

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

**PURIFICAÇÃO DE PENICILINA G ACILASE PRODUZIDA POR *Escherichia coli*
E *Bacillus Megaterium* RECOMBINANTES**

Lucas Miguel Altarugio

São Carlos, SP
2014

LUCAS MIGUEL ALTARUGIO

**PURIFICAÇÃO DE PENICILINA G ACILASE PRODUZIDA POR *Escherichia coli*
E *Bacillus Megaterium* RECOMBINANTES**

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

Orientadora: Prof. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano
Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

São Carlos, SP

2014

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

A465pp

Altarugio, Lucas Miguel.

Purificação de penicilina G acilase produzida por
Escherichia coli e *Bacillus megaterium* recombinantes /
Lucas Miguel Altarugio. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
93 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2014.

1. Engenharia bioquímica. 2. Penicilina G acilase. 3.
Escherichia coli. 4. *Bacillus megaterium*. 5. Troca iônica. 6.
Enzimas - purificação. I. Título.

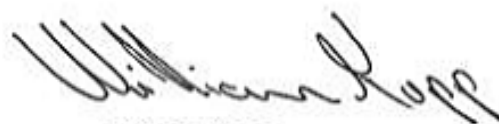
CDD: 660.63 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE LUCAS MIGUEL ALTARUGIO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 28 DE MARÇO DE 2014.

BANCA EXAMINADORA:



Paulo Waldir Tardioli
Coorientador, UFSCar



Willian Kopp
UFSCar



Viviane Maimoni Gonçalves
Instituto Butantan

*Dedico este trabalho
aos meus pais, pelo apoio
incondicional, à minha namorada
e a todos meus amigos.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, e pelas oportunidades que me foram concedidas.

Aos meus pais pela confiança em meu trabalho, apoio e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Agradeço ao Departamento de Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Agradeço aos orientadores Profa. Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano e Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli, pela paciência e excelência na minha formação técnica e pessoal.

A minha namorada Jéssica que sempre me apoiou e incentivou nos momentos mais difíceis deste trabalho, pelo seu companheirismo e carinho.

Agradeço à todos os amigos da Engenharia Bioquímica, Ana Velez, Ana Isabel, Gilson, Gabriel, Cleiton, Renata Porto, Renata Beraldo, Cíntia, Murilo, Jorge, Lionete, Vinícius, Willian, Liliane, Felipe, Thais e Mayerlenis. Aos técnicos Amadeus, Thaís, Aline e Thiago.

Agradeço a todos meus amigos de Santa Cruz das Palmeiras pelo companheirismo e amizade.

Agradeço aos colegas do curso do MTA em Sertãozinho, que estiveram comigo estes dois anos de mestrado.

Agradeço a todos os professores da Universidade Federal de Alfenas que me proporcionaram uma ótima formação para que eu pudesse realizar com sucesso mais essa etapa.

Agradeço a todos professores do DEQ que contribuíram na minha formação técnica, os quais me forneceram conhecimento além da minha área de formação

Agradeço aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES, CNPQ e FAPESP, que financiaram a bolsa e todos os materiais e equipamentos necessários para realização desse trabalho.

Agradeço a todos que contribuíram com a minha formação.

RESUMO

Penicilina G acilase (PGA) é a enzima chave para a produção industrial de antibióticos β -lactâmicos. Grande parte da demanda atual pela enzima é atendida pela sua produção por *Escherichia coli* e *Bacillus megaterium* geneticamente modificados. A enzima produzida por *Escherichia coli* acumula-se no espaço periplasmático da bactéria, requerendo rompimento celular para sua recuperação, enquanto que a enzima produzida por *Bacillus megaterium* é secretada para o meio de produção. Este trabalho teve como objetivo avaliar a adsorção de PGA produzida por esses dois microrganismos recombinantes em resinas catiônicas e aniônicas para recuperação e purificação da enzima. Para PGA de *E. coli* avaliou-se a adsorção iônica da enzima na resina de troca catiônica STREAMLINE SP XL[®] após rompimento celular por sonicação. Nesta etapa, avaliou-se a influência do tampão e do pH, visando reduzir a perda de enzima por inativação e ajustar o pH a um valor apropriado para uma posterior adsorção seletiva da enzima. Os tampões avaliados foram acetato, citrato, fosfato e carbonato, ajustados para valores de pH entre 4,5 e 11,0. Não se observou desnaturação da enzima nos tampões e pHs avaliados. Contudo, observou-se adsorção da enzima nos debrís celulares a valores de pH iguais ou menores que 5,4, sendo mais acentuada essa adsorção na presença de tampão acetato. Definiu-se, assim, rompimento celular em pH 6,0 para evitar perda de PGA por adsorção nos debrís e ajuste do pH e da molaridade do sal por diluição no próprio tampão da adsorção, para evitar desnaturação da enzima por redução local do pH quando se utiliza ácido concentrado. A resina STREAMLINE SP XL[®] mostrou maior capacidade de adsorção de PGA em pH 5,0, não sendo influenciada nas temperaturas avaliadas (4 e 25°C). A isoterma de Langmuir representou adequadamente os dados experimentais de adsorção da enzima nessa resina a 4 e 25°C (pH 5,0), com valores similares de q_m e K_L , 25,4 U/g e 185,2 U/g, respectivamente. A purificação de PGA em coluna de leito fixo apresentou recuperação global de atividade em torno de 50% e fator de purificação de aproximadamente 9 vezes. A capacidade de adsorção da resina de troca catiônica nesse modo de operação foi de 10,9 U_{NIPAB}/mL_{resina}. A purificação de PGA secretada por *Bacillus megaterium* recombinante, produzida em meio sintético, foi estudada por adsorção iônica da enzima nas seguintes resinas e valores de pH: STREAMLINE SP XL[®] e IMMOBEAD IB-C435 (resinas de troca catiônica, pHs 5,0, 5,5 e 6,0); MANAE-agarose ativada com 40 e 80 μ moles de grupos amino/g (resina de troca catiônica, pHs 6,0, 7,0 e 7,5); STREAMLINE DEAE XL[®] e STREAMLINE Q XL[®] (resinas de troca aniônica, pHs 7,5 e 8,5). Ensaio de equilíbrio para as resinas de troca catiônica STREAMLINE SP XL[®] (4°C, pH 5,0) e IMMOBEAD IB-C435 (4°C, pH 5,5) permitiram a estimativa dos parâmetros do modelo de Langmuir: $q_m = 76,6$ e $91,5$ U/g e $K_L = 294,7$ e $412,3$ U/g, respectivamente. Apesar da alta capacidade adsorvida dessas resinas, as mesmas não foram adequadas à purificação de PGA, pois adsorveram tanto PGA quanto proteínas contaminantes. As resinas MANAE-AGAROSE (40 e 80 μ moles/g) não foram eficazes na adsorção de PGA. As resinas STREAMLINE de troca aniônica não adsorveram quantidade significativa de PGA nos valores de pH avaliados, entretanto, adsorveram quase 50% de proteínas presentes no meio, mostrando-se assim seletiva para retirada das proteínas contaminantes. Ensaio de adsorção em coluna de leito fixo com STREAMLINE Q XL[®] (22°C, pH 8,0) mostraram que a resina é eficaz na adsorção de proteínas contaminantes, sendo possível a recuperação de aproximadamente 70% de PGA

com um fator de purificação de 4 vezes e alta atividade específica, em torno de 25 U/mg. Já na resina STREAMLINE SP XL[®] (22°C, pH 5,0) a recuperação total da enzima foi de 70%, mas com um fator de purificação de apenas 1,61 vezes e atividade específica em torno de 11 U/mg. Assim, conclui-se que a adsorção no modo aniônico é mais vantajosa, pois além de maior purificação, não dilui a enzima. O cultivo de *B. megaterium* recombinante em biorreator com alta densidade celular, utilizando meio complexo, permitiu atingir atividade volumétrica de PGA de 50 U/mL. Após concentração do extrato enzimático por ultrafiltração até 100 U/mL, avaliou-se a purificação da enzima em coluna de gel de filtração utilizando a resina Superdex 200 prep grad (22°C, pH 7,5). Essa técnica permitiu alta recuperação da enzima (>93%), entretanto com um fator de purificação de 3 vezes e atividade específica de 13 U/mg.

