB “A” e LB “B”.

Microorganismo	<i>B. megaterium</i> PV 361	
	A	B
Meio de cultura		
Cx_i / Cx_{max} (g _{CEL} .SECA/L)	10,279 / $3.11 \pm 9.4 \times 10^{-2}$	0,305 / $3.91 \pm 6.4 \times 10^{-1}$
Concentração Max. de Acetato (g/L)	$0.68 \pm 8.0 \times 10^{-2}$	$1.08 \pm 2.3 \times 10^{-2}$
Concentração Max. de Lactato (g/L)	$0.41 \pm 1.0 \times 10^{-4}$	$0.41 \pm 1.0 \times 10^{-2}$
μ_{max} (h ⁻¹)	$0.23 \pm 1.7 \times 10^{-2}$	$0.42 \pm 3.0 \times 10^{-2}$
$Y_{x/s}$	$0.46 \pm 4.2 \times 10^{-2}$	$0.50 \pm 9.1 \times 10^{-2}$

As figuras 4.3 e 4.4, que apresentam perfis para *B. megaterium* PV 361 (linhagem com os plasmídeos deletados), mostra uma forte preferência por maiores concentrações de extrato de levedura (meio B), o que pode ser devido à presença de maiores concentrações de aminoácidos nessa fonte de nitrogênio, ou a outros fatores de crescimento presentes no extrato de levedura, cuja concentração foi maior no meio B. A linhagem PV361 mostrou também uma produção de acetato maior para o meio B que a observada para o meio A. Observa-se também que a linhagem PV361, não apresenta consumo dos ácidos orgânicos que foram produzidos durante o crescimento, enquanto que para o consumo de glicose esta linhagem tem um maior consumo, pois atingiu uma concentração final de 3 g/L para o meio A e 2 g/L no meio B. Para os metabólitos observa-se que aumento nas concentrações dos dois ácidos segue associado ao crescimento do microrganismo e ao consumo de glicose. Este comportamento será confirmado em cultivos em biorreator usando batelada alimentada.

As figuras 4.6 e 4.7, onde se apresentam os perfis de cultivo em meios A e B para a linhagem QM, mostram que essa linhagem tem comportamento similar à linhagem PV nesses meios de crescimento.

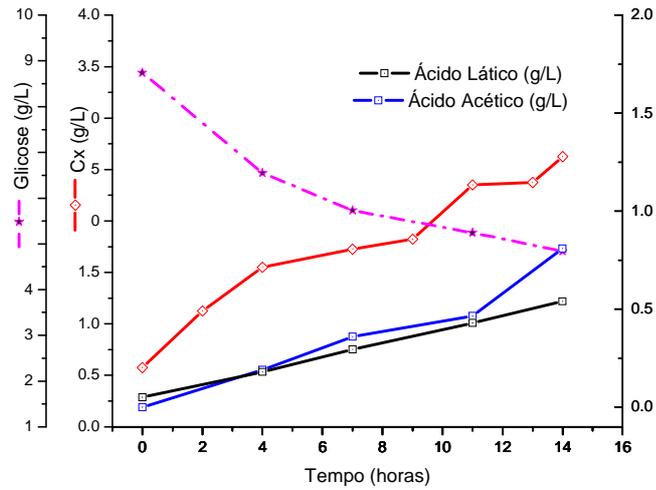


Figura 4.6. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de *B. megaterium* QM B1551 utilizando meio LB "A"

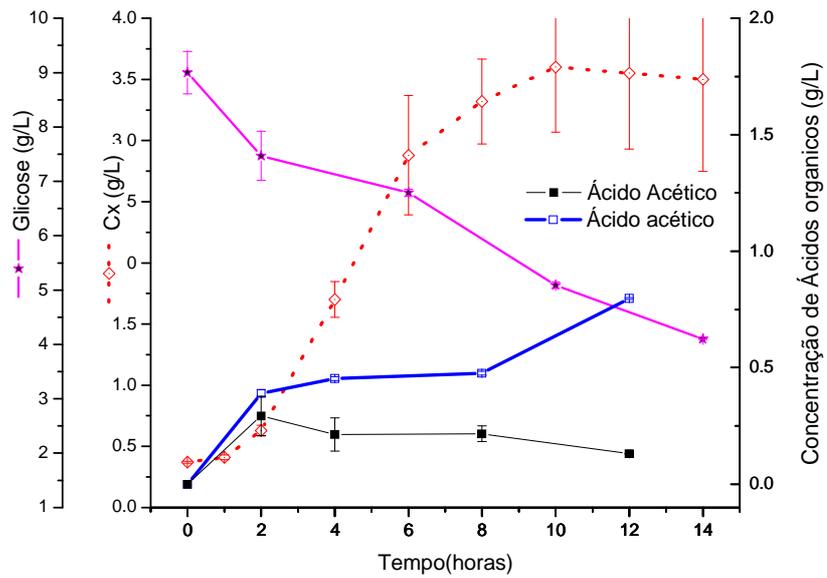


Figura 4.7. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de *B. megaterium* QM B1551 utilizando meio LB "B" (sem triptona)

A tabela 4.3 apresenta valores de parâmetros do cultivo para esta linhagem, nos dois meios LB.

Tabela 4.3. Comparação de crescimento, produção de metabólitos e cálculo de alguns parâmetros cinéticos para cultivo do *B. megaterium* PV 361 nos dois meios LB “A” e LB “B”.

Microorganismo	<i>B. megaterium</i> QMB 1551	<i>B. megaterium</i> QMB 1551
Meio de cultura	A*	B
Cx_{max} (g _{CEL} .SECA/L)	2,45 ⁽¹⁾ – 2,80 ⁽²⁾	3,60±5,3×10 ⁻¹
Concentração Max. de Acetato (g/L)	0,83 ⁽¹⁾ – 0,79 ⁽²⁾	0,80±4,3×10 ⁻³
Concentração Max. de Lactato (g/L)	0,48 ⁽¹⁾ – 0,60 ⁽²⁾	0,30 ±8,4×10 ⁻²
μ_{max} (h ⁻¹)	0,28 ⁽¹⁾ – 0,22 ⁽²⁾	0,48±1,7×10 ⁻²
$Y_{x/s}$	0,51 ⁽¹⁾ – 0,54 ⁽²⁾	0,64±2,1×10 ⁻¹

*Ensaio em duplicata; ⁽¹⁾ensaio 1; ⁽²⁾ensaio 2.

Analisando-se os valores mostrados na Tabela 4.3, pode-se observar que os parâmetros têm valores próximos para as linhagens PV e QM. Já para o consumo de glicose a linhagem PV apresentou um maior consumo que a linhagem QM, mas em geral os dois microrganismos não apresentaram diferenças significativas, o que permite concluir que a deleção dos plasmídeos da linhagem PV (que resultou na linhagem QM) não modificou o padrão metabólico da linhagem original.

4.1.2 Meio Semi-sintético (SS)

Visando minimizar a produção de metabólitos no meio de cultivo e ter um melhor controle sobre os nutrientes para o crescimento celular do microrganismo, decidiu-se testar o uso de um meio semi-definido. O meio utilizado neste trabalho foi desenvolvido por Hollmann, (2004).

Na figura 4.7 se ilustra o comportamento dinâmico da concentração celular, o consumo de glicose para o *B. megaterium* ATCC 14945, no meio semi-sintético.

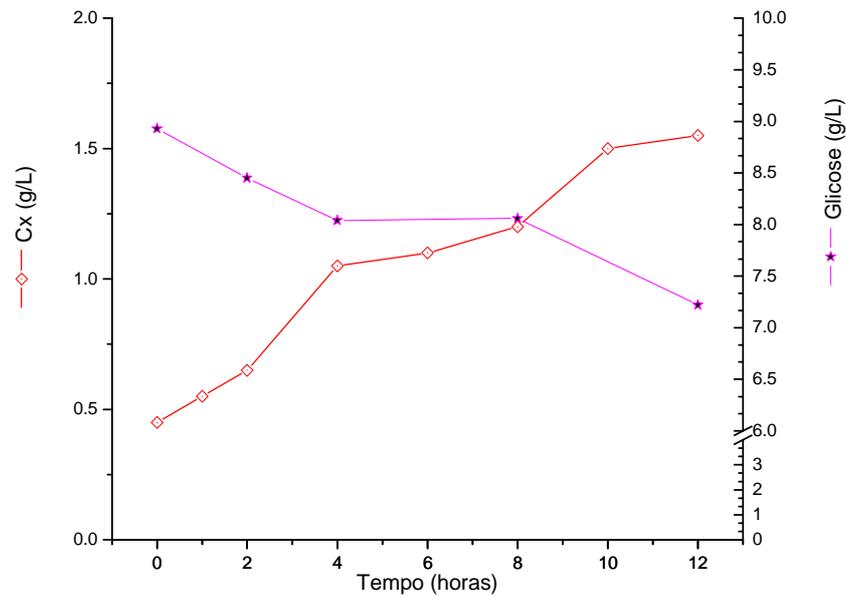


Figura 4.7. Crescimento celular, consumo de glicose durante cultivo de *B. megaterium* ATCC 14945 utilizando meio semi-sintético.

É importante destacar que a linhagem ATCC 14945 não apresentou produção de metabólitos crescendo no meio semi-sintético, tendoum crescimento celular inferior em relação ao crescimento no meio LB –B, já que a produtividade em massa celular para o meio LB-B $P_{LB-B} = 0,2$ gcel.seca/L.h enquanto para o meio SS $P_{SS} = 0.092$ gcel.seca/L.h, portanto o dobro no meio LB-B possivelmente pela ausência de algum nutriente essencial no crescimento do microrganismo que foi esgotado e levou ao microrganismo a parar o crescimento.

Após avaliada a linhagem ATCC 14945, foi realizado o cultivo da linhagem PV 361. A figura 4.8 mostra o ensaio em triplicata para a linhagem PV 361, a qual, diferentemente da linhagem 14945, apresenta a produção de alguns metabólitos.

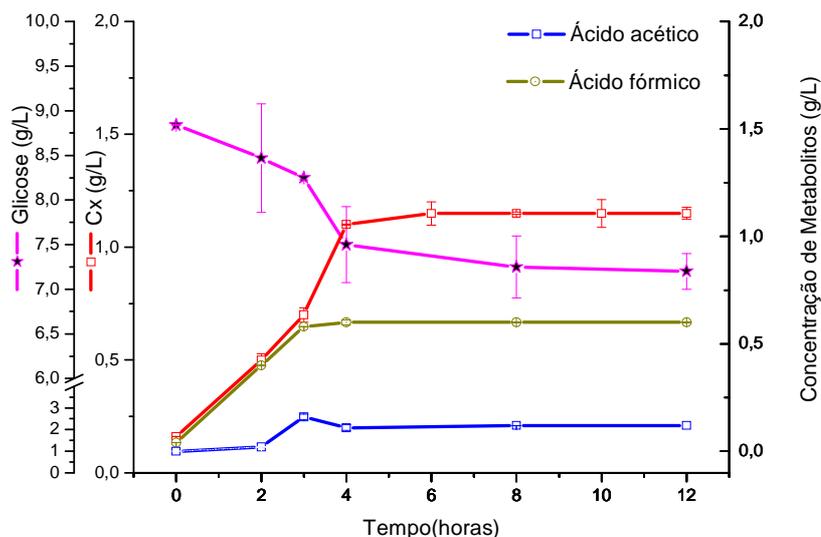


Figura 4.8. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de *B. megaterium* PV 361 utilizando meio Semi-sintético

A Figura 4.8 indica que *B. megaterium* PV 361 tem um crescimento significativo para as 4 primeiras horas de cultivo, mas após esse tempo observa-se que o microrganismo para de crescer com pequeno consumo posterior de glicose, um pequeno consumo de ácido acético e praticamente nenhum de ácido fórmico, indicando ausência de algum fator nutricional importante que estava presente no meio LB.

Finalmente cultivou-se *B. megaterium* QM B1551 utilizando meio semi-sintético para avaliação do crescimento celular, metabólitos e se havia alguma diferença significativa destes comparada com a linhagem PV 361.

A Figura 4.9 mostra o comportamento durante as 12 horas de cultivo para o QM

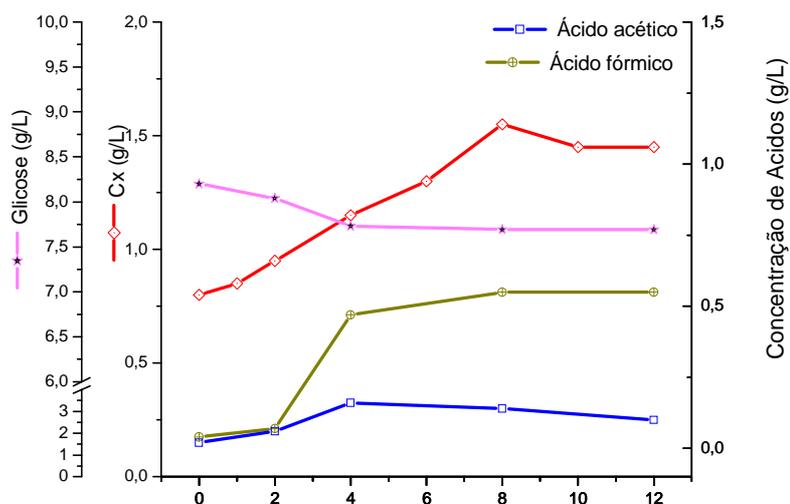


Figura 4.9. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de *B. megaterium* QM B1551 utilizando meio Semi-sintético

Na figura 4.9 é possível observar muitas semelhanças no metabolismo do microrganismo, pois para as duas linhagens se tem como principais metabólitos o ácido fórmico e, em uma menor proporção o ácido acético. O pequeno consumo de acético observado para a linhagem PV mostra-se agora mais acentuado para a linhagem QM. Este é consumido, a concentração se estabiliza, e em nenhum dos dois casos houve um consumo do ácido fórmico.

Por outro lado, a linhagem PV 361 parece apresentar uma maior adaptabilidade ao meio semi-sintético em relação a linhagem QM B1551, ao se comparar os valores atingidos de produtividade. A linhagem PV 361 alcançou $P_{SS} = 0,092$ gcel.seca/L.h, maior que o atingido pela linhagem QM B 1551, $P_{SS} = 0,0542$ gcel.seca/L.h.

É claro que ao se ter ausência de um nutriente essencial, o crescimento se estabiliza, o que também levou à estabilização no consumo da glicose e conseqüentemente à esporulação. Contudo, observando-se o consumo de glicose para cada um dos microrganismos, é possível observar que para a linhagem PV 361 o consumo total de glicose foi 1,6 g/L em relação ao valor de 1,0 g/L para a linhagem QM B1551, o que levou a uma diferença notável na velocidade específica máxima de crescimento, $\mu_{max} = 0,39$ h⁻¹, para PV 361 e $\mu_{max} = 0,10$ h⁻¹

para QM B1551. Isso permite especular que há uma vantagem no cultivo de PV 361, a qual é uma variante do QM B1551, mas na qual os genes dos sete megaplasmídeos constitutivos foram excluídos, pois esse melhor desempenho deve ser explicado pela redução nos processos de duplicação, permitindo assim que o microrganismo sintetize os nutrientes em um menor período de tempo o que conseqüentemente pode melhorar a velocidade específica de crescimento.