Palavras-chave: Penicilina G Acilase, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, Troca Iônica, Gel de Filtração, Purificação.

ABSTRACT

Penicillin G acylase (PGA) is the key enzyme for the industrial production of β -lactam antibiotics. Major current PGA demand is attended for producer organisms as *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium* genetically modified. The enzyme produced by *Escherichia coli* accumulates in the periplasmic space of the bacteria and it requires cell disruption for recovery, whereas the enzyme from *Bacillus megaterium* is secreted into the production medium. This study aimed to evaluate the adsorption of PGA expressed by these two recombinant microorganisms in cationic and anionic resins for recovery and purification of the enzyme. For *E. coli* PGA was evaluated ionic adsorption of the enzyme in Streamline SP XL[®] cation exchanger resin after cell disruption by sonication. In this step, we assessed the influence of pH and buffer, to reduce the loss of enzyme inactivation and adjust the pH to a value suitable for a subsequent selective adsorption of the enzyme. The buffers evaluated were acetate, citrate, phosphate and carbonate, and the values of pH were adjusted between 4,5 and 11,0. No denaturation of the enzyme was observed in buffers and pHs evaluated. However, it was observed enzyme adsorption in cellular debris at pH values equal or smaller than 5,4, this debris adsorption was more apparent in the presence of acetate buffer. Thus, cell disruption was defined at pH 6,0 to prevent loss PGA in the adsorption of debris and adjustment of pH and salt molarity by dilution in the appropriate buffer to prevent denaturation of the enzyme by local reduction of the pH when uses concentrated acid. The STREAMLINE SP XL[®] resin showed higher adsorption capacity of PGA at pH 5,0 and the temperature range (4 and 25°C) did not influence it. The Langmuir isotherm represented adequately the experimental data of the enzyme adsorption resin at 4 and 25°C (pH 5,0) with similar values of q_m and K_L 25,4 U/g 185,2 U/g, respectively. Purification of PGA in a fixed-bed column showed overall recovery of activity around 50% and purification factor of about 9 times. The adsorption capacity of cationic resin in this mode of operation was 10,9 U_{NIPAB}/ml_{resin}. The PGA purification secreted by *Bacillus megaterium* recombinant, produced in a synthetic medium, was studied by ion adsorption resins and the following pH values: Streamline SP XL[®] and IMMOBEAD IB-C435 (cation-exchanger resins, pH 5,0, 5,5 and 6,0); manae-agarose activated with 40 and 80mmoles/g amino groups (cation exchanger resin, pH 6,0, 7,0 and 7,5); STREAMLINE DEAE XL[®] and STREAMLINE Q XL[®] (anionic exchange resins, pH 7,5 and 8,5). Equilibrium experiments in cationic resins Streamline SP XL[®] (4°C, pH 5,0) and IB-C435 IMMOBEAD (4°C, pH 5,5) allowed estimation of the parameters of the Langmuir model $q_m = 76,6$ and $91,5$ U/g $K_L = 294,7$ and $412,3$ U/g, respectively. Despite the high adsorptive capacity of these resins, they were not suited to purification of PGA, because their adsorbes PGA and the contaminants. Manae-agarose resins (40 and 80 μ moles/g) were not effective in PGA adsorption. The STREAMLINE anionic exchangers resins not adsorbed significant amount of PGA in pH evaluated, however, this resin performed a adsorption of almost of 50% proteins present in the medium, demonstrating selective for removal contaminating proteins. Adsorption assays in fixed-bed column Streamline Q XL[®] (22°C, pH 8,0) showed that the resin is effective in adsorption of contaminating proteins, it is possible to recover approximately 70 % PGA with a purification factor of 4 times and high specific activity of about 25 U/mg. Already on STREAMLINE SP XL[®] (22°C, pH 5,0) resin, the total enzyme recovery was 70 %, but with a purification factor of only 1,61 times and specific activity of around 11 U/mg. It was concluded that adsorption in

anionic mode is more advantageous, because presents a better performance and avoid the enzyme dilution. The cultivation of recombinant *B. megaterium* in a high cell density bioreactor using complex medium, allowed to reach PGA volumetric activity of 50 U/mL. After concentration of the enzyme extract by ultrafiltration to 100 U/mL, was evaluated purification of the enzyme on gel filtration resin column using Superdex 200 Prep Grad (22 °C, pH 7,5). This technique allowed high enzyme recovery (>93%), however with a purification factor of 3 times and specific activity of 13 U/mg.

Keywords: Penicillin G acylase, *Escherichia coli*, *Bacillus megaterium*, ion exchange, gel filtration, purification.

Lista de Figuras

Figura 2.1- Estrutura básica da molécula de penicilina.	17
Figura 2.2- Conversão enzimática da penicilina G e cefalosporina G em 6-APA e 7-ADCA, liberando ácido fenil acético como produto secundário comum.	20
Figura 2.3 - Síntese de antibióticos β -lactâmicos catalisada por PGA.	21
Figura 2.4- Estrutura cristalina da PGA de <i>E. coli</i> complexada com o substrato penicilina G sulfoxido. Em verde aparece a subunidade alfa e em azul a subunidade beta. No centro da molécula, a tríade catalítica complexada com o substrato em preto (penicilina g sulfoxido), indicado em vermelho a Ser β 1, em amarelo Ala β 69 e em laranja a Asn β 241.	22
Figura 2.5- Mecanismo catalítico proposto para a ação da penicilina G acilase na hidrólise de penicilina G.	23
Figura 2.6 - Esquema geral de síntese e processamento de PGA em <i>E. coli</i> . O gene <i>pac</i> codifica um precursor polipeptídico de 94 kDa (ppPGA) que consiste em um peptídeo sinal (S), uma subunidade (α), um peptídeo espaçador (L) e uma subunidade (β).	25
Figura 2.7 - Diferentes níveis de pureza requerida para diferentes bioprodutos.	27
Figura 2.8 - Etapas genéricas de um processo de purificação de enzimas.	28
Figura 2.9 - Combinação equilibrada entre resolução, capacidade, recuperação e velocidade de cada operação.	30
Figura 2.10 - Estrutura simplificada da parede celular de <i>E. coli</i>	32
Figura 2.11- Evolução da atividade enzimática e proteínas totais no sobrenadante e atividade de células no pellet durante a sonicação a 200 W de 80 mL de suspensão celular com concentração de 26 g.L ⁻¹	34
Figura 2.12- Processos de separação por membrana porosa e sua medida de seletividade correspondente, onde R é o coeficiente de rejeição C _P e C ₀ representam a concentração do soluto no permeado e na alimentação, respectivamente.	36
Figura 2.13- Esquema ilustrativo da adsorção de troca iônica	37

Fonte: Adaptada de handbook Amersham Biocienses, 2004.....	37
Figura 3.1 –Esquema da purificação de PGA de <i>B. megaterium</i> recombinante cultivado em meio sintético.	56
Figura 3.2 -Esquema da purificação de PGA de <i>B. megaterium</i> recombinante cultivado em meio complexo.	57
Figura 4.2 - Adsorção de PGA de <i>E. coli</i> recombinante em coluna de leito fixo empacotada com STREAMLINE SP XL [®] , à pH 5,0 e 22°C.....	67
Figura 4.3 - Eletroforese SDS-PAGE (12%) das proteínas de <i>E. coli</i> , homogenato e pico de eluição da coluna empacotada com STREAMLINE SP XL [®]	68
Figura 4.4 – Isoterma de adsorção de PGA utilizando caldo sintético clarificado a pH 5,0 para STREAMLINE SP XL [®] , e pH 5,5 para IMMOBEAD IB-C435, a 4°C.	73
Figura 4.5 - Isoterma de adsorção de proteínas utilizando caldo sintético clarificado a pH 8,0 para STREAMLINE Q XL [®] e STREAMLINE DEAE XL [®] , a 4°C.....	74
Figura 4.6 - Gráfico de concentração da atividade e atividade específica na saída da coluna, em função do volume do processo para adsorção de PGA de <i>B megaterium</i> em STREAMLINE Q XL [®]	75
Figura 4.7 - Gráfico de concentração da atividade e atividade específica na saída da coluna, em função do volume do processo para adsorção de PGA de <i>B megaterium</i> em STREAMLINE SP XL [®] , à 22°C, pH 5,0.	77
Figura 4.8 - Eletroforese SDS-PAGE (12%) das proteínas de <i>B. megaterium</i> , caldo complexo, purificado da troca aniônica e purificado da troca catiônica.....	78
Figura 4.9 - Gel de filtração do caldo complexo concentrado utilizando Superdex 200 prep grad, à 22°C e pH 7,5 (50 mM fosfato de sódio).....	79
Figura 4.10 - Gel de eletroforese SDS-PAGE do caldo concentrado complexo, o purificado do gel de filtração e o diafiltrado.	81
Figura 4.11 -Eletroforese SDS-PAGE da PGA comercial de <i>E. coli</i> (Sigma).....	82

Lista de Tabelas

Tabela 2.1- Resinas comerciais comuns	38
Tabela 2.2- Exemplos de estudos com purificação de PGA encontrados na literatura.	44
Tabela 3.1 - Composição do meio nutriente de <i>E. coli</i> utilizado no cultivo de auto indução em biorreator de 5L.....	50
Tabela 3.2 - Composição dos meios nutrientes utilizados nos cultivos de batelada alimentada de <i>B. megaterium</i> em biorreator de 5L.	51
Tabela 4.1 - Atividade de PGA medida no homogenato e no clarificado após rompimento de <i>E. coli</i> em ultrassom, em diferentes pHs e tampões.....	62
Tabela 4.2 - Influência do pH na adsorção de PGA de <i>E. coli</i> em STREAMLINE SP XL [®] à 4°C, eluição com 2 vezes de 1,5 ml (150 mM de NaCl).	64
Tabela 4.3 - Parâmetros das isotermas de Langmuir para 4 e 22°C.	66
Tabela 4.4 -Parâmetros do processo de ultrafiltração dos cultivos de <i>B. megaterium</i> recombinante para produção de penicilina G acilase utilizando meio sintético e meio complexo em holder com membrana de 50 kDa de PVA com 1 m ²	69
Tabela 4.5 - Avaliação da influência do pH na adsorção de PGA de <i>B. megaterium</i> em resina de troca catiônica a 20 mM de força iônica em tampão acetato à 4°C.	71
Tabela 4.6 - Avaliação da influência do pH na adsorção de PGA de <i>B. megaterium</i> em resina de troca catiônica a 10 mM de força iônica em tampão fosfato à 4°C.	71
Tabela 4.7 - Avaliação da influência do pH na adsorção de PGA de <i>B. megaterium</i> em resina de troca catiônica a 10 mM de força iônica em tampão Tris-HCl à 4°C.	72
Tabela 4.8 - Parâmetros do ajuste da isoterma de Langmuir aos dados de adsorção de PGA à 25°C.	74
Tabela 4.9 - Comparação dos parâmetros das operações de troca catiônica e aniônica.	77
Tabela 4.10 - Diafiltração do caldo complexo concentrado em falcon com membrana de 50 kDa.	80

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 Antibióticos β-lactâmicos	17
2.2 Enzimas	19
2.2.1 Penicilina G acilase	20
2.2.2 Estrutura da PGA	22
2.2.3 Penicilina G acilase recombinante	24
2.3 Purificação de proteínas: enzimas	26
2.3.1 Rompimento Celular.....	31
2.3.1.1 Sonicação	33
2.3.2 Separação por membranas: Diálise, ultrafiltração e diafiltração	34
2.3.3 Adsorção de troca iônica	37
2.3.4 Cromatografia de exclusão molecular	41
2.3.5 Purificação de PGA	42
3. MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1 Materiais	48
3.1.1 Equipamentos	48
3.1.2 Reagentes e materiais	49
3.1.3 Fonte de PGA intracelular: <i>Escherichia coli</i>	49
3.1.4 Fonte de PGA extracelular: <i>Bacillus megaterium</i>	50
3.2 Métodos	51
3.2.1 Métodos de análise	51
3.2.1.1 Análise da atividade enzimática.....	51
3.2.1.2 Análise da concentração de proteínas.....	52
3.2.1.3 Eletroforese	53
3.2.2 Purificação da PGA de <i>E. coli</i>	53
3.2.2.1 Preparo das suspensões celulares para o rompimento.....	53
3.2.2.2 Rompimento da células: Sonicação.....	54
3.2.2.3 Influência do pH na adsorção em sistema descontínuo	54
3.2.2.4 Isotermas de adsorção	54

3.2.2.5 Adsorção em coluna de leito fixo	55
3.2.3 Purificação de PGA de <i>B. megaterium</i>	56
3.2.3.1 Clarificação do caldo: Centrifugação	57
3.2.3.2 Ultrafiltração do caldo dos cultivos de alta densidade	57
3.2.3.3 Preparação do suporte MANAE-AGAROSE	58
3.2.3.4 Influência do pH na adsorção da enzima (caldo sintético)	58
3.2.3.5 Isotermas de adsorção	59
3.2.3.6 Adsorção em coluna de leito fixo (caldo sintético)	59
3.2.3.7 Gel de filtração (caldo complexo)	60
3.2.3.8 Diafiltração (ultrafiltração do caldo complexo)	60
4. RESULTADOS	61
4.1 Purificação de PGA de <i>E. coli</i>	61
4.1.1 Influência do tampão e do pH no rompimento celular	61
4.1.2 Seleção do pH para adsorção em STREAMLINE SP XL [®]	64
4.1.3 Isotermas de Langmuir	65
4.1.4 Adsorção em coluna de leito fixo.	66
4.2 Purificação de PGA de <i>B. megaterium</i>	68
4.2.1 Ultrafiltração dos caldos de alta densidade	69
4.2.2 Influência do pH na adsorção de troca iônica (caldo sintético)	70
4.2.3 Isotermas de adsorção (Caldo sintético)	73
4.2.5 Adsorção de troca iônica em coluna de leito fixo (Caldo sintético)	75
4.2.5.1 Adsorção aniônica em STREAMLINE Q XL [®]	75
4.2.4.2 Adsorção catiônica em STREAMLINE SP XL [®]	76
4.2.6 Gel de filtração (caldo complexo)	79
4.2.7 Diafiltração: ultrafiltração (Caldo complexo)	80
4.2.8 PGA de <i>E. coli</i> comercial	81
5. CONCLUSÃO	83
6. REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