A seguir a tabela 4.4 mostra um resumo para os valores da velocidade específica máxima de crescimento e o fator de conversão de glicose em células ($Y_{x/s}$) para as 3 linhagens crescendo no meio semi-sintético.

Tabela 4.4. Comparação de crescimento, produção de metabólitos e calculo de alguns parâmetros cinéticos para cultivo do *B. megaterium* PV 361 nos dois meios LB "A" e LB "B".

Microrganismo <i>B. megaterium</i>	ΔCx (g/L)	μ_{max} h ⁻¹	$Y_{x/s}$	Metabólitos	
				Ácido fórmico	Ácido acético
ATCC 14945	1,10	0,22	0,64	-	-
PV 361*	$0,99 \pm 5,0 \times 10^{-2}$	$0,39 \pm 3,3 \times 10^{-2}$	$0,60 \pm 1,0 \times 10^{-1}$	$0,60 \pm 2,0 \times 10^{-3}$	$0,12 \pm 1,0 \times 10^{-2}$
QM B1551	0,65	0,10	0,65	0,55	0,16

*Cultivo em triplicata

4.1.3 Cultivo no Meio SNB: linhagem PV361

Os seguintes ensaios tiveram por objetivo avaliar o meio desenvolvido pela Dr. P. S. Vary, (1995) para germinação das linhagens PV 361 e QM B1551. Assim, cultivou-se a linhagem PV 361 que é o microrganismo que pode apresentar menor probabilidade de rejeitar o plasmídeo recombinante, ao não ter os sete megaplasmídeos constitutivos dessa linhagem.

A figura 4.10 ilustra o crescimento para a linhagem PV 361 juntamente com os metabólitos produzidos no meio SNB.

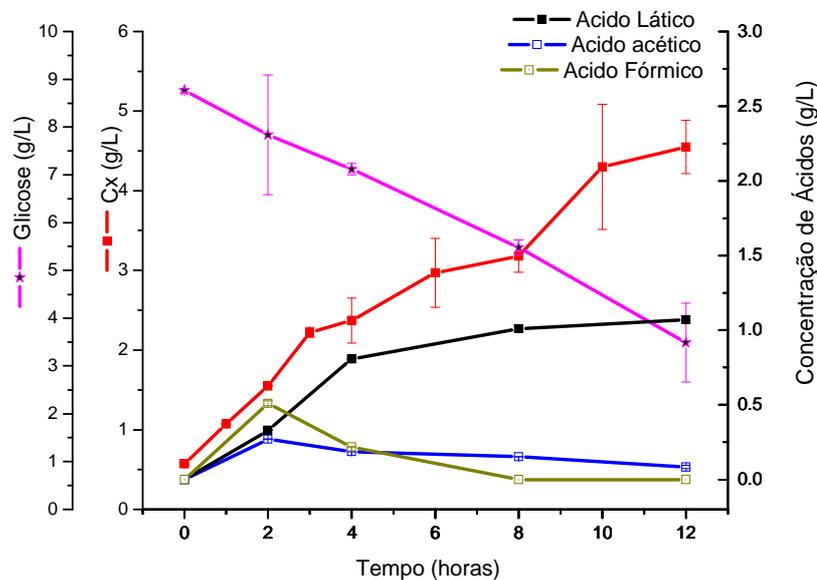


Figura 4.10. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de *B. megaterium* PV 361 utilizando meio SNB.

Após o cultivo da linhagem PV 361, pode-se observar que no meio SNB atingiu-se a maior concentração celular comparado com os meios anteriormente avaliados (LB-B, LB-A e Semi-sintético) com um valor de 4,55 gcel.seca/L. Entre os metabólitos produzidos tem-se ácido láctico com uma concentração máxima de 1,07 g/L, o ácido fórmico, 0,51 g/L e ácido acético, 0,19 g/L. Fica evidente que os meios de cultivo têm uma forte influência no metabolismo do microrganismo, sendo importante então avaliar a influência dessa variável, visando obter um meio que permita otimizar a produção da enzima (YANG et al, 2007). A partir dos resultados obtidos selecionou-se o meio SNB para continuidade do estudo, que visa obtenção de alta densidade celular no cultivo de *B. megaterium*.

4.1.3.1 Linhagem PV361, shaker , Meio SNB e Soro de queijo

No cultivo de *B. megaterium* selvagem, que vem sendo realizado há anos no DEQ/UFSCar, foi observado que soro de queijo era um importante fator nutricional para a linhagem ATCC 14945 (PINOTTI et al, 2003).

Decidiu-se, assim, avaliar a influência desse nutriente sobre o crescimento da linhagem PV361. A figura 4.11 apresenta os perfis de crescimento celular, consumo de glicose e produção de metabólitos para a linhagem PV 361, com ensaios independentes feitos em triplicata e com uma concentração de 10 g/L de soro de queijo.

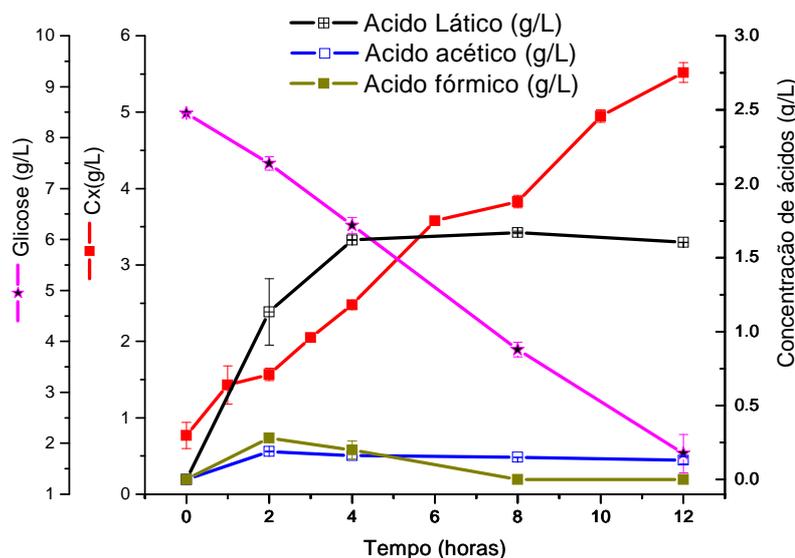


Figura 4.11. Crescimento celular, consumo de glicose e formação de ácidos orgânicos durante cultivo de *B. megaterium* PV 361 utilizando meio SNB com soro de queijo (10 g/L).

Na figura anterior pode-se observar que a adição de soro de queijo no meio de cultivo levou a um incremento na massa celular, com maior consumo de glicose e produção de metabólitos para a linhagem PV 361. Pode-se observar uma desaceleração no crescimento após 1 hora do cultivo. Um fato interessante a ser notado é o incremento na concentração do ácido láctico, o que permite pensar que pode estar ocorrendo uma inibição do crescimento ao se atingir uma determinada concentração deste metabólito, o que leva o microrganismo a mudar a tendência do crescimento celular após as 6 horas de cultivo, esta mudança no crescimento

também pode ser devido a um esgotamento de algum nutriente presente no soro de queijo que seja fundamental no metabolismo do PV 361. Ao se atingir a concentração máxima de $1,67 \pm 8,6 \times 10^{-3}$ g/L de ácido lático, a qual permanece constante na continuidade do cultivo, o microrganismo muda novamente o comportamento dinâmico do crescimento, atingindo-se uma concentração celular máxima de 5,52 g/L, sendo esta a maior alcançada em cultivo em *shaker*, neste trabalho. Comparando-se os resultados entre o cultivo em meio SNB e o meio acrescentando o soro de queijo, observa-se um incremento de quase 20% em ΔCx ($Cx_{\text{final}} - Cx_{\text{inicial}}$).

Outra grande diferença observada é na alta velocidade de produção de ácido lático na presença do soro de queijo. Possivelmente, a alta velocidade de consumo de glicose que ocorre nas primeiras horas de cultivo excede a capacidade metabólica celular de reoxidação do NADH gerado apenas pela rota aeróbica. Uma parte dessas moléculas passa assim a ser reoxidada anaerobicamente gerando os ácidos, em especial o ácido lático. Quando a concentração de glicose atinge cerca de 3 g/L, deve se iniciar o consumo aeróbico do ácido lático, compensando a sua formação, de modo que a sua concentração permanece aproximadamente constante.

4.2. Cultivos em Biorreator

É importante ressaltar que a literatura não reporta cultivos em biorreator para a linhagem PV361. Os parâmetros cinéticos necessários para definição da estratégia de alimentação a ser utilizada foram calculados a partir dos seguintes ensaios em biorreator.

4.2.1 Cultivo 1: Batelada alimentada, linhagem PV361, Meio LB-B

Este experimento foi realizado utilizando o meio de LB-B (Tabela 3) sob condição aeróbica. A vazão de oxigênio utilizada no biorreator foi de 2 L/min e a frequência de rotação inicial foi 300 rpm – que era modificada pela ação do controle

de oxigênio dissolvido, o qual era mantido em 20%. Foram retiradas amostras a cada duas horas para a determinação da densidade ótica, concentração de células (em g massa seca/L), de glicose e de ácidos orgânicos. A composição do gás produzido foi analisada em tempo real. A figura 29 traz os perfis dos principais metabólitos e de massa celular. Nota-se que não há presença de lactato neste ensaio, ao contrário daqueles em *shaker*, indicando que o controle de oxigênio dissolvido em 20% da saturação foi eficiente para evitar a fermentação anaeróbica. Pequenas concentrações de ácido fórmico foram observadas, não indicadas na figura (máximo de 0,82 g/L).

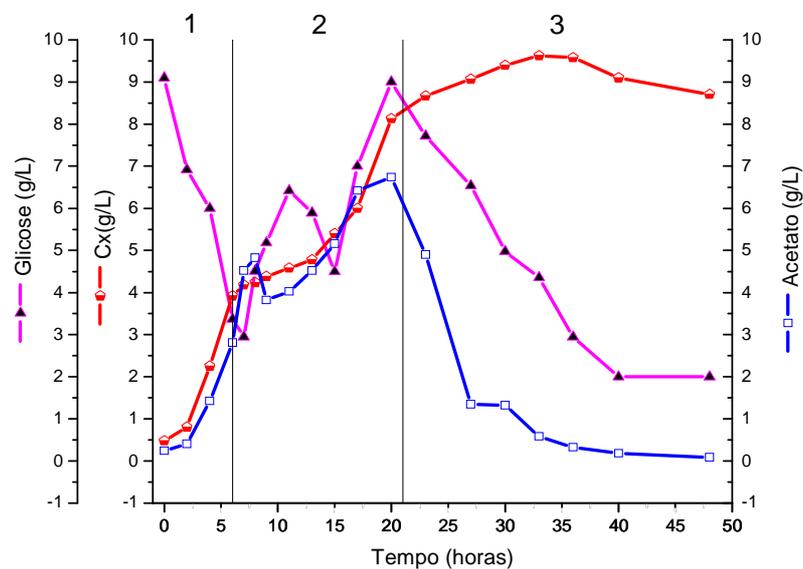


Figura 4.12. Crescimento celular, consumo de glicose e produção de metabólitos no ensaio em biorreator para o *B. megaterium* PV 361 utilizando meio LB-B

O cultivo está dividido em três fases:

1. Batelada
2. Batelada alimentada
3. Interrupção da batelada alimentada por acúmulo de glicose

Na primeira fase, o tempo de batelada foi de 6 horas. Nesse tempo, pode-se observar uma forte relação entre o crescimento e a produção do ácido

acético, pois desde o início o acetato está presente no meio de cultivo, mesmo com aeração de 20%, o que leva a pensar que a rota fermentativa é acionada pela alta concentração de glicose no meio, um possível efeito *crabtree*, conforme já foi observado ocorrer em cultivos feitos por Hollmann e Deckwer, 2004. Yang et al., 2006, também observaram, para outra linhagem de *B. megaterium*, que a produção do ácido acético estava presente desde o começo do cultivo e acompanhava o crescimento quando se tinha uma concentração de glicose maior que 4 g/L.

Com o objetivo de se minimizar a produção de acetato durante a batelada alimentada, iniciou-se a alimentação de meio suplementar quando a concentração de glicose atingiu 3 g/L, com o propósito de mantê-la nesse nível. Outro indicador para o início da alimentação foi a queda na concentração de CO₂ nos gases de saída, que se observou ocorrer entre 5 e 6 horas de cultivo, indicando queda na velocidade de crescimento por esgotamento da fonte de carbono. Assim, após as 6 horas deu-se início à fase de batelada alimentada.

A alimentação do meio suplementar era feita segundo a seguinte equação:

$$F_{ALIM} = C_1 e^{(C_2(t-t_0))} \quad (16)$$

Onde,

$$C_1 = \frac{\mu_{set} X_0 V_0}{(S_{ALIM} - S_0) Y_{X/S}} \quad (17) \quad C_2 = \mu_{set}$$

E $S_0, \mu_{1,0}, X_0, V_0, t_0$ são valores no final da fase em batelada.

Para a batelada alimentada utilizou-se um valor para $\mu_{set} = 0,12 \text{ h}^{-1}$, valor este obtido da literatura (HOLLMANN; DECKWER, 2004). A concentração de glicose (S_{ALIM}) foi 300 g/L, mantendo-se as mesmas concentrações dos demais nutrientes do meio LB-B (tabela 3.1).

É possível observar que para o intervalo do cultivo entre as 6 e 14 horas houve uma queda na velocidade específica de crescimento, como mostra a figura 4.12. Após esse período de crescimento linear, a bactéria retoma o crescimento exponencial, entre 14 e 20 h (vide figura 4.12). O perfil de CO₂ acompanha de perto essas alterações, como se vê na figura 4.13(a). Durante um rápido período de adaptação após o início da alimentação, ocorre acúmulo de glicose (10h) e, ao mesmo tempo, consumo de acetato (vide figura 4.12), mas ao se retomar o crescimento exponencial, o acetato volta a ser produzido. Com efeito, assim que a concentração de glicose passou dos 4 g/L reiniciou-se a produção do ácido acético.

Analisando-se a figura 4.14(a) pode-se observar que durante o tempo de batelada e nas primeiras horas de batelada alimentada há grande oscilação na medida de pH, o que pode ter sido causado pela alta concentração de ácido no meio.

Observa-se ainda que a alimentação exponencial, com $\mu_{crit} = 0,12 \text{ h}^{-1}$, levou a acúmulo de glicose.

A figura 4.14(b) mostra que durante o intervalo do cultivo entre as 9 e 13 horas, quando novamente se ativou a produção do ácido acético, a %O₂ dissolvido teve uma queda bem importante, indicando retomada do crescimento aeróbico. Assim, pode-se pensar novamente que o microrganismo está em um metabolismo fermento-respiratório (efeito *crabtree*).