Penicilina G acilase (PGA), depois de glicose isomerase, é a enzima mais utilizada na forma imobilizada. Ela atua retirando as cadeias laterais de penicilina G e cefalosporina C para produzir, respectivamente, ácidos 6-aminopenicilânico (6-APA) e 7-aminocefalosporânico (7-ADCA). Esses ácidos são reagentes intermediários para produção de penicilinas e cefalosporinas semissintéticas, mediante uma acilação química utilizando reagentes e condições apropriadas. Os produtos desses núcleos intermediários são antibióticos conhecidos como ampicilina, propicilina, amoxicilina, cabenicilina, oxacilina, cefalexina, cefadroxil, dentre outros (CHANDEL et al., 2008).

Os antibióticos β -lactâmicos, em particular as penicilinas e cefalosporinas, são produtos muito importantes no mercado da biotecnologia farmacêutica. Estes produtos constituem a maior parte das vendas de antibióticos para a população mundial. Segundo Chandel et al., em 2008 as vendas correspondiam 3×10^7 kg/ano dos 5×10^7 kg/ano de antibióticos produzidos no mundo.

O consumo anual de PGA é estimado entre 10 e 30 milhões de toneladas (SOUZA et al., 2005). O aumento da demanda mundial por antibióticos β -lactâmicos exigiu um crescimento industrial significativo nas últimas duas décadas. As indústrias farmacêuticas produtoras dos antibióticos β -lactâmicos substituíram etapas de hidrólise e síntese química por rotas enzimáticas com a PGA, assim, foi possível diminuir custos e reduzir o impacto ambiental (ELANDER, 2003).

Além da hidrólise e semissíntese β -lactâmica, estudos recentes relatam outras aplicações da PGA, tais como síntese de peptídeos, resolução de misturas racêmicas, acilação enantioseletiva, hidrólise quiral, etc. (CHANDEL et al., 2008).

Penicilina G acilase pode ser produzida por diferentes microrganismos. PGAs produzidas por bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, encontram-se acumuladas no espaço periplásmico e PGAs de bactérias Gram-positivas, como *B. megaterium*, são secretadas (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2004).

A separação e purificação de enzimas produzidas por microrganismos é um complexo arranjo de etapas, devido às características variadas dos meios de cultivo e da proteína de interesse. Entre as características dos meios, se destacam a

elevada proporção de água, moléculas orgânicas e inorgânicas que constituem o meio e metabólitos intra e extracelulares. Em geral, o processo de bioseparação de proteínas envolve pelo menos uma etapa de separação entre células e caldo de cultivo, a concentração da molécula alvo e a separação das demais proteínas presentes no meio (PESSOA, KILIKIAN, 2005).

A recuperação de enzimas intracelulares requer uma etapa de rompimento celular, seguida da separação dos debris celulares. A produção de PGA por *B. megaterium* selvagem foi estudada por vários anos no grupo do DEQ-UFSCar (NUCCI et al., 2007; PINOTTI et al., 2000, 2002, 2007a, 2007b, 2009; SILVA et al., 2006, 2008; SOUZA et al., 2005). A purificação de PGA produzida por *E. coli* e *B. megaterium* selvagens, utilizando adsorção iônica, em leito fixo e expandido, também já foi estudada no grupo (PINOTTI et al., 2009).

Na síntese natural da enzima, sua produção é limitada pela regulação gênica. Assim, visando aumento nos níveis de expressão de PGA, passou-se a estudar no grupo a expressão recombinante da enzima, tanto a produção de PGA de *E. coli*, expressada por *E. coli*, quanto PGA de *B. megaterium*, expressada por *B. megaterium* (VELEZ, 2013-tese). Embora a purificação de PGA produzida por *E. coli* e *B. megaterium* selvagens utilizando adsorção iônica já tenha sido estudada no grupo, a produção recombinante da enzima pode alterar as características da separação. No caso de *E. coli*, o padrão proteico intracelular deve ser diferente do existente na produção com o microrganismo selvagem. Na produção com *B. megaterium*, que secreta a enzima, o meio de cultivo utilizado para a produção com o microrganismo selvagem é diferente do utilizado com o recombinante.

Neste trabalho, estudou-se a purificação de PGA recombinante expressada por *E. coli* e *B. megaterium*, produção intra e extracelular, respectivamente, visando o desenvolvimento de um processo eficiente de separação da enzima para que possa ser imobilizada, na sua aplicação industrial.

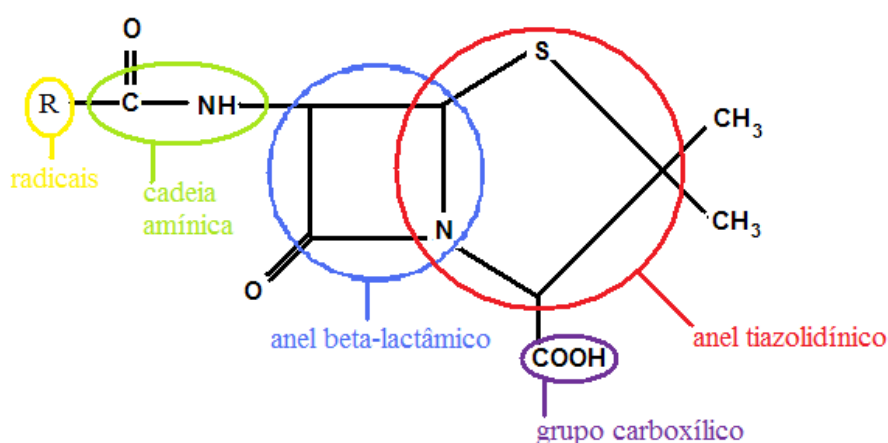
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Antibióticos β -lactâmicos

A penicilina foi descoberta há mais de 80 anos (FLEMING, 1929), sendo o primeiro antibiótico utilizado. A penicilina faz parte do grupo de antibióticos β -lactâmicos, a importância deste grupo atualmente é muito significativa, correspondendo a aproximadamente 60% do total de antibióticos produzido mundialmente (CHANDEL et al., 2008; SOUZA et al., 2005).

A estrutura desses antibióticos contém como núcleo básico comum o anel β -lactâmico, composto por três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio. Além do anel β -lactâmico, a estrutura das penicilinas contém o anel tiazolidínico. A fusão destes anéis dá origem ao núcleo comum a todas as penicilinas, o ácido 6-amino penicilânico (6-APA) (MENEZES; ALVES; CARDOSO, 2000). A estrutura básica da penicilina está representada na Figura 2.1.

Figura 2.1- Estrutura básica da molécula de penicilina.



Fonte: BARROS, 2008

Estes antibióticos agem inibindo a transpeptidase, enzima responsável pela síntese de peptídeoglicanos na parede celular bacteriana, com isso, desequilibram a pressão osmótica na célula, levando ao rompimento da parede celular (COX; NELSON, 2005).

O importante grupo de metabólitos secundários com anel β -lactâmico inclui as penicilinas G e V, as semissintéticas amoxicilina, ampicilina, cloxacilina, piperacilina; as cefalosporinas semissintéticas, cefalotina cefaloridina, cefalexina, cefaclor e as cefamicinas, cefoxitina e outras. As penicilinas semissintéticas são produzidas a partir do 6-APA, sendo este, produto da hidrólise da cadeia lateral da penicilina G (OZCENGIZ; DEMAIN, 2013).

Quando os antibióticos semissintéticos começaram ser produzidos em escala industrial, eram obtidos através de rotas químicas, porém, devido às suas complexidades, estas apresentam algumas desvantagens (OSPINA et al., 1996). A síntese química exige diversas etapas de proteção do grupo reativo amino e utilização de derivados altamente instáveis para evitar reação de hidrólise não seletiva. Para isso, são utilizados solventes organoclorados, tais como, diclorometano e dietilanilina, que são altamente tóxicos, de difícil manuseio e geram produtos nocivos ao meio ambiente. Os solventes organoclorados têm potencial cancerígeno, sendo indesejáveis tanto como resíduos quanto como traços presentes no produto. Além desses problemas, a rota química ainda exige temperatura de -30°C e longos tempos de reação (DIAGO; LUDESCHER, 1998). Assim, a rota enzimática surgiu como uma alternativa atraente na substituição dos processos de hidrólise e síntese química.

A reação de síntese enzimática de β -lactâmicos semissintéticos utilizando Penicilina G Acilase (PGA), é conhecida desde 1969, com a produção da ampicilina (WEGMAN et al., 2001). A rota enzimática pode ser realizada em condições brandas como temperatura ambiente, meio aquoso e pH neutro. Nos últimos anos, devido à pressão das novas leis ambientais, a rota enzimática, por ser uma rota mais limpa, se torna mais atrativa quando comparada à rota química. Além da vantagem ambiental, a síntese enzimática é realizada em condição energeticamente favorável e apresenta altas conversões, gerando grandes reduções de custos (ELANDER, 2003).

2.2 Enzimas

A maioria das enzimas são proteínas, exceto um pequeno grupo de RNAs não codificadores com atividade catalítica, que atuam como biocatalisadores. Enzimas estão envolvidas em quase todos os processos naturais, sendo um tipo especial de proteína com função de auxiliar a digestão, processar nutrientes, produzir energia, dar destino a produtos residuais, rearranjar moléculas e regular uma variedade de outras funções metabólicas (COX; NELSON, 2005).

Enzimas são macromoléculas de alta massa molecular formadas por unidades nanométricas conhecidas por aminoácidos, unidos por ligações peptídicas. Os resíduos de aminoácidos formam ligações covalentes entre si, pelo grupo amino de um aminoácido com o grupamento carboxílico de outro, constituindo cadeias peptídicas extensas, que assumem um arranjo espacial complexo (CAMPBELL, 2000). Sua estrutura e modo de ação vêm sendo gradativamente elucidados por métodos experimentais bem estabelecidos, como técnicas clássicas de Raio-X e avançadas de ressonância magnética nuclear (DALLA-VECCHIA; NACIMENTO; SOLDI, 2004).

A utilização de enzimas como catalisadores evoluiu expressivamente nos últimos anos. Características como alta eficiência catalítica, alto grau de especificidade e capacidade de acelerar reações químicas específicas sem a formação de subprodutos indesejáveis são aspectos que contribuem para a utilização destes biocatalisadores em vários ramos da indústria. Diversas reações orgânicas podem ser efetuadas por rotas de síntese empregando esses catalisadores bioquímicos (FABER, 1997).

Desta forma, a biocatálise vem surgindo como alternativa por apresentar grandes melhorias de processo, principalmente em relação aos custos operacionais, bem como, condições moderadas de operação. Por esta razão é cada vez mais crescente o interesse da aplicação de catalisadores bioquímicos em síntese orgânica.

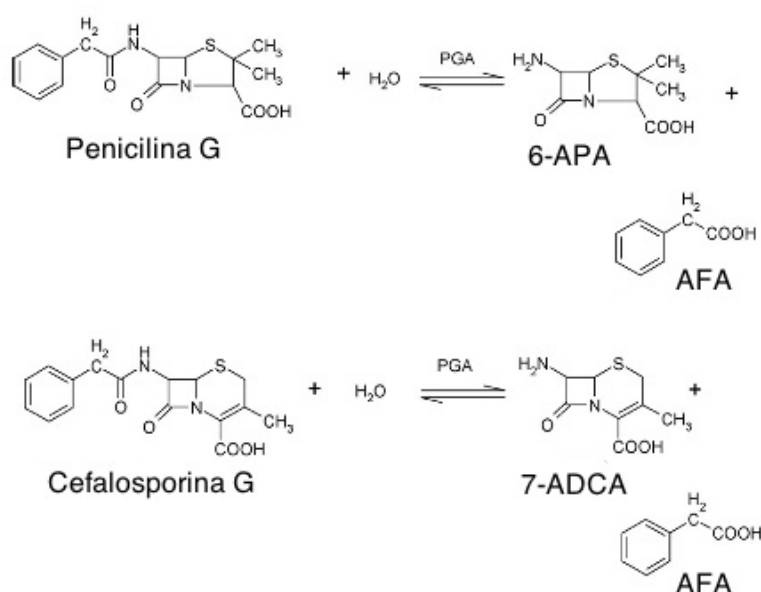
Atualmente, há uma grande pressão para a conservação dos recursos naturais. Cada vez mais as leis que acercam o controle ambiental ficam mais rigorosas, forçando o desenvolvimento de práticas sustentáveis. Os processos enzimáticos vêm se tornando importantes aliados na substituição de processos químicos

consolidados em muitos segmentos industriais. Os setores da indústria que passam pela troca de catalizadores químicos por processos enzimáticos estão em diversas áreas de atuação, tais como, ambiental, analítica, farmacêutica, alimentícia, e outras. Dentre essas transições, podem ser citadas a obtenção de 6-APA a partir da hidrólise enzimática da penicilina G, produção de antibióticos, produção de combustíveis, desenvolvimento de biossensores, degradação de pesticidas, produção de corantes, isomerização da glicose, hidrólise da lactose, clarificação de bebidas e resolução de misturas racêmicas (CHANDEL et al., 2008).

2.2.1 Penicilina G acilase

A penicilina G acilase (PGA; EC 3.5.1.11) é uma enzima hidrolítica que atua sobre as cadeias laterais de penicilina G e cefalosporina G, produzindo 6-APA e o 7-ácido amino-desacetoxi-cefalosporânico (7-ADCA) respectivamente, e como subproduto comum, ácido fenil acético (AFA) (ARROYO et al., 2003; CHANDEL et al., 2008). A Figura 2.2 ilustra as respectivas reações de hidrólise de penicilina G e cefalosporina G.