Para a parte final do cultivo, após se atingir uma concentração de glicose de 9 g/L, suspendeu-se a alimentação. Nessa etapa, observou-se uma fase de desaceleração do crescimento, até aproximadamente 35 horas. É interessante observar que na terceira fase do cultivo foi o acetato o substrato preferencial em comparação com a glicose. Uma possibilidade para essa alteração metabólica é o início de esporulação da bactéria o que, entretanto, infelizmente não pôde ser comprovado neste ensaio, pois não houve acompanhamento de alterações morfológicas do microrganismo. Isso foi corrigido em próximo ensaio, como se mostra na seqüência.

Foi somente após 35 horas de cultivo, quando a concentração de acetato foi inferior a 1 g/L, que o microrganismo apresentou uma queda na concentração celular, acompanhada de uma significativa queda na %CO₂, incremento na concentração de oxigênio dissolvido, e um excelente controle da agitação e do pH, o que leva a concluir que o microrganismo se encontrava em avançada fase de esporulação e/ou morte celular.

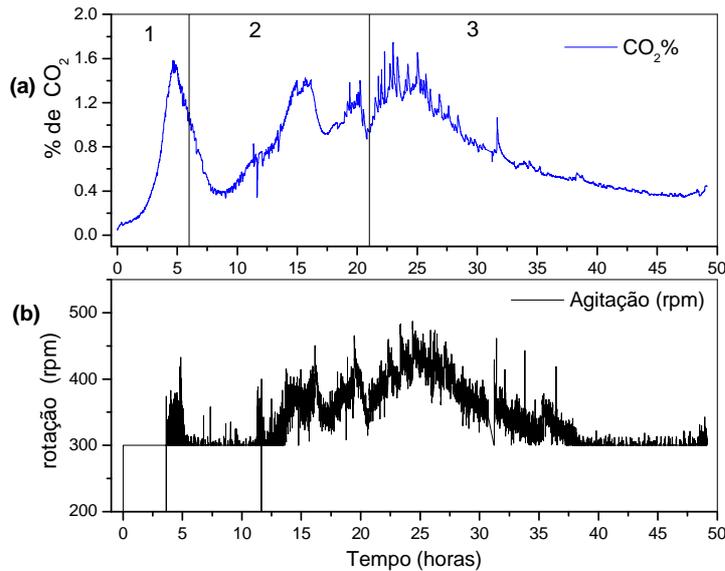


Figura 4.13. Variações da porcentagem de CO₂ (a), da frequência de agitação (b) durante o cultivo aeróbio para o *B. megaterium* PV 361 em meio LB-B

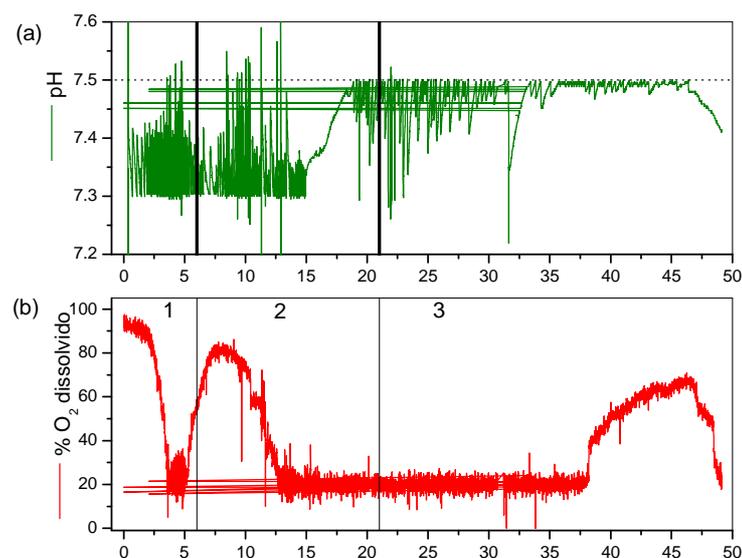


Figura 4.14. Variações do pH (a), da porcentagem de oxigênio dissolvido (b) durante o cultivo do *B. megaterium* PV 361 em meio LB-B

4.2.2 Cultivo 2: Meio Semi – sintético – linhagem PV361, batelada alimentada

Neste cultivo da linhagem PV-361 usou-se um meio da literatura (HOLLMANN; DECKWER, 2004), nas condições de cultivo temperatura de 37 °C, pH = 5.2 e %O₂ = 20.

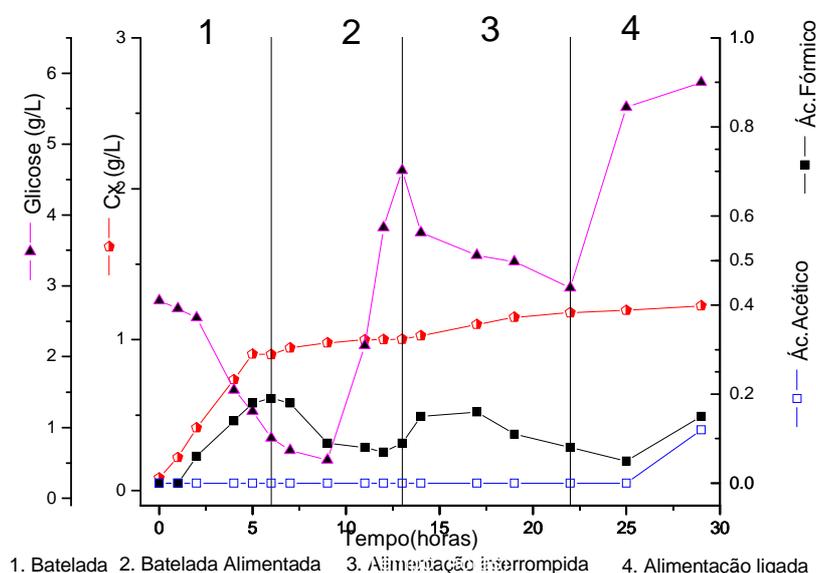


Figura 4.15. Crescimento celular, consumo de glicose e produção de metabólitos no ensaio em Biorreator para o *B. megaterium* PV 361 utilizando meio Semi-sintético.

Como se vê este meio apresenta deficiências em alguns nutrientes essenciais para o crescimento do microrganismo, pois o *B. megaterium*: na batelada não conseguiu atingir nem 1 g/L de concentração celular. Parece claro que a linhagem PV361 requer algum fator nutricional que praticamente se esgotou ao se atingir 1 g/L de massa celular. Todo o metabolismo parece estar daí para frente dirigido para a manutenção, com crescimento celular apenas ligeiramente maior que o necessário para compensar a morte celular, crescimento esse provavelmente sustentado pelo reciclo desse fator nutricional. O acetato foi perfeitamente controlado na batelada, com a concentração de glicose menor que 4 g/L, e sua produção máxima não chegou a atingir 0,5 g/L. Com esse meio semi – sintético,

observou-se que *B. megaterium* PV-361 produziu ácido fórmico como metabólito. A maior concentração desse metabólito foi atingida na parte da batelada. Pode-se observar na figura 34 que para as primeiras horas houve uma mudança no pH. Contudo, também este ácido foi produzido em mínimas concentrações e seu consumo era iniciado sempre que a concentração de glicose diminuía.

Para a batelada alimentada a equação 12 também foi utilizada para fazer a alimentação, com $\mu_{\text{set}} = 0,12 \text{ h}^{-1}$. Na figura 4.15 observa-se que no intervalo entre as 6 e 13 horas, período no qual foi feita alimentação, o microrganismo não teve variação no crescimento celular, com alto acúmulo de glicose. Após as 13 horas de cultivo, quando a concentração da glicose atingiu um valor maior que 4 g/L, de novo o microrganismo iniciou a produção de ácido fórmico, claramente por fermentação aeróbica (vide a curva de O_2 dissolvido, figura 4.17b).

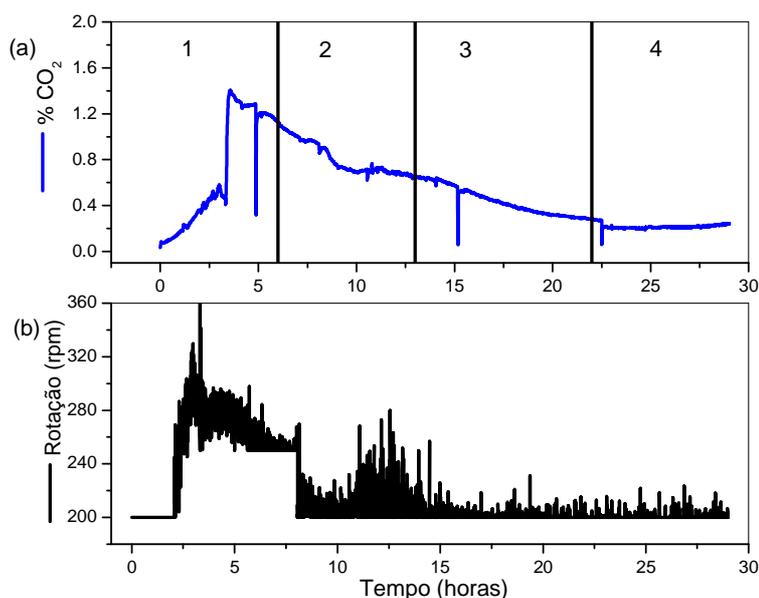


Figura 4.16. Variações da porcentagem de CO₂ (a), da frequência de agitação (b) durante o cultivo aeróbio para o *B. megaterium* PV 361 em meio Semi-sintético.

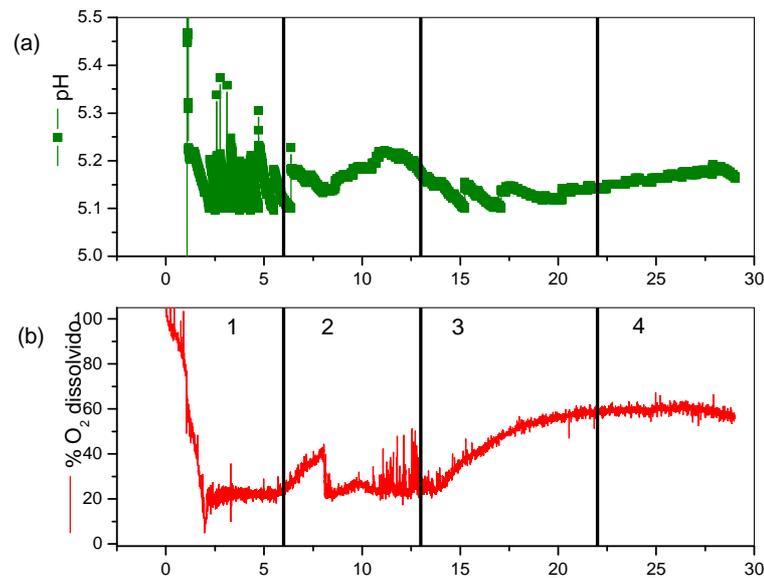


Figura 4.17. Variações do pH (a), da porcentagem de oxigênio dissolvido (b) durante o cultivo do *B. megaterium* PV 361 em meio Semi-sintético.

4.2.3 Cultivo 3: Meio SNB, linhagem PV361, batelada alimentada

Com o objetivo de avaliar o meio SNB, recomendado pela Profa. Patrícia Vary para o crescimento da linhagem PV 361 realizou-se cultivo a uma temperatura de 30 °C, pH = 7,5 e mantendo-se a porcentagem de O₂ dissolvido em 20%. Para este cultivo utilizou-se o biorreator Applikon, de 2L.

Na tabela 14 se apresenta o balanço de carbono, para o crescimento do *Bacillus megaterium* PV 361 junto com a produção de metabólitos.

Tabela 4.5. Balanço de carbono para cultivo aeróbio (Cultivo 3), considerando 12 horas de cultivo e 1,1 L de volume

	Substrato/Produto	Concentração	Fórmula química	Massa molecular	Mols de C	%
Consumido	Glicose	8,82 g/L	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,15	0,32	100
Produzido	Células	3,70 g/L	CHN*	25,08	0,16	50,22
Produzido	Ácido láctico	6,24 g/L	C ₃ H ₆ O ₃	90,08	0,23	70,74
Produzido	Ácido Acético	1,62 g/L	C ₃ H ₆ O ₃	60,05	0,06	18,37
Produzido	Dióxido de carbono	8,04 x 10 ⁻³ mol/L	CO ₂	44,01	0,01	2,72
Diferença (Consumido-Produzido)					-0,14	-42,06

Na tabela anterior pode-se observar que existe um déficit de carbono. Esta diferença possivelmente se deve a que um dos nutrientes do meio é o *nutrient broth* o qual tem como componentes o *Enzymatic Digest of Gelatin* (com 62,5% em massa) e *Beef extract* (com 37,5%). Assim, o microrganismo tem fontes de carbono alternativas.

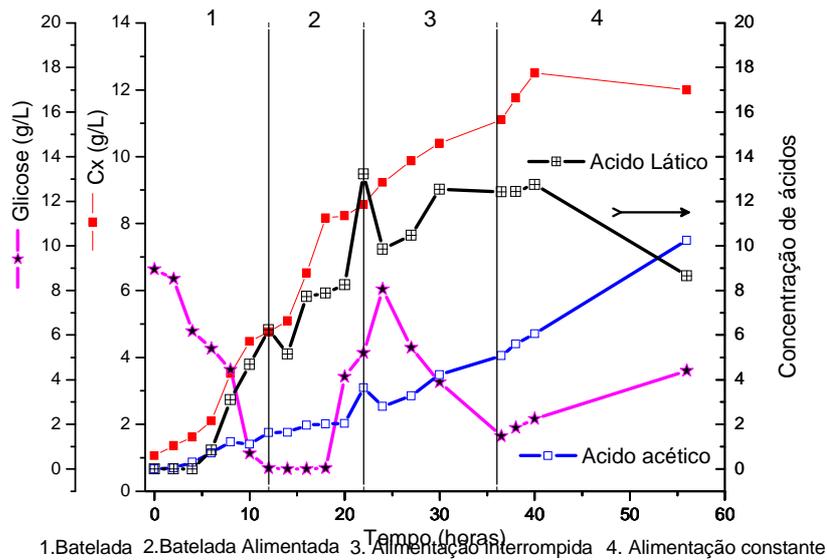


Figura 4.18. Crescimento celular, consumo de glicose e produção de metabólitos para o cultivo do *B. megaterium* PV 361 em meio SNB.

A figura 4.18 ilustra o comportamento do crescimento do PV 361. Pode-se observar que já na fase inicial da batelada, 12 horas iniciais do cultivo, o microrganismo desde o início apresentou uma alta produção de ácido láctico e uma baixa produção de ácido acético. Além disso, a figura 4.19 (a) mostra uma boa produção de CO₂ nas primeiras 5 horas de cultivo, o que permite pensar que para esta linhagem, neste meio, a concentração de ácido láctico até as 5 horas de cultivo ainda não afeta o crescimento do microrganismo.

Observa-se também um crescimento muito mais lento na fase batelada do biorreator que o observado na batelada em *shaker*, com valor de $\mu_{MAX} = 0.11h^{-1}$, no biorreator, comparado com o valor típico para *shaker*, $\mu_{MAX} = 0.39 h^{-1}$.