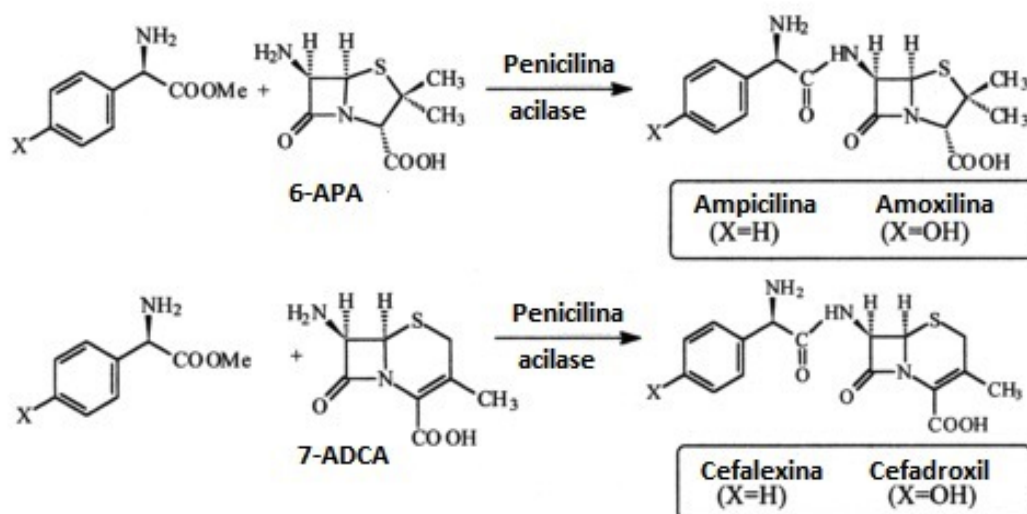
Figura 2.2- Conversão enzimática da penicilina G e cefalosporina G em 6-APA e 7-ADCA, liberando ácido fenil acético como produto secundário comum.



Fonte: CHANDEL et al., 2008

Os produtos 6-APA e 7-ADCA representam os núcleos principais para síntese dos antibióticos β -lactâmicos, tais como ampicilina, amoxicilina, cloxacilina e cefalexina. A estratégia mais simples para a síntese enzimática dos antibióticos β -lactâmicos é a utilização da síntese termodinamicamente controlada. Este método envolve a acilação direta do nucleófilo 6-APA ou 7-ADCA por ácidos livres em baixos valores de pH, isto é, condições em que a maioria dos substratos estão na forma não-dissociada. A mistura de solvente orgânico com água pode ser usada para gerar melhorias na síntese direta do antibiótico. Uma concentração elevada de solventes é usada para conseguir redução substancial na forma ionizada do substrato, a fim de favorecer o processo de síntese ilustradas na Figura 2.3 (SCHROEN et al., 1999; FERNANDEZ-LAFUENTE; ROSELL; GUISÁN, 1996).

Figura 2.3 - Síntese de antibióticos β -lactâmicos catalisada por PGA.



Fonte: ARROYO et al., 2003

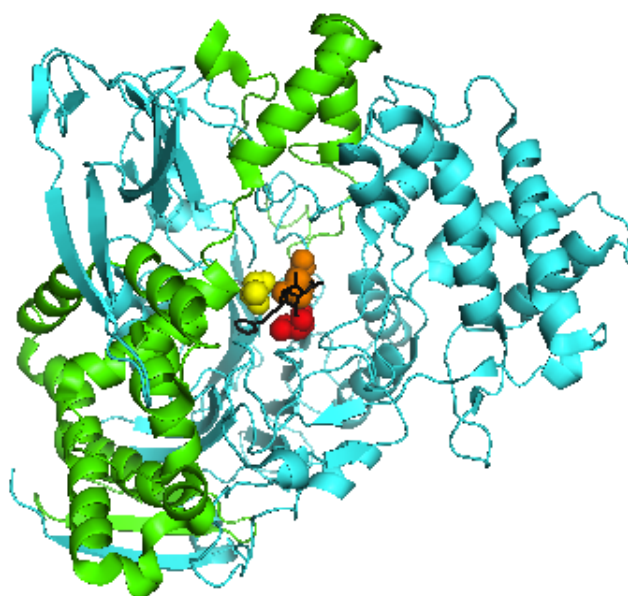
Outras aplicações das PGAs são: síntese de peptídeos (LANGEN et al., 2000), acilação enantioselectiva (MASSOLINI et al., 2006), resolução de misturas racêmicas (FADNAVIS et al., 1997) e hidrólise quiral (CABRERA et al., 2007). Baseada na especificidade pelo substrato as penicilinas acilases foram originalmente classificadas em três grupos: penicilina G acilase, penicilina V acilase (PVA) e ampicilina acilase (DESHPANDE et al., 1994).

2.2.2 Estrutura da PGA

A PGA de *E. coli* é uma enzima intracelular localizada no espaço periplasmático, composta por duas subunidades, α e β , com massas moleculares de 20,5 e 69 kDa, respectivamente, com um ponto isoelétrico entre 6,7 e 6,9 (BOCK et al., 1989; AZEVEDO; FONSECA; PRAZERES, 1999). A enzima produzida por *B. megaterium* é secretada, portanto extracelular, e também é constituída por duas subunidades, com massa molecular média de 26,9 e 59,1 kDa (SOUZA et al., 2005), porém, essa enzima ainda não teve sua estrutura cristalina elucidada.

A tríade catalítica da PGA de *Escherichia coli* está situada entre a subunidade α , com 209 aminoácidos e 20,5 kDa, sendo responsável pelo reconhecimento da cadeia lateral do substrato, e a subunidade β , com 557 aminoácidos e 69 kDa, contendo um resíduo serina N-terminal do sítio ativo (BOCK et al., 1983; NOVELLA et al., 1994). Quando as duas subunidades estão juntas e em sua forma madura, a enzima é cataliticamente ativa. A dissociação de subunidades leva a inativação da enzima, de forma praticamente irreversível. A estrutura tridimensional da enzima esta ilustrada na Figura 2.4.

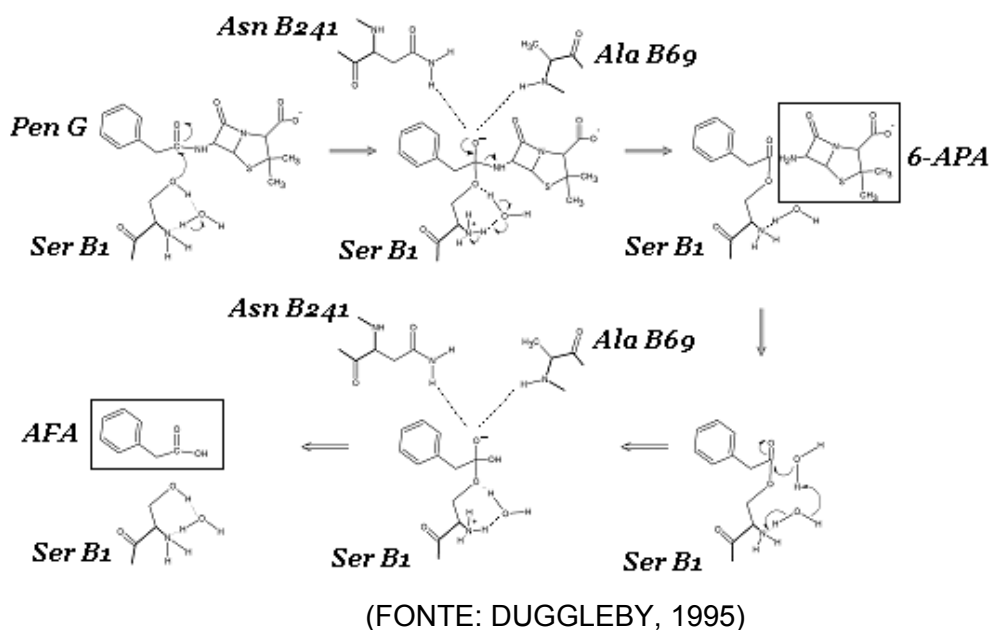
Figura 2.4- Estrutura cristalina da PGA de *E. coli* complexada com o substrato penicilina G sulfoxido. Em verde aparece a subunidade alfa e em azul a subunidade beta. No centro da molécula, a tríade catalítica complexada com o substrato em preto (penicilina g sulfoxido), indicado em vermelho a Ser β 1, em amarelo Ala β 69 e em laranja a Asn β 241.



Fonte: MCVEY et al., 2001

A estrutura do sítio ativo da PGA é complexa, em forma de bolsa com grupamentos serina, asparagina e alanina. O mecanismo proposto para a hidrólise de penicilina G encontra-se apresentado na Figura 2.5. O átomo de carbono carbonila da ligação amida sofre um ataque nucleofílico pela Ser β 1 formando uma ligação covalente acil-enzima. Com isso, surge o estado de transição tetraédrico, onde o oxigênio da ligação amida perde uma ligação covalente, sendo então estabilizado por duas ligações de hidrogênio, uma com a Asn β 241 e outra com a Ala β 69. O intermediário tetraédrico sofre tensão das ligações de hidrogênio forçando a quebra da ligação amida liberando 6-APA. A ligação serina-acil é atacada pela água para formar o segundo intermediário tetraédrico com o mesmo mecanismo de interação entre os aminoácidos Asn β 241 e Ala β 69. Finalmente, o segundo intermediário se colapsa liberando AFA. (DUGGLEBY et al., 1995; GIORDANO; RIBEIRO; GIORDANO,2006).

Figura 2.5- Mecanismo catalítico proposto para a ação da penicilina G acilase na hidrólise de penicilina G.



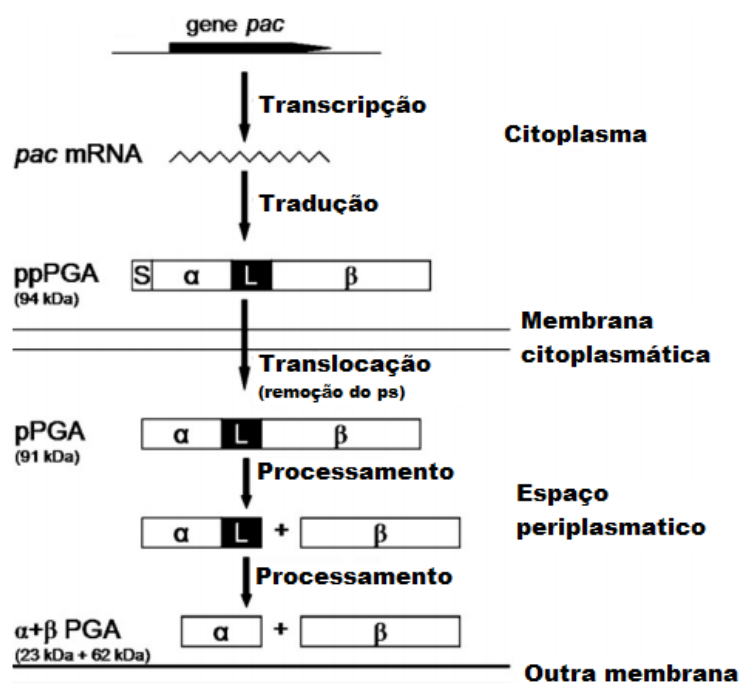
2.2.3 Penicilina G acilase recombinante

A PGA é produto da tradução e processamento do gene *pac*, que encontra-se presente em uma variedade de organismos, incluindo as bactérias gram-negativas e gram-positivas, fungos filamentosos e leveduras. Quando presente em bactérias gram-negativas como *Escherichia coli* (COLE, 1969), *Kluyvera citrophila* (BARBERO et al., 1986), *Providencia rettgeri* (KLEI; DAUMY; KLEI, 1995) e *Alcaligenes faecalis* (VERHAERT et al., 1997) a enzima é acumulada no espaço periplasmático, quando *pac* é expresso em bactérias gram-positivas como *Arthro-bacter viscosus* (OHASHI et al., 1989) e *Bacillus megaterium* (CHIANG; BENNETT, 1967) a enzima é secretada para o meio extracelular.

A regulação da síntese do *pac* tem sido extensivamente estudada em *E. coli*. Há três principais mecanismos de regulação envolvidos na síntese PAC: repressão catabólica, indução por AFA e termorregulação. A expressão do gene *pac* em linhagens de *E. coli* do tipo selvagem é induzida por AFA e reprimida por glicose. Estas duas substâncias parecem afetar a expressão do gene ao nível da transcrição, mecanismo ilustrado na Figura 2.6. Embora o mecanismo de indução permaneça oculto, sugere-se que uma proteína repressora do *pac* seja codificada por *pacR*, uma transcrição no sentido oposto ao gene estrutural *pac* (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2004).

O gene *pac* é traduzido como uma única sequência polipeptídica no citoplasma, ppPGA; sua maturação é realizada através da remoção do peptídeo sinal para translocação através da membrana citoplasmática. O processamento do peptídeo espaçador ocorre no espaço periplasmático, seguido da formação da enzima quimicamente ativa composta pelas subunidades α e β (KRZESLAK et al., 2009).

Figura 2.6 - Esquema geral de síntese e processamento de PGA em *E. coli*. O gene *pac* codifica um precursor polipeptídico de 94 kDa (ppPGA) que consiste em um peptídeo sinal (S), uma subunidade (α), um peptídeo espaçador (L) e uma subunidade (β).



Fonte: KRZESLAK et al., 2009.

A tecnologia de DNA recombinante tornou possível clonar e expressar o gene *pac* de modo eficiente e preciso. A estratégia mais utilizada foi a clonagem dos genes *pac* em vetores de plasmídeo multicópia, a fim de aumentar o número de cópias do gene. Genes *pac* de *Escherichia coli* (FLORES; SOBERÓN; OSUNA, 2004), *Arthrobacter viscosus* (OHASHI et al., 1989), *Providencia rettgeri* (KLEI; DAUMY; KLEI, 1995), *Kluyvera citrophila* (BARBERO et al., 1986), *Bacillus megaterium* (MARTIN et al., 1995), *Achromobacter xylosoxidans* (CAI et al., 2004) já foram clonados com sucesso.