Para a segunda fase do cultivo, batelada alimentada, utilizou-se uma concentração de glicose de 300 g/L e se manteve a composição do meio como se especifica na tabela 3.5. O valor do $\mu_{set} = 0,12 h^{-1}$ foi utilizado novamente. A figura 4.18 ilustra como o microrganismo depois do início da batelada alimentada apresentou crescimento contínuo até chegar às 18 horas de cultivo, onde se observa ocorrer desaceleração no crescimento. Pode ter ocorrido inibição pelo substrato, pois a glicose se acumulou e atingiu valores maiores que 4 g/L. Contudo, acredita-se que seja mais provável que tenha ocorrido inibição pelo produto, pois o ácido láctico alcançou uma concentração de 13,2 g/L durante esse período, o que pode ter levado a uma diminuição da velocidade específica de crescimento, com conseqüente acúmulo de glicose. Possivelmente, o microrganismo durante esse intervalo de tempo (18 – 24 h) ativou a esporulação por causa das condições adversas do ambiente nesse intervalo. Após as 22 horas de cultivo a alimentação foi interrompida, pois a glicose já havia atingido 5 g/L, concentração que ativa a produção de metabolitos. A seguir, entre as 22 e 24 horas, o microrganismo voltou a consumir glicose (depois das 24h) e iniciou consumo dos ácidos orgânicos, acético e láctico, e a concentração celular voltou a aumentar. Após as 24 horas de cultivo, a concentração dos ácidos caiu abaixo dos níveis inibitórios e como uma concentração de glicose ainda alta, observou-se retomada da produção de ácido acético, que se manteve até o final do cultivo. O ácido láctico, após atingir novamente por volta de 12 g/L, próximo das 30 horas, manteve concentração constante até 40

horas de cultivo, quando, devido à queda na concentração de glicose, teve seu consumo retomado pelo microrganismo. É possível que, se não tivesse havido a retomada da alimentação de glicose, os níveis de ácido não tivessem atingido patamares inibitórios, em especial o acético. Aparentemente, a tolerância por ácido lático é maior que por ácido acético. Fica claro, contudo, que o aumento da concentração celular depende de se conseguir manter a concentração de glicose abaixo de 4 g/L, requisito para evitar a rota fermentativa ou pelo menos manter a concentração de ácidos em níveis toleráveis pelo microrganismo. Por outro lado, o controle o oxigênio dissolvido parece, também, ser crucial.

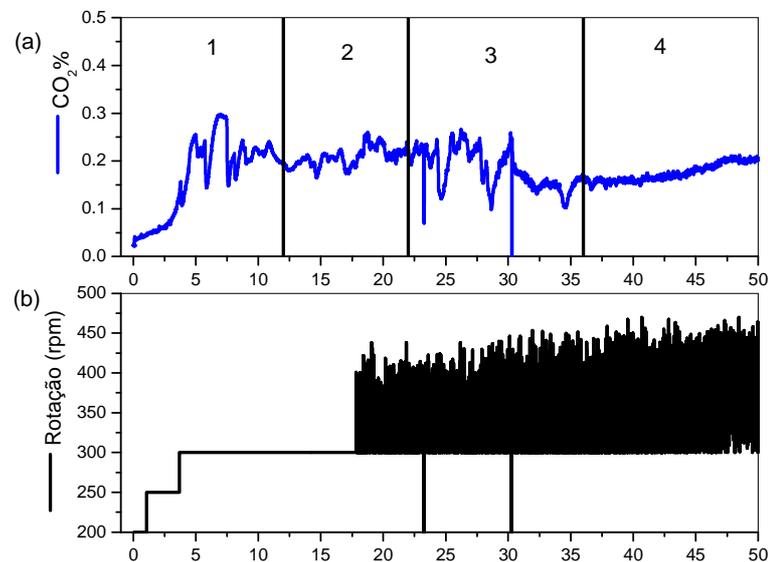


Figura 4.19. Variações da porcentagem de CO₂ (a), da frequência de agitação (b) durante o cultivo aeróbio para o *B. megaterium* PV 361 em meio SNB.

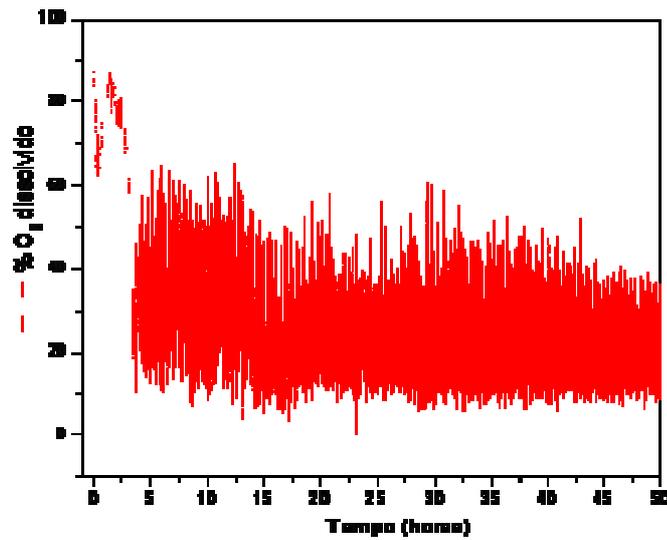


Figura 4.20. Variações da porcentagem de oxigênio dissolvido durante o cultivo do *B. megaterium* PV 361 em meio SNB.

4.2.4 Cultivo 4: Meio SNB e Soro de Queijo, batelada alimentada

Para avaliação da influência do soro de queijo no crescimento celular do *B. megaterium* PV 361 em meio SNB, realizou-se cultivo a uma temperatura de 30 °C, pH = 7,5 e mantendo-se a porcentagem de O₂ dissolvido em 20%. Para este cultivo, de 50 h, utilizou-se o biorreator Applikon 2L.

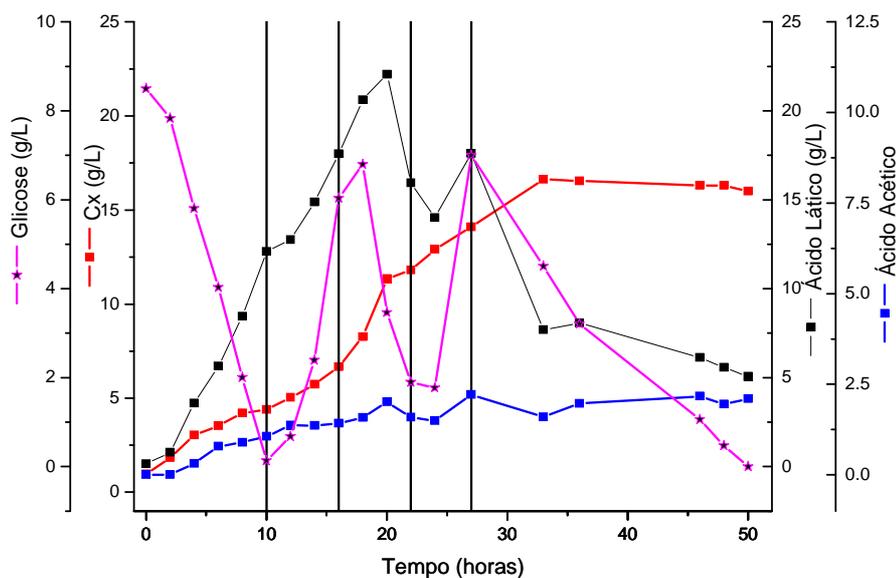


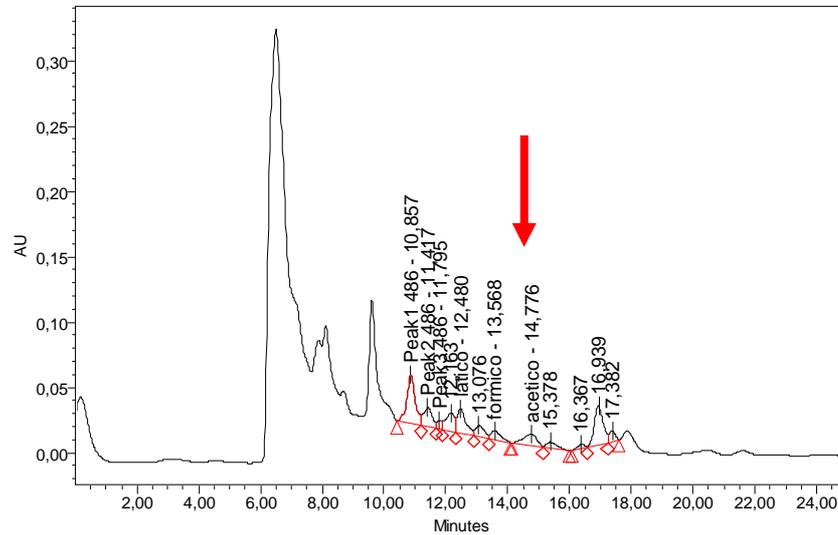
Figura 4.21. Crescimento celular, consumo de glicose e produção de metabólitos para o cultivo do *B. megaterium* PV 361 em meio SNB + Soro de Queijo (10 g/L)

A figura 4.21 mostra o crescimento do *Bacillus megaterium* PV 361, na presença do soro de queijo. Neste cultivo o microrganismo esgotou a fonte de carbono 2 horas antes comparado com o crescimento sem o soro, o que dá um consumo de glicose de 0,837 g/h comprado com 0,743 g/h na ausência do soro. Ou seja, houve um incremento no consumo da fonte de carbono maior que 10% com a presença do soro de queijo, o que indica que este nutriente é importante para o crescimento do microrganismo. Nota-se, novamente, a grande produção de lactato, e a possibilidade desse ambiente ter induzido a fermentação láctica por stress metabólico é uma hipótese a ser novamente levantada.

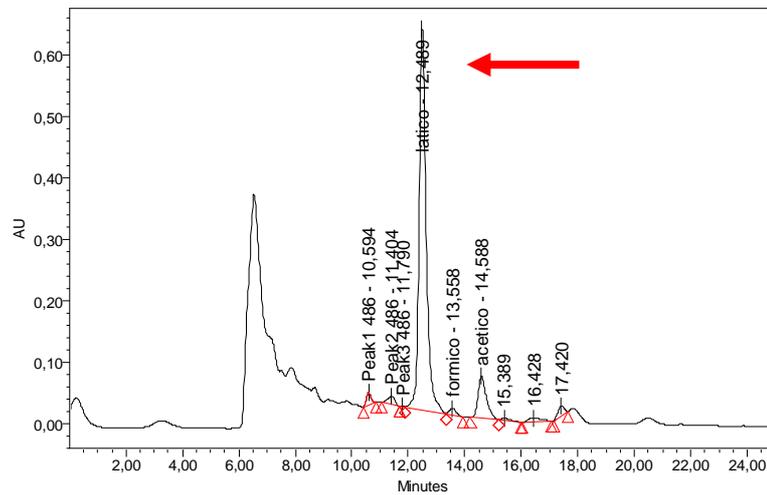
É importante ressaltar que o microrganismo apresentou uma mudança no crescimento após as 6 horas de cultivo, possivelmente pela presença da alta concentração do ácido láctico, pois após 6 horas de cultivo o ácido atingiu 5,6 g/L, chegando ao final da batelada a uma concentração de 12 g/L.

A Figura 4.22 apresenta os cromatogramas durante a produção de ácido láctico.

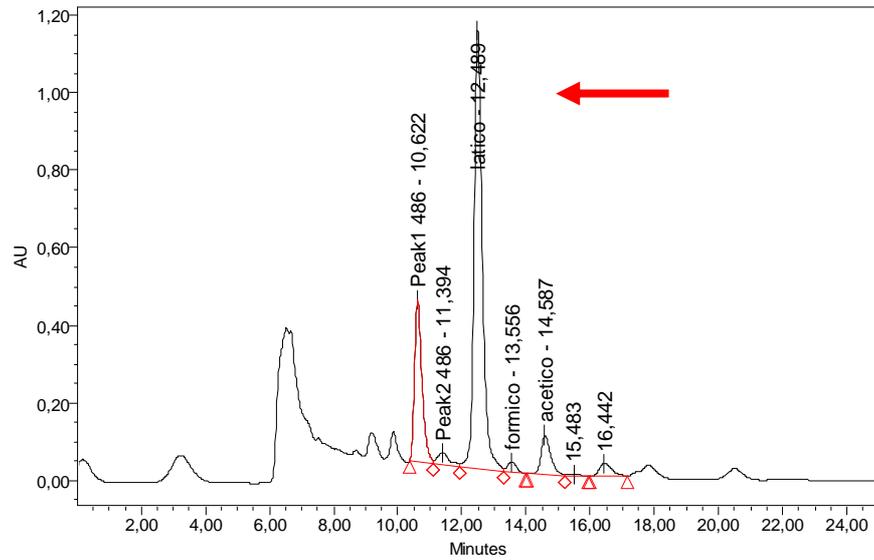
(a) Concentração do ácido láctico no início do cultivo



(b) Concentração do ácido láctico 10 h do cultivo (Batelada)



(c) Concentração do ácido láctico 20 h do cultivo.



(d) Concentração do ácido láctico 46 h do cultivo.

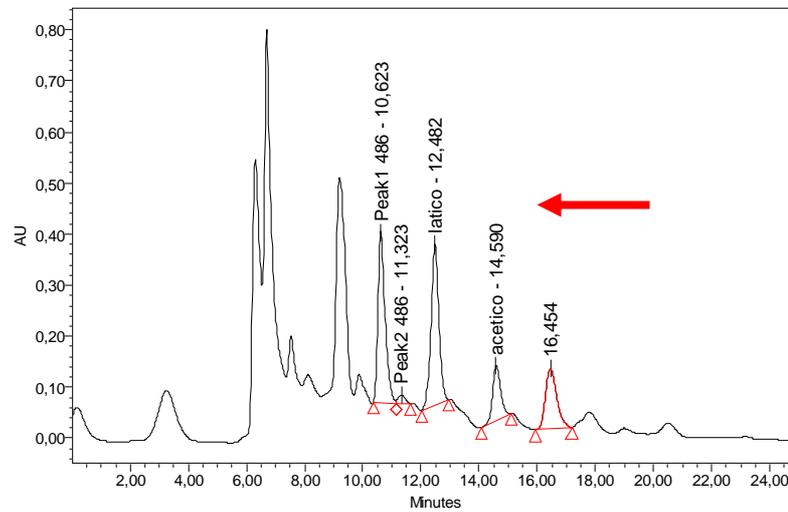
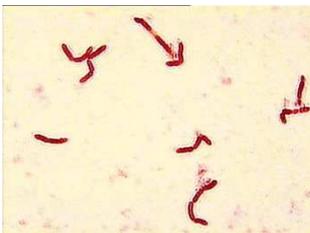


Figura 4.22. Evolução da produção de ácido láctico durante o cultivo de *Bacillus megaterium* PV 361, no meio SNB + Soro de queijo.

A figura anterior ilustra a evolução da produção do ácido láctico, na figura 4.22 (b) o maior pico indica a alta concentração que houve do ácido para as primeiras 10 horas do cultivo, na figura 4.22 (c) ilustra o pico para o ácido láctico para as 20 horas de cultivo onde o ácido láctico atingiu a maior concentração durante todo o cultivo (variação da escala). Finalmente a figura 4.22 (d) mostra que houve uma queda na concentração do ácido láctico o que permite pensar que o microrganismo consumiu este ácido orgânico durante a esporulação.

Nas primeiras 4 horas de cultivo o microrganismo apresentou um crescimento exponencial com $\mu_{\max} = 0,285 \text{ h}^{-1}$, enquanto que no cultivo sem o soro de queijo o microrganismo, nas primeiras 4 horas, teve $\mu_{\max} = 0,106 \text{ h}^{-1}$. Por outro lado, o fator de conversão células/substrato na presença do soro de queijo teve valor similar ao cultivo feito na ausência de soro, com um valor de $Y_{x/s} = 0.41$ ($\text{g}_{\text{células}}/\text{g}_{\text{substrato}}$) para as primeiras 10 horas de cultivo nos dois casos.

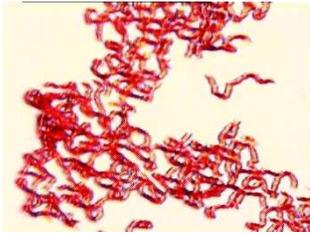
O acompanhamento do processo de esporulação durante este ensaio foi feito através de imagens obtidas no microscópio Olympus model BX50F-3 com uma UPlanFI de até 100x/1.30. Foram feitas lâminas com o microrganismo e coradas com verde malaquita e safranina, corantes biológicos usados para a diferenciação entre esporos e bacilos. O verde malaquita corava os esporos, enquanto a safranina corava os bacilos. A figura 40 ilustra o processo de esporulação do *Bacillus megaterium* PV 361 neste cultivo.



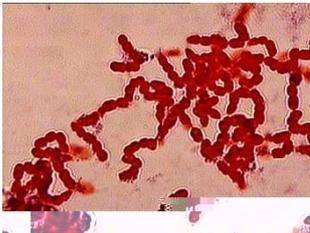
(a) 2 h de cultivo (40X)



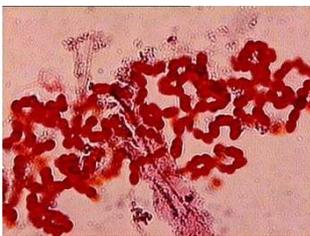
(b) 4 h de cultivo (40x)



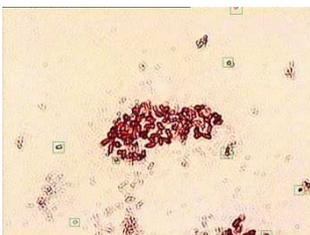
(c) 8 h de cultivo (40x)



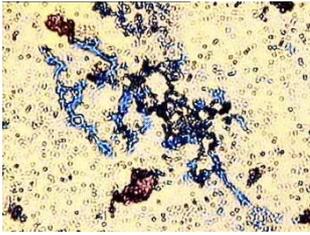
(d) 10 h de cultivo (100x)



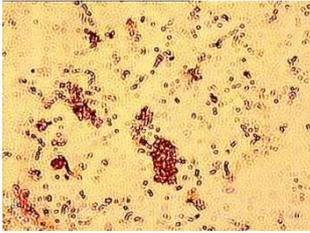
(e) 16 h de cultivo (100x)



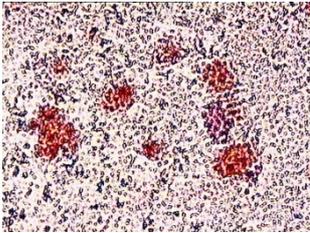
(f) 24 h de cultivo (40x)



(g) 27 h de cultivo (40x)



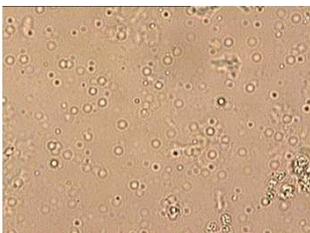
(h) 33 h de cultivo (40x)



(i) 36 h de cultivo (40x)



(j) 46 h de cultivo (40x)



(k) 48 h de cultivo (100x)

Figura 4.23. Evolução no processo de esporulação do *B. megaterium* PV 361 durante o cultivo aeróbio em meio SNB e Soro de Queijo.

É possível ver que a esporulação se inicia entre as 16 horas e as 24 horas. A figura 4.23 (f) mostra já a presença de alguns esporos. É interessante analisar esses resultados junto com a evolução do perfil de CO_2 nos gases efluentes, figura 4.24 (a). Entre 19 h e 22 h de cultivo há uma queda sensível nessa concentração, que coincide com o período de transformação das células vegetativas em esporulantes. Também é possível observar nas figuras 4.23 (i,j) que entre 36 e 46 horas houve um incremento da presença de esporos. Essa etapa corresponde à fase estacionária indicada na figura 4.21 (na verdade, observa-se ligeira queda na massa seca). A figura 4.24 (a) mostra uma queda continuada na produção de CO_2 . A figura 4.23 (j) mostra uma grande quantidade de esporos, o que permite pensar que após 46 horas de cultivo o microrganismo se encontra totalmente transformado em esporos. Finalmente a figura 4.23 (k) ilustra uma lâmina feita após 48 horas, na qual só é possível ver esporos (compare com a figura 4.23 d).

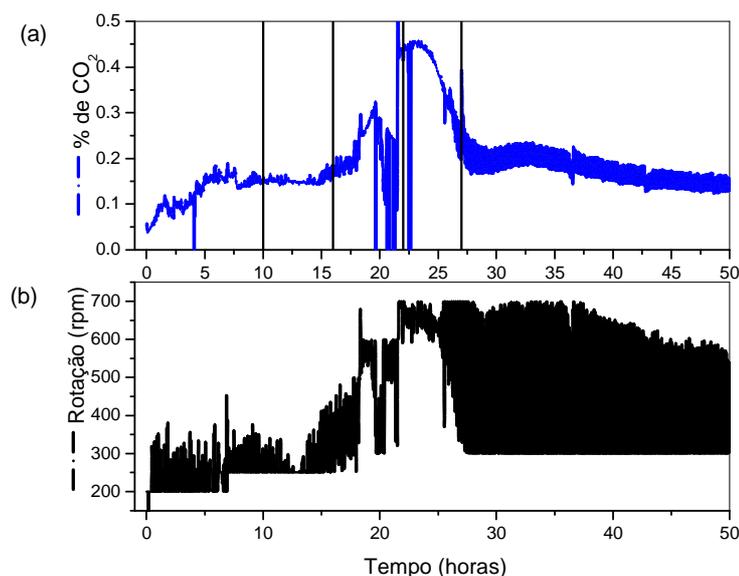


Figura 4.24. Variações da porcentagem de CO_2 (a), da frequência de agitação (b) durante o cultivo aeróbio para o *B. megaterium* PV 361 em meio SNB com 10 g/L de soro de queijo.

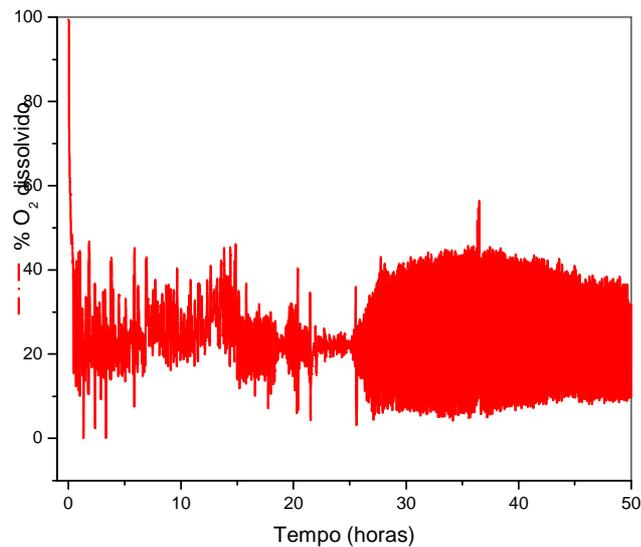


Figura 4.25. Variações da porcentagem de O₂ durante o cultivo aeróbico para o *B. megaterium* PV 361 em meio SNB com 10 g/L de soro de queijo.

A figura 4.25 da mesma forma que a figura 4.20, apresenta uma grande dispersão na concentração de oxigênio dissolvido, esta grande variabilidade é por um ajuste inapropriado dos parâmetros do controlador, pois a existe uma relação entre os parâmetros e a velocidade de crescimento do microrganismo a qual deve ser ajustada em futuros cultivos para uma melhor definição do modelo de crescimento. . Esta dispersão no controle do oxigênio dissolvido pelo não apropriado ajuste dos parâmetros, pode ter sido pela alta produção de ácido láctico, este acúmulo de ácido pode ter levado a uma situação de estresse do microrganismo o que levou a uma mudança no metabolismo (esporulação), que finalmente leva-se a um menor consumo de oxigênio e assim a dificuldade no controle do oxigênio. Uma indicação de uma situação de estresse a presença de esporos, como se mostra na figura 4.23(f), o que indica que o microrganismo iniciou a esporulação no intervalo 16 a 24 horas de cultivo, tempo no qual se tem as mais altas concentrações do ácido láctico. No trabalho feito por Vasala et al, (2005), em cultivo com *Bacillus megaterium* com soro de queijo e controle de pH, o microrganismo atingiu altas concentrações de ácido láctico maiores que 60 g/L, mostrando uma eficiente conversão da lactose em ácido láctico.

Outro importante indicador de produção de ácido é adição de base pela bomba de controle do pH. A figura 4.26 ilustra como adição da base acompanha bem o crescimento celular, o que significa que a produção de ácidos está associada ao crescimento das células vegetativas, também neste ensaio. Entretanto, quando começou a esporulação, ao redor de 19 h, a vazão de base praticamente zera, ou tem valor muito inferior ao da fase exponencial.

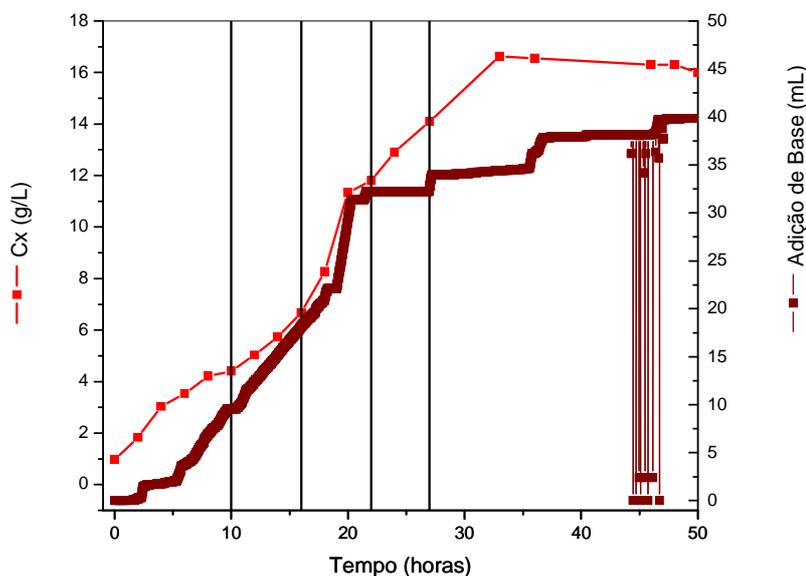


Figura 4.26. Comparação do crescimento celular e a adição de Base (NH_4OH) durante as 50 horas de cultivo aeróbico para o *B. megaterium* PV 361 em meio SNB + Soro de Queijo.

A figura anterior pode ser outro indicador da fase de esporulação, neste caso é possível observar que após das 36 horas a adição da base cessa e o crescimento celular após este tempo apresenta uma queda, é possível então pensar que para este tempo segundo a figura 4.23 (i) onde existe uma grande presença de esporos, o microrganismo se encontra em uma total fase de esporulação. Esta figura também representa bem a produção de ácidos na batelada, pois nas primeiras 10 horas adição da base apresenta um comportamento exponencial e este comportamento muda após se da início à alimentação, no intervalo de cultivo entre as 10 e 11 horas também se pode observar como a adição base esta sendo bem

limitada pelo μ_{set} isso é porque a produção de ácidos esta sendo limitada pela ausência de glicose, mas para o intervalo das 12 as 14 horas de cultivo quando a glicose é acumulada, a adição da base apresenta uma pequena mudança no comportamento e incluso apresenta uma inclinação bem pronunciada até as 20 horas de cultivo onde a glicose atingiu uma concentração maior aos 6 g/L e a concentração celular estava em 8,27 g/L, condições nas quais a produção de ácidos se incrementou de 12g/L ate 22 g/L.

Tabela 4.6 Balanço de carbono para cultivo aeróbio (Cultivo 4), considerando 10 horas de cultivo em batelada e 1,1 L de volume

	Substrato/Produto	Concentração	Fórmula química	Massa molecular	Mols de C
Consumido	Glicose	8,50 g/L	$C_6H_{12}O_6$	180,15	0,31
Produzido	Células	3,43 g/L	$C_{1.0}H_{1.69}N_{0.23}$	25,08	0,15
Produzido	Ácido láctico	12,09 g/L	$C_3H_6O_3$	90,08	0,44
Produzido	Ácido Acético	1,062 g/L	$C_3H_6O_3$	60,05	0,04
Produzido	Dióxido de carbono	$5,99 \times 10^{-3}$ mol/L	CO_2	44,01	0,01
Diferença (Consumido-Produzido)					-0,33

Na tabela anterior pode-se observar que existe um déficit de carbono. Esta diferença se deve ao consumo de outros nutrientes. Por exemplo, o soro de queijo tem lactose, a qual pode ter sido consumida pelo microrganismo para o crescimento celular – com alta produção do ácido láctico.

Finalmente, a partir dos dados obtidos neste trabalho, nos cultivos em bioreator, fica clara a importância da implementação de algoritmos de controle, como por exemplo, o controle ótimo, para minimizar a produção de ácidos, o que diminuirá também a inibição do crescimento microrganismo e a indução da fase de esporulação. Com isso, poder-se-ia atingir densidades celulares mais altas.

4.3 Estimativa de parâmetros

Para estimativa de parâmetros se utilizou a fase batelada de cada cultivo em biorreator. Admitiu-se ser a glicose o substrato limitante, e para o crescimento celular se empregou a equação de Monod (equação 3) e equações de considerando inibição pelo produto. (equações 7, 8 e 9). Para o produto foi proposto um modelo matemático não estruturado parcialmente associado ao crescimento do tipo de Luedeking-Piret, (KWON et al, 2001). Equação(6).

A Tabela 4.7 apresenta as restrições nos valores dos parâmetros dos modelos de crescimento usados (equações 3, 7, 8 e 9) (ou seja, os limites inferiores e superiores de cada parâmetro). Para os cultivo 1, 2 e 3 , que foram estimados.

Tabela 4.7. Restrições nos valores dos parâmetros, limites inferior e superior.