A alta demanda de PGA na indústria farmacêutica é suprida por um processo de fermentação líquida, utilizando principalmente *Escherichia coli* ou *Bacillus megaterium* geneticamente manipulados (recombinantes). Avanços no campo da biotecnologia, tais como bioprospecção de microrganismos, técnicas avançadas de recombinação genética, mutagênese sítio dirigida, técnicas de imobilização e modificações no processo de fermentação podem aumentar a produção de PGA. Fontes de carbono mais baratas e condições de fermentação modificadas poderiam levar à produção mais rentável de PGA. Em paralelo, os processos de purificação da

enzima podem ser melhores explorados para diminuir os custos da produção (RAJENDHRAN; GUNASEKARAN, 2004).

2.3 Purificação de proteínas: enzimas

A implementação da produção industrial de proteínas nem sempre foi possível, devido a problemas na purificação, tais como, separação dos debrís celulares e elevado número de procedimentos necessários para a recuperação e purificação da proteína alvo. Os processos tradicionais utilizados para a separação e purificação de proteínas intracelulares são lentos e a utilização de muitas etapas diminui o rendimento do processo, enquanto o custo de operação atinge de 40a 90% do custo total da produção do bioproduto (MORTON; LYDDIATT, 1994).

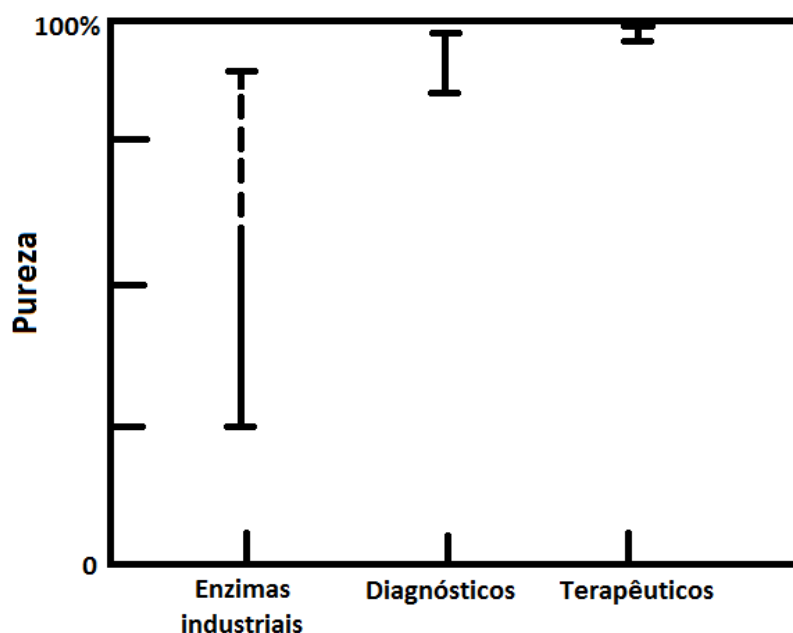
O processo de obtenção de um produto biotecnológico, consiste de um conjunto de operações unitárias conectadas, que devem produzir um produto final capaz de atingir os níveis de pureza, recuperação e custos definidos. Os principais critérios para avaliação e desenvolvimento de um processo de purificação de proteínas são:

- Pureza requerida do produto;
- Custo de produção relativo a recuperação;
- Possibilidade de escalonamento;
- Reprodutibilidade;
- Fácil implementação;
- Robustez na variação do processo.

De modo geral não há um protocolo específico para purificação, várias perguntas devem ser realizadas antes de propor-se um procedimento de purificação de uma determinada proteína. Exemplos dessas indagações são: em que tipo de células a proteína é expressa, a produção é extra ou intracelular, quais as características da molécula alvo (tamanho, forma, pI, solubilidade, estabilidade) e as características das moléculas contaminantes, qual é o pH do meio de produção, qual é a concentração da biomolécula, e por fim, qual a finalidade do produto final (uso industrial, tratamento de efluentes, aplicação na obtenção de alimentos ou produtos farmacêuticos, no entanto, o que dita primordialmente a pureza requerida para um

determinada biomolécula é sua aplicação pretendida. Em geral, enzimas industriais requerem níveis de pureza menores que moléculas utilizadas em kits diagnósticos ou com finalidades terapêuticas (Figura 2.7).

Figura 2.7 - Diferentes níveis de pureza requerida para diferentes bioprodutos.

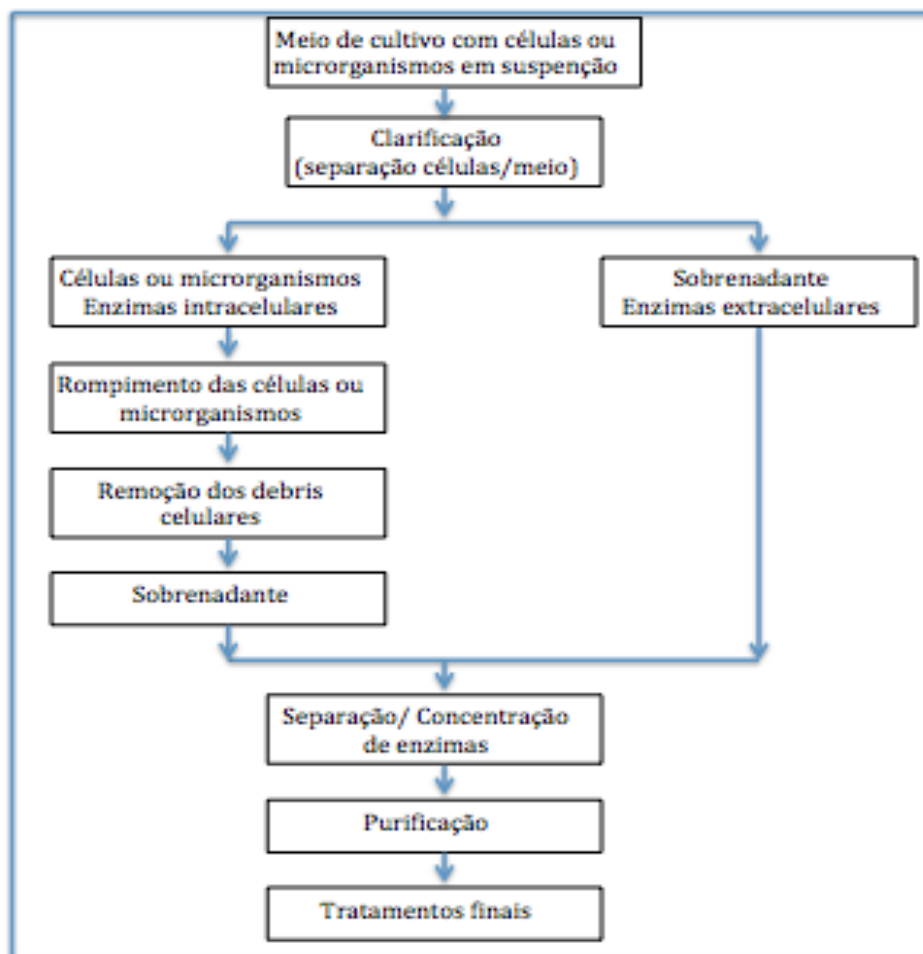


Fonte: HARRISON, 2003.

Devido ao fato de cada proteína ou enzima ser diferente, infelizmente, não pode haver uma resposta comum para qualquer uma dessas perguntas. A priori, os protocolos e estratégias de purificação devem ser trabalhados individualmente para cada proteína tendo em conta seu uso