Limites	Parâmetros do Modelo											
	K_S	μ_{max}	$Y_{X/S}$	K_D	α	$Y_{Ac/S}$	β	m	K_i	θ	δ	$Y_{L/S}$
Inferior	0,50	0,10	0,10	0,0001	0,050	0,01	0,001	0,0001	0,01	0,01	0,01	0,01
Superior	5,0	0,80	0,85	0,010	5,0	0,95	5,0	0,1	5,0	5,0	5,0	0,9

K_S : Parâmetro de Monod ($g_{glicose} \cdot L^{-1}$); μ_{max} : velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1}); $Y_{X/S}$: Fator de conversação de substrato a células ($g_{massaseca} \cdot g^{-1}_{glicose}$); K_D : Constante de morte celular (h^{-1}); α : coeficiente pseudo-estequiométrico para formação de acetato associada ao crescimento ($g_{Acetato} \cdot g^{-1}_{massa-seca}$); β : coeficiente cinético para formação de acetato não associada ao crescimento ($g_{Acetato} \cdot g^{-1}_{massa-seca} \cdot h^{-1}$); $Y_{Ac/S}$: Fator de conversação de substrato a Acetato ($g_{massaseca} \cdot g^{-1}_{glicose}$); m : coeficiente de manutenção celular ($g_{Acetato} \cdot g^{-1}_{massa-seca} \cdot h^{-1}$); K_i : constante de inibição por Lactato ($g_{Lactato} \cdot L^{-1}$); θ : coeficiente pseudo-estequiométrico para formação de Lactato associada ao crescimento ($g_{Acetato} \cdot g^{-1}_{massa-seca}$); δ : coeficiente cinético para formação de acetato não associada ao crescimento ($g_{Acetato} \cdot g^{-1}_{massa-seca} \cdot h^{-1}$); $Y_{L/S}$: Fator de conversação de substrato a Acetato ($g_{Lactato} \cdot g^{-1}_{glicose}$).

4.3.1 Estimativa de parâmetros para o Cultivo 1

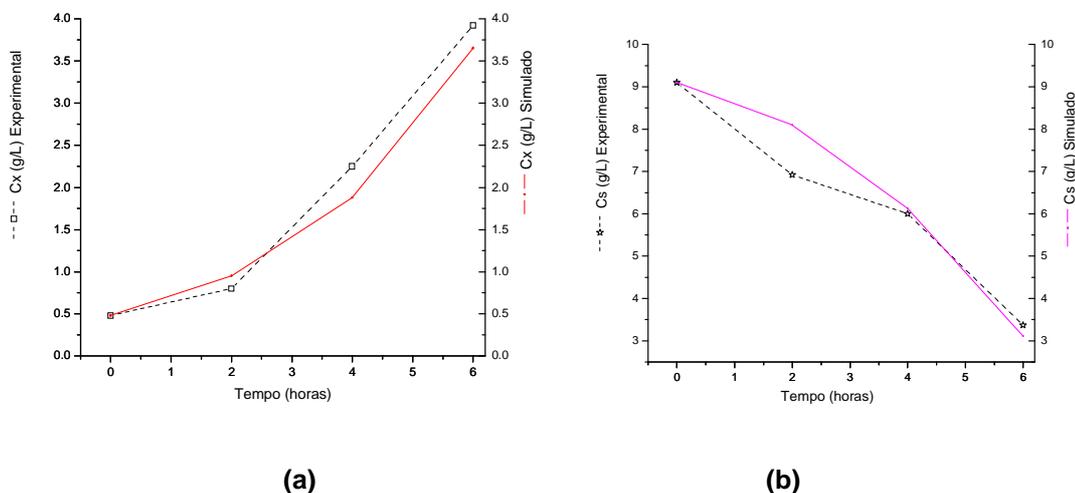
Crescimento do *Bacillus megaterium* PV 361 em Meio LB-B (Sem triptone) com Glicose como principal fonte de carbono, Biorreator de 5L, 20% de oxigênio dissolvido e controle de pH = 7,5 a 30°.

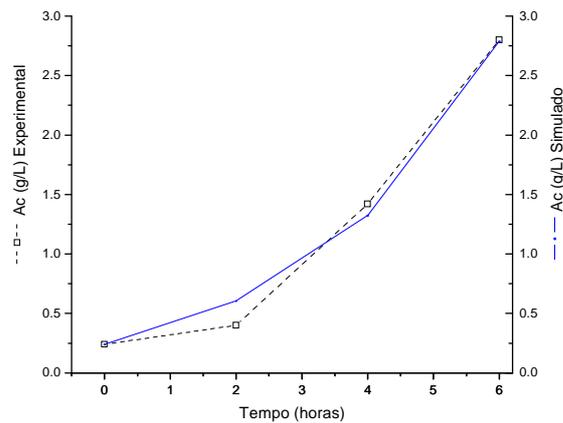
O conjunto de dados do Cultivo1 (ensaio para parte em batelada) foi utilizado para estimativa dos valores dos parâmetros. Na Tabela 4.8, são apresentados os resultados do ajuste do modelo de Monod, sem inibição, aos dados do cultivo 1.

Tabela 4.8. Valores estimados pelo SA dos parâmetros do modelo de Monod.

Parâmetros do Modelo							
K_S	μ_{max}	$Y_{X/S}$	K_D	A	$Y_{Ac/S}$	β	m
0.2493	0.3521	0.8451	0.0000	0.7744	0.8259	0.0	0.0000

A figura 4.27 apresenta uma comparação entre os dados experimentais e os dados simulados usando o modelo matemático (item 2.7.1), com uma cinética de crescimento usando o modelo de Monod sem inibição e a produção de acetato parcialmente associada ao crescimento.





(c)

Figura 4.27. Comparação entre os valores estimados pelo SA dos parâmetros com o modelo de Monod sem inibição.

Na figura 4.27 (a), (b) e (c) é possível observar que houve uma aderência muito boa do modelo às variáveis de estado C_x , C_s e C_p (Acetato) com o uso da equação de Monod simples, e a equação de Luedeking-Piret na produção de ácido acético. O uso do termo de produção associada ao crescimento se ajustou bem para a produção de ácido, já que é possível observar uma produção de acetato bem associada ao crescimento na figura 4.12, pois desde o início do cultivo o microrganismo teve uma produção deste metabólito que acompanhou o crescimento até que atingiu a fase estacionária.

A figura 4.28 mostra o gráfico com as equações usadas para o ajuste do crescimento celular para o PV 361.

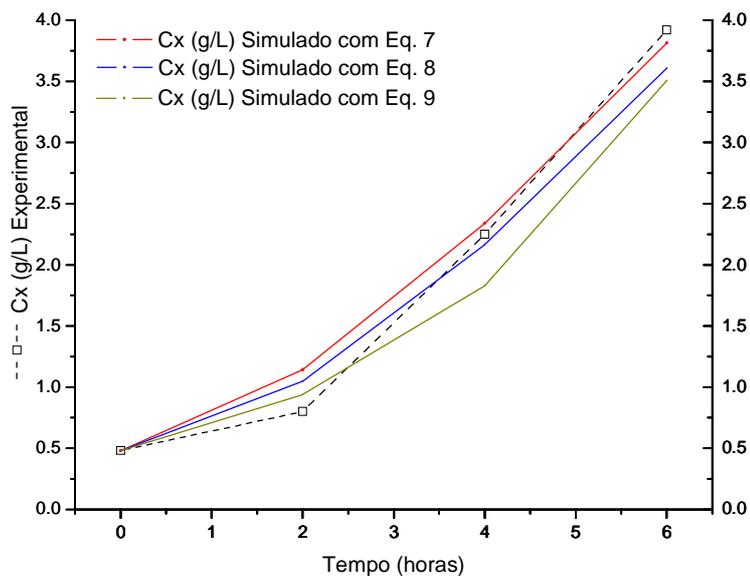


Figura 4.28. Comparação entre as equações usadas para ajuste de parâmetros e simulação do crescimento celular com inibição.

Após observar a figura anterior, a equação que apresentou um melhor ajuste foi a equação 7, esta foi escolhida para ajustar os parâmetros e simular o crescimento celular do microrganismo com inibição.

A continuação a tabela 4.9 são apresentados os resultados do ajuste do modelo usando a equação 7 com inibição, aos dados do cultivo 1.

Tabela 4.9. Valores estimados pelo SA dos parâmetros do modelo de Monod com inibição (equação 7).

Parâmetros do Modelo								
K_S	μ_{max}	$Y_{X/S}$	K_D	α	$Y_{Ac/S}$	β	m	K_i
0.2013	0.4929	0.8488	0.0000	0.7345	0.8327	0.00	0.0000	4,5149

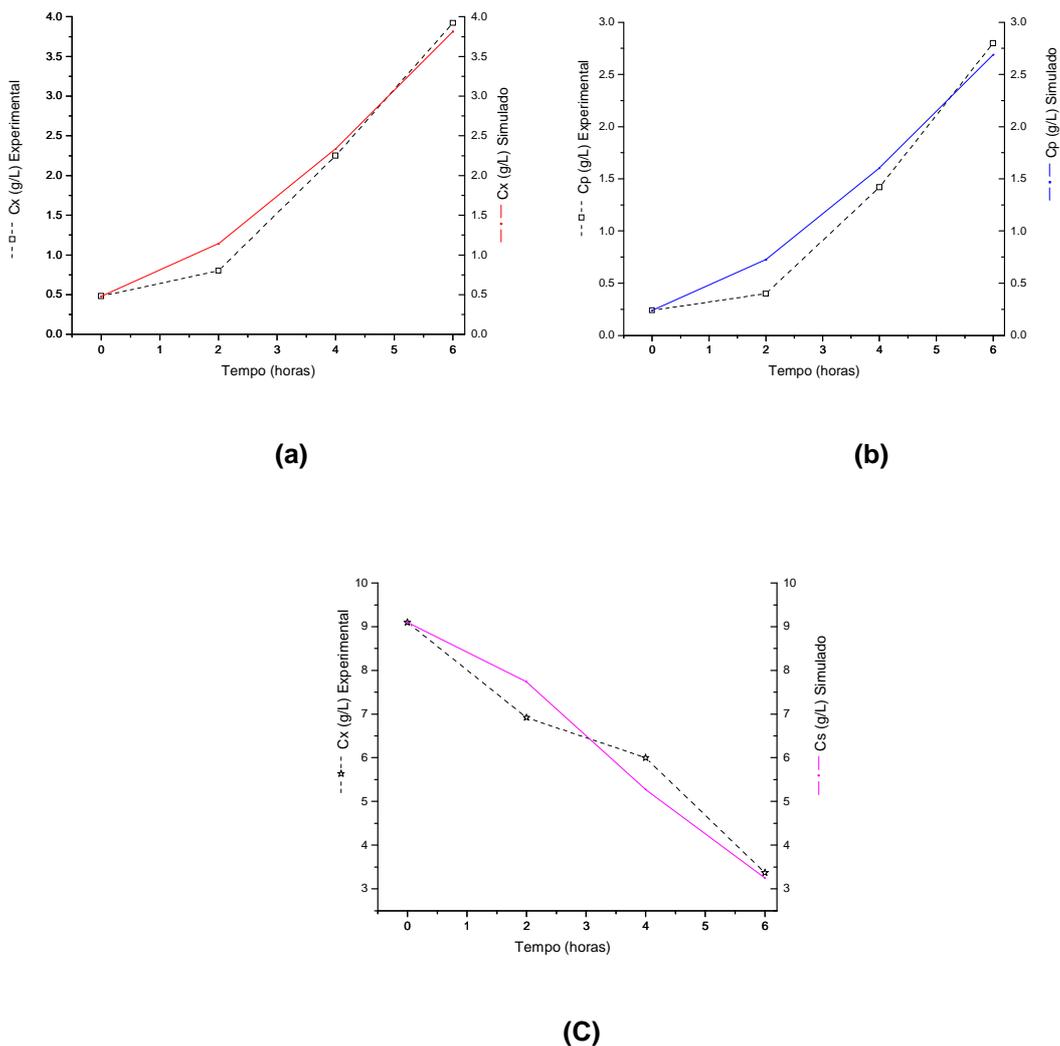


Figura 4.29. Comparação entre os valores estimados pelo SA dos parâmetros com o modelo de Monod com inibição (equação 7).

É possível observar que existe um ajuste muito bom também usado a quando se usa a equação de Monod modificada, (com inibição) figura 4.29(a),(b) e (c), possivelmente houve um bom ajuste com uma equação de Monod simples porque para a fase de batelada o microrganismo ainda não experimento uma inibição pela quantidade de ácido acético (~3 g/L), o que indica que esta concentração do ácido ainda não é na qual o microrganismo cessa o crescimento celular.

4.3.2 Estimativa de parâmetros para o Cultivo 2

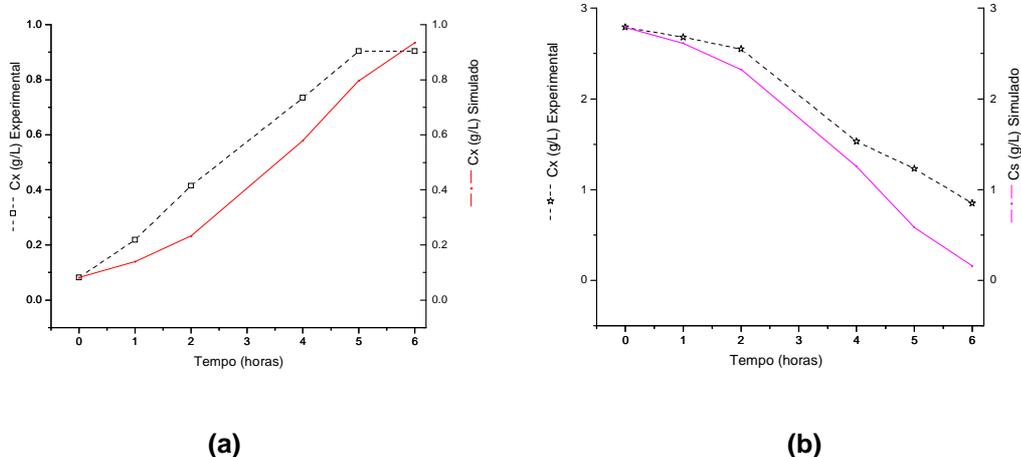
Para o crescimento do *Bacillus megaterium* PV 361 em Meio Semi – sintético com Glicose como principal fonte de carbono, Biorreator de 5L, 20% de oxigênio dissolvido e controle de pH = 5,2 a 37°.

A Tabela 4.10 mostra os parâmetros usando uma equação de crescimento sem inibição. Para a linhagem PV 361 crescendo no meio SNB.

Tabela 4.10. Valores estimados pelo SA dos parâmetros do modelo de Monod.

Parâmetros do Modelo							
K_S	μ_{max}	$Y_{X/S}$	K_D	α	$Y_{Ac/S}$	β	m
1,2691	0,7738	0,3752	0,0000	0,2414	0,5721	0,0000	0,0001

A figura 4.30 apresenta uma comparação entre os dados experimentais e os dados simulados usando o modelo matemático (item 2.7.1), com uma cinética de crescimento usando o modelo de Monod sem inibição para o crescimento do PV 361 no meio Semi-sintético.



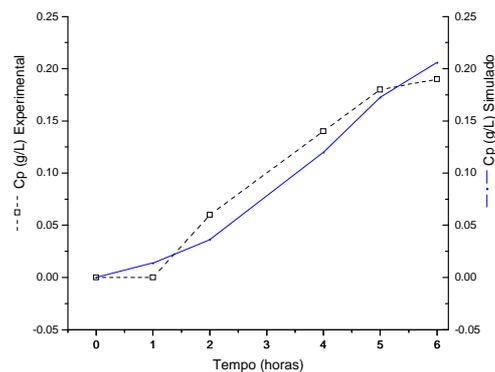


Figura 4.30. Comparação entre os valores estimados pelo SA dos parâmetros com o modelo de Monod sem inibição (equação 3).

Na figura 4.30 é possível observar que para este cultivo não houve um ajuste bom, pois inicialmente não existiu um crescimento exponencial durante a batelada e modelo matemático usado descreveu um crescimento exponencial por isso a comparação entre dos dados experimentais e os dados simulados ficaram muito diferentes. A figura 4.30 (a) (dados experimentais) mostra um crescimento limitado pela ausência de um ou mais nutrientes essenciais para o crescimento do microrganismo, descartando assim qualquer possibilidade de inibição pelo produto o qual só atingiu 0,20 g/L na máxima concentração.

Para o ajuste do produto, já a simulação mostrou um ajuste melhor, possivelmente porque o ácido fórmico apresenta uma produção associada ao crescimento, o que foi bem representada pela equação de Luedeking-Piret.

Não foi necessária a utilização de uma cinética de crescimento com inibição pelo produto, devido às baixas concentrações do ácido fórmico.

4.3.3 Estimativa de parâmetros para o Cultivo 3

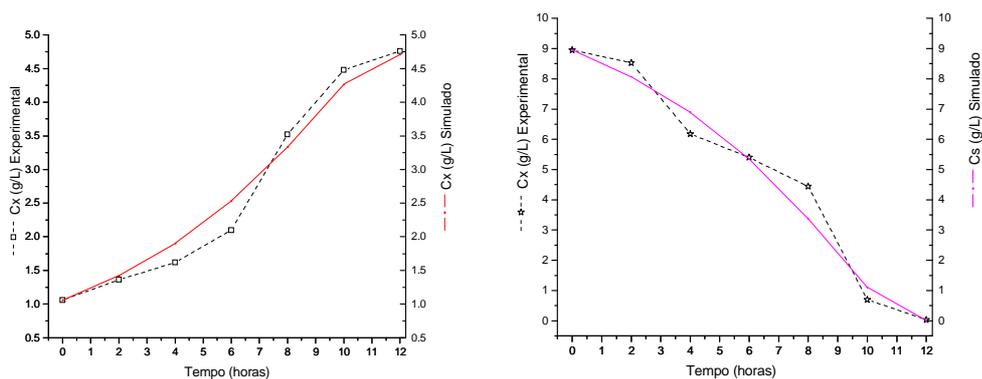
Para o crescimento do *Bacillus megaterium* PV 361 em Meio SNB com Glicose como principal fonte de carbono, Bioreator de 2L, 20% de oxigênio dissolvido e controle de pH = 7,5 a 30°.

A Tabela 4.11 mostra os parâmetros usando uma equação de crescimento sem inibição. Para a linhagem PV 361 crescendo no meio SNB.

Tabela 4.11. Valores estimados pelo SA dos parâmetros do modelo de Monod simples.

Parâmetros do Modelo										
K_S	μ_{max}	$Y_{X/S}$	K_D	α	$Y_{Ac/S}$	β	m	$Y_{Lac/S}$	δ	θ
0,574	0,157	0,561	0,000	0,433	0,742	0,000	0,000	0,139	0,011	0,184

A figura 4.31 apresenta uma comparação entre os dados experimentais e os dados simulados usando o modelo matemático (item 2.7.1), com uma cinética de crescimento usando o modelo de Monod sem inibição.



(a)

(b)

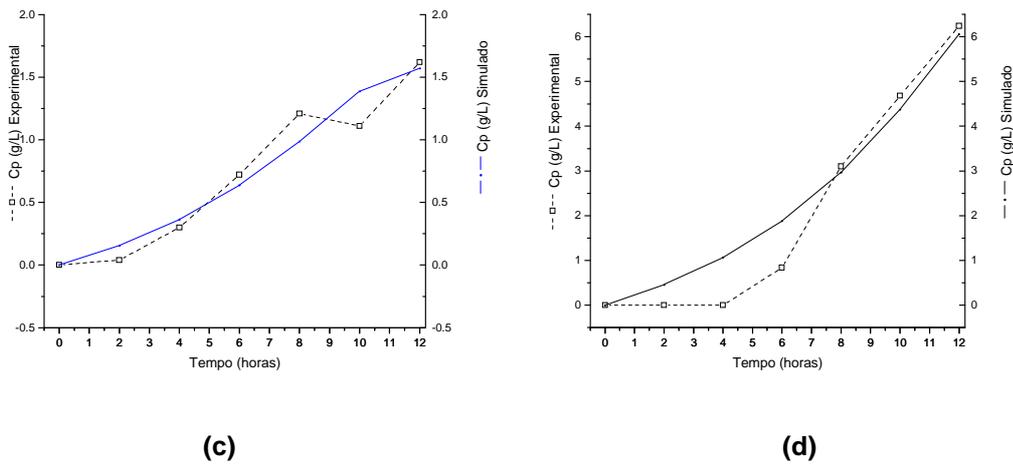


Figura 4.31. Comparação entre os valores estimados pelo SA dos parâmetros com o modelo de Monod sem inibição (equação 3).

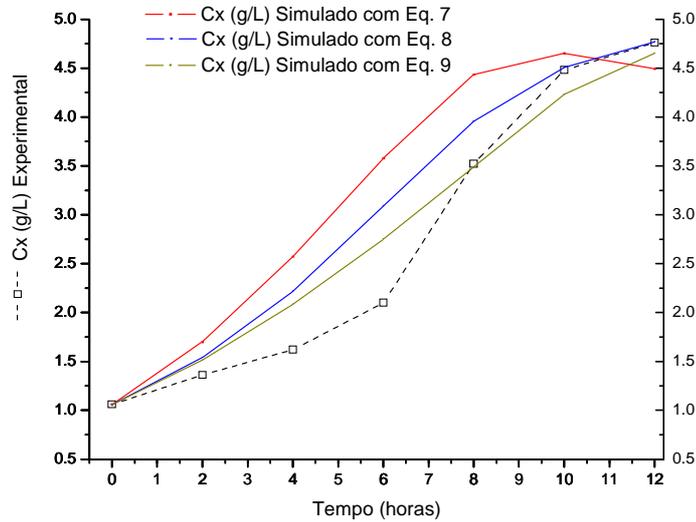
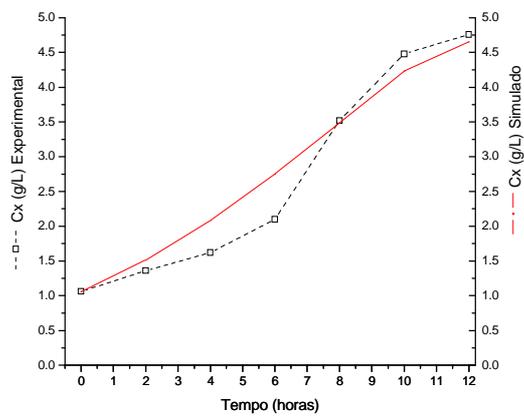


Figura 4.329. Comparação entre os valores estimados pelo SA dos parâmetros com o modelo de Monod com inibição (equações 7, 8 e 9).

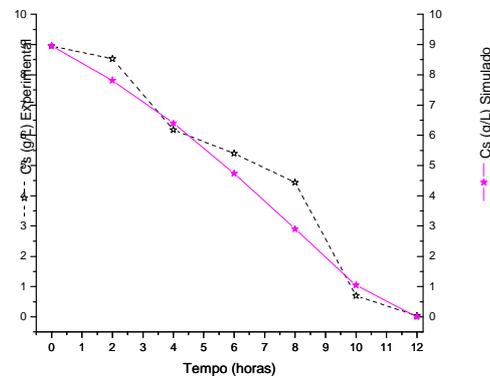
A continuação a tabela 4.12 mostra os parâmetros usando uma equação de crescimento com inibição que foi escolhida após uma comparação entre as possíveis equações com inibição que foram utilizadas para a simulação. (vide figura 4.32).

Tabela 4.12. Valores estimados pelo SA dos parâmetros do modelo de Monod com inibição (equação 9).

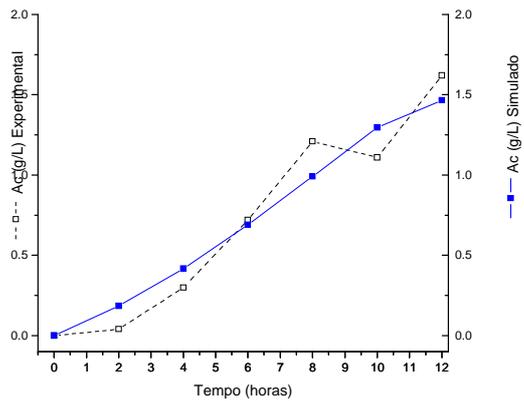
Equação	Parâmetros											
	K_S	μ_{max}	$Y_{X/S}$	K_D	α	$Y_{Ac/S}$	m	β	δ	θ	K_i	$Y_{Lac/S}$
9	0,124	0,190	0,617	0	0,408	0,5121	0,00	0	0,010	0,190	4,721	0,145



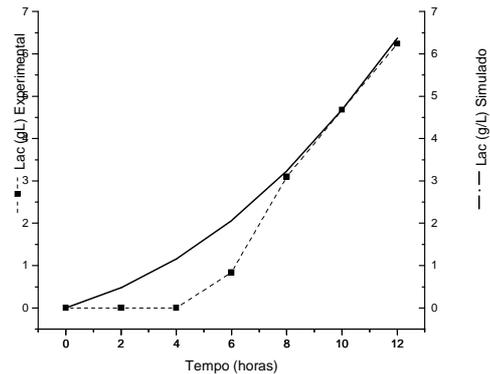
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 4.33. Comparação entre os valores estimados pelo SA dos parâmetros com o modelo de Monod com inibição (equação 9).

Fazendo a comparação entre dos modelos matemáticos usando a equação de Monod sem inibição da figura 4.31 e Monod modificada figura 4.33, é possível observar que para o crescimento celular houve um ajuste muito bom para o modelo que uso a equação de Monod modificada, pois no final da batelada entre as 4 e 6 horas quando o ácido láctico tinha uma alta concentração ($> 4,5$ g/L) a figura 4.33 (a) ilustra como houve uma variação na velocidade de crescimento celular após se atingiu esta concentração de ácido láctico. Simulações foram feitas com inibição pelo ácido acético, mas o resultado não apresenta uma variação significativa no crescimento, em comparação a o uso de o ácido láctico como produto inibidor o qual apresento um ajuste qualitativamente razoável.

Finalmente estes modelos e os ajustes de parâmetros que foram encontrados para o cultivo de *bacillus megaterium* PV 361, serão utilizados para futuros cultivos de *bacillus megaterium* recombinante produzindo a proteína de interesse, já que o crescimento celular do microrganismo recombinante deve-ser igual o muito parecido com a linhagem selvagem. Estes modelos serão utilizados para o desenvolvimento de uma estratégia de controle para obter uma alimentação ótima de meio suplementar com o fim de atingir alta densidade celular, evitando a produção de metabólitos, e posteriormente realizar a indução para produção da enzima.

5. CONCLUSÕES

♣ Ensaio em *shaker* para as três linhagens de *Bacillus megaterium*, com a omissão de triptona no meio de cultivo, mostraram que este nutriente não é essencial no crescimento do microrganismo. Há uma maior concentração celular após 12 horas de cultivo no meio em que a triptona foi substituída por extrato de levedura. Isso pode ser atribuído ao fato de que houve uma maior concentração inicial de aminoácidos nesse caso, e o microrganismo consome preferencialmente alguns deles.

♣ Ensaio onde o soro de queijo foi adicionado em uma concentração de 10 g/L ao meio de crescimento celular em *shaker* e em biorreator, mostraram que este é um nutriente importante para o crescimento do microrganismo, levando a incremento de até 20% no crescimento celular em *shaker*, e de 30% para o biorreator (com 20% de oxigênio dissolvido e pH de 7,5).

♣ Ensaio realizado em biorreator de 5L para o *Bacillus megaterium* PV 361 apresentaram importante produção de ácido acético na presença de oxigênio, associada ao crescimento. Isso permite concluir que esta bactéria, na presença de altas concentrações de glicose (10 g/L), satura as vias respiratórias, entrando na rota fermento-respiratória, o efeito *crabtree*.

♣ Nos dois ensaios realizados utilizando o meio SNB observou-se acúmulo de ácido láctico em maiores proporções que o ácido acético. Nesses ensaios, em biorreator de 2 L, ocorreram importantes oscilações na concentração de oxigênio dissolvido. A fermentação láctica, induziu o stress metabólico, o qual, é uma possível causa para esse comportamento. Os resultados obtidos mostraram que as altas concentrações de ácido láctico conduziram o microrganismo a experimentar uma inibição pelo produto, e posteriormente a entrar em esporulação.

♣ Estimação de parâmetros e modelos cinéticos baseados na equação de Monod e modificações, com inibição pelos produtos, descreveram bem o cultivo aeróbico de *Bacillus megaterium* PV 361 durante a fase batelada, em diferentes meios de cultivo.

6. SUGESTÕES

Com base aos experimentos realizados neste trabalho, serão apresentadas as seguintes sugestões:

- ♣ Realização de novos ensaios, com uma concentração baixa de glicose (~ 3 g/L) na batelada para minimizar a produção de ácidos, além manter o μ baixo durante todo o cultivo e baixar a concentração de substrato na alimentação para evitar o acúmulo de metabolitos e avaliar outras fontes de carbono como possível substratos para evitar a produção excessiva de ácidos.
- ♣ Aplicação de controle ótimo para estimar uma alimentação ótima em batelada alimentada que maximize a produção de biomassa, crescimento em alta densidade celular.
- ♣ Implementar uma metodologia para a medição de esporos, com o fim de implementar um modelo matemático que represente o crescimento do microrganismo incluindo a produção de esporos.
- ♣ Realização de ensaios em *shaker* para estimar a concentração de ácido láctico e ácido acético a partir da qual o crescimento celular cessa. (concentração crítica de ácidos que gera a inibição) para avaliação de novos modelos para a cinética de crescimento.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, F.; COONEY, C. L. Penicillin Amidase Production by *Bacillus megaterium*, **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 15, p. 493-503, 1973.

ALFORD J. Bioprocess control: Advances and challenges. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 30, p. 1464-1475, 2006.

ARAÚZO-BRAVO M.J. et al. Automation of a penicillin production process with soft sensors and an adaptive controller based in neuro-fuzzy systems. **Control Engineering Practice**, vol. 12, p. 1073-1090, 2004.

ASCENCIO P.; SBARBARO D.; AZEVEDO S.F. An adaptive fuzzy hybrid state observer for bioprocesses. **IEEE Transactions on Fuzzy Systems**, vol. 12, p. 641-651, 2004.

BAILEY, J.E.; OLLIS, D.F. *Biochemical Engineering Fundamentals*, 2a edição, McGraw Hill, 1986.

BIEDENDIECK, R, et al. Plasmid System for the intracellular production and purification of affinity-tagged proteins in *Bacillus megaterium*. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 96, p. 525-537, 2006.

BIEDENDIECK R. et al. A sucrose-inducible promoter system for the intra- and extracellular protein production in *Bacillus megaterium*. **Journal of Biotechnology**, Vol. 132, p. 426-430, 2007.

BOGAERTS P.H.; WOUWER A.V. Parameter identification for state estimation - application to bioprocess software sensors. **Chemical Engineering Science**, vol. 59, p. 2465-2476, 2004.

BRUGGNIK A.; ROY P.D. *Synthesis of β -lactam antibiotics*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 2001.

BURGER S. et al. Expression of recombinant *Clostridium difficile* toxin A using the *Bacillus megaterium* system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 307, p. 584-588, 2003.

CHAN C. et al. Applications of multivariate analysis to optimize function of cultures hepatocytes. **Biotechnology Progress**, vol. 19, p. 580-598, 2003.

CHEN L.Z. et al. Soft sensors for on-line biomass measurements. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 26, p.191-195, 2004a.

CHEN L.Z. et al. Modeling and optimization of fed-batch fermentation processes using dynamic neural networks and genetic algorithms. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 22, p. 51-61, 2004b.

CIMANDER C.; MANDENIUS D.F. Bioprocess control from a multivariate process trajectory. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 26, p. 401-411, 2004.

COSTA A.C. et al. An adaptive optimal control scheme based on hybrid neural modelling. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 22, p. S859-S862, 1998.

COSTA A.C.; MELEIRO L.A.C.; MACIEL FILHO R. Non-linear predictive control of an extractive alcoholic fermentation process. **Process Biochemistry**, vol. 38, p. 743-750, 2002.

CRUZ A.J.G. et al. A hybrid feedforward neural network model for cephalosporin production process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 17, p. 587-597, 2000.

DE BARY A. In *Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bakterien*, p. 500, Wilhelm Engelmann, Leipzig, East Germany, 1884.

FAULKNER E. et al. Use of fed-batch cultivation for achieving high cell densities for the pilot-scale production of a recombinant protein (phenylalanine dehydrogenase) in *Escherichia coli*. **Biotechnology Progress**, vol. 22, p. 889-897, 2006.

FRAHM B. et al. Adaptive, model-based control by the open-loop-feedback-optimal (OLFO) controller for the effective fed-batch cultivation of hybridoma cells. **Biotechnology Progress**, vol. 18, p. 1095-1103, 2002.

FURCH T. et al. Comparative study on central metabolic fluxes of *Bacillus megaterium* strains in continuous culture using ^{13}C labelled substrates. **Bioprocess Biosyst Eng**, vol. 30, p. 47-59, 2007.

GADKAT K.G.; MEHRA S.; GOMES J. On-line adaptation of neural networks for bioprocess control. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 29, p. 1047-1057, 2005.

GALVANAUSKAS V.; SIMUTIS R.; LUBBERT A. Hybrid process models for process optimisation, monitoring and control. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 26, p. 393-400, 2004.

GNOTH S. et al. JENZSCH Control of cultivation processes for recombinant protein production: a review. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 31, p. 21-39, 2008.

GIORDANO R.C.; RIBEIRO M.P.A.; GIORDANO R.L.C. Kinetics of β -lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. **Biotechnology Advances**, vol. 24, p. 27-41, 2006.

GIORDANO R.C. et al. Online filtering of CO₂ signals from a bioreactor gas outflow using a committee of constructive neural networks. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2008. on line, acesso disponível em: <DOI 10.1007/s00449-007-0152-x>, Acesso em: AGOSTO 2010.

GOMBERT A.K.; KILIKIAN B.V. Recombinant gene expression in *Escherichia coli* cultivation using lactose as inducer. **Journal of Biotechnology**, vol. 60, p. 47-54, 1998.

GONÇALVES L.R.B. et al. Enzymatic synthesis of ampicillin: avoiding limitations of the mechanistic approach for reaction kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 80, p. 622-631, 2002.

HOJO, O. **Estudo sobre a Producao de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945**. p. 123. (Mestrado em Engenharia química) – Departamento de Engenharia química, Universidade Federal de São Carlos, 1997.

HOLLMANN R.; DECKWER W-D. Pyruvate formation and suppression in recombinant *Bacillus megaterium* cultivation. **Journal of Biotechnology**, vol. 111, p. 89-96, 2004.

HORTA, L.A.C. **Tecnicas Computacionais Inteligentes para a Inferencia de Estado e a Otimizacao de Cultivos de *Streptococcus pneumoniae***. p. 101. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2008.

HUANG, H. et al. A secreted model for heterologous amylase production by *Bacillus subtilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, vol 32, p. 407- 413, 2003.

HUANG, Y.H. et al. Cloning and expression of the PGA gene of *Bacillus megaterium* in *E. coli*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, vol. 30, p.107-113, 1998.

ILLAES, A. Production of Penicillim G Acylase from *Bacillus megaterium* in Complex and Defined Media. **Process Biochemistry**, vol. 29, p. 263-270, 1994.

OLLIS, D. F. A simples batch fermentation model: theme and variations. **Annals of the New York Academy of Sciences** , vol. 413, p. 44 – 56,1983.

IYER M.S.; WUNSCH D.C. Dynamic re-optimization of a fed-batch fermentor using adaptive critic designs. **IEEE Transactions on Neural Networks**, vol. 12, p. 1433-1444, 2001.

JOEONG J. W.; SNAY J.; ATAAI M. M. A mathematical model for examining growth and sporulation process of *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 35, p. 60 - 84 , 1990.

KARIM M.N.; HODGE D.; SIMON L. Data-based modeling and analysis of bioprocesses: some real experiences. **Biotechnology Progress**, vol. 19, p. 1591-1605, 2003.

KWON, S. et al. High-rate continuous production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* in two-stage membrane cell-recycle reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 73, p 25-34, 2001

KOMIVES C.; PARKER R.S. Bioreactor state estimation and control. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 14, p. 468-474, 2003.

LEE S.Y.; High cell density culture of *Escherichia coli*. **TIBTECHT**, vol.14, p. 98-105,1996.

LEHNINGER A. L. **Princípios de Bioquímica**.3. Edição, São Paulo, Sarvier, 2002.

MACRAE R. M.; WILKINSON J. F. Poly- β -hydroxybutrate Metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*.**Journal of General Microbiology**, vol. 19, p. 210-222, 1958.

MALTEN M.; HOLLMANN R.; DECKWER W.D. Production and secretion of recombinant *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase DsrS in *Bacillus megaterium*. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 89, p. 206-218, 2005a.

MALTEN M. et al. Co-expression of the type I signal peptidase gene sipM increases recombinant protein production and export in *Bacillus megaterium* MS941. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 91, p. 616-691, 2005b.

MALTEN M. et al. A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium. **Applied Environmental Microbiology**, vol. 72, p. 1677–1679, 2006.

MAHADEVAN R.; DOYLE F.J. On-line optimization of recombinant product in a fed-batch bioreactor. **Biotechnology Progress**, vol. 19, p. 639-646, 2003.

MANDENIUS C-F. Recent developments in the monitoring, modeling and control of biological production systems. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 26, p. 347-351, 2004.

MARTIN L.; PRIETO, M. A.; CORTES, 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.

MEINHARDT F.; STAHL U.; EBELING W. Highly efficient expresion of homologus and heterologous genes in *Bacillus megaterium*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 30, p. 343-350, 1989.

MURAO, S.; SAKAGUCHI, K., KONO, K. Process for Preparing 6-aminopenicillanci Acid by *Bacillus megaterium*, **U.S. Patent 3**, p. 144-395, 1964.

MUSTEA I.; MURESIAN T.; Crabtree efect in some bacterial cultures, **Cancer**, vol. 20, p. 1499 – 1501, 1966.

NUCCI E.R. Silva Comparing the performance of multilayer perceptrons networks and neuro-fuzzy systems for on-line inference of *Bacillus megaterium* cellular concentrations. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol. 30, p. 429-438, 2007.

PANBANGRED, W. et al. High expression of the penicillin G acylase gene (pac) from *Bacillus megaterium* UNI in its own pac minus mutant. **Journal of Applied Microbiology**, vol. 89, p. 152-157, 2000.

PINOTTI, L. 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. Influencia de Diferentes Fontes de Caborno e Nitrogenio na Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **Anais do XIV Simpósio Nacional de Fermetações (SINAFERM)**, Santa Catarina, 2003. P.1-6.

PINTO, G. A.; SOUZA JR R.; GIORDANO R.C. Comparison of performances of different algorithms in noisy signals filtering of process in enzymatic hydrolysis of cheese whey. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 48, p. 151-159, 2005

PRIEST, F.G. **Bacteriology**. Rev. vol 41, p. 711-753, 1977

RIESENBERG R.; GUTHKE R. High cell density cultivation of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 51, p. 422-430, 1999.

RIBEIRO M. P. A.; GIORDANO R. C. Variational calculus (optimal control) applied to the optimization of the enzymatic synthesis of ampicillin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 48, p. 19-28, 2005.

ROTH N G.; LIVELY D. H. Germination of spores certain aerobic bacilli under anaerobic conditions. **Journal of Bacteriology**, vol. 71, p. 162 – 166, 1956.

RYGUS T., HILLEN W. Inducible high-level expression of heterologous genes in *Bacillus megaterium* using the regulatory elements of the xylose-utilization operon. **Applied Microbiology and Biotechnology**, vol. 35, p. 594-599, 1991

SAVIDGE T. A.; COLE, M.; Penicillin Acylase (bacterial). **Methods in Enzymology**, vol. 43, p. 705-721, 1975.

SAUCEDO V.M.; KARIM M.N.; Real time optimal feeding in a fermentor using a Markov decision algorithm. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 22, p. 547-558, 1998.

SEBEK O.K., **Biotechnology**, chapter 7, 1987.

SHEWALE J. G.; SIVARAMAN, H.; Penicillin Acylase: Enzyme Production and its Application in the Manufacture of 6-APA. **Process. Biochemistry.**, p. 146-154, 1989.

SHIN H.S.; LIM H.C. Optimization of metabolic production in fed-batch cultures: use of sufficiency and characteristics of singular arc and properties of adjoint vector in numerical computation. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, vol. 46, p. 2526-2534, 2007.

SHUGERL K.; Progress in monitoring, modeling and control of bioprocesses during the last 20 years. **Journal of Biotechnology**, vol. 85, p. 149-173, 2001.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: basic concepts**. Prentice Hall, Englewood Cliffs, 2002.

Silva, R. G. **Técnicas de inferencia de Estado Aplicadas ao Processo de Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945**. p. 238, Dissertação (Mestrado em Engenharia química) – Departamento de Engenharia química, Universidade Federal de São Carlos, 2003.

SILVA R.G. et al. A hybrid neural network algorithm for on-line state inference that accounts for differences in inoculum of *Cephalosporium acremonium* in fed-batch fermentors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 91, p. 341-352, 2001.

SILVA R.G. et al. Artificial neural networks to infer biomass and product concentration during the production of penicilin G acilase from *Bacillus megaterium*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, on-line, DOI 10.1002/jctb.1864, 2008.

SOUZA, V. R. **Requerimentos Nutricionais na Producao de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium* ATCC 14945**, p. 100, Dissertação (Mestrado em Engenharia química) – Departamento de Engenharia química, Universidade Federal de São Carlos, 2003.

SOUZA Jr R. et al. GMC-fuzzy control of pH during enzymatic hydrolysis of cheese whey proteins. **Computers and Chemical Engineering**, vol .28, p. 1661-1672, 2004.

SOUZA, V. et al. Characterization of the penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 48, p. 105-111, 2005.

SRINIVASAN B.; BONVIN D. Real-time optimization of batch processes by tracking the necessary conditions of optimality. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, vol. 46, p. 492-504, 2007.

STIGTER J.D.; KEESMAN K.J. Optimal parametric sensitivity control of a fed-batch reactor. **Automatica**, vol. 40, p. 1459-1464, 2004.

SUÁREZ D.C.; KILIKIAN B.V. Acid acetic accumulation in aerobic growth of recombinant *E. coli*. **Process Biochemistry**, vol. 35, p. 1051-1055, 2000.

TANGLER, S.; DECASPER S.; SAUER U. Maintenance metabolism and carbon fluxes in *Bacillus* species. **Microbial cell Factories**, vol. 7, p. 7-19, 2008

THIBAUT J.; VAN BREUSEGEM V.; CHÉRUY A.; On-line prediction of fermentation variables using neural networks. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 36, p. 1041-1048, 1990.

THIERE J.; MICHEL J.; PENNINCKY.; Possible occurrence of a Crabtree Effect in the production of Lactic and Butyric Acids by a Floc-Forming Bacterial Consortium. **Current Microbiology**, vol 48, p. 224-229, 2004.

TONIN, FC. **Avaliacao de Variaveis Operacionais e Aplicacao de Enfoque Híbrido na Modelagem do Processo de Produção de Penicilina G Acilase por *Bacillus megaterium***, p. 85, Dissertação (Mestrado em Engenharia química),– Departamento de Engenharia química, Universidade Federal de São Carlos, 2005.

VARY P.S.; Prime time for *Bacillus megaterium*. **Microbiology**, vol. 140, p. 1001-1013, 1994.

VASALA A.; PANULA J.; NEUBAUER P.; Efficient lactic acid production from high salt containing dairy by-products by *Lactobacillus salivarius* ssp. *salicinius* with pre-treatment by proteolytic microorganisms. **Journal of Biotechnology**, vol. 117, p. 421-431, 2005.

WOUVER A.V.; RENOTTE C.; BOGAERTS P.H. Biological reaction modeling using radial basis function networks. **Computers and Chemical Engineering**, vol. 28, p. 2157-2164, 2004.

YANG S. et al. High expression of penicillin G acylase gene from *Bacillus megaterium* in *Bacillus subtilis*. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, vol.31, p. 601-603, 1999.

YANG S. et al. Expression and purification of extracellular penicillin G acylase in *Bacillus subtilis*. **Protein Expression and Purification**, vol. 21, p. 60-64, 2001.

YANG, Y. et al. 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.

YANG, Y. et al. Condon Optimized *Thermobifida fusca* hydrolase secreted by *Bacillus megaterium*. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 96, p. 780-794, 2007.

YOON S.M.; KIM S.C.; KIM J.H.; Identification of inhibitory metabolites in high density culture of recombinant *Bacillus megaterium* PCK108. **Biotechnology Letters**, vol. 16, p. 1011-1014, 1994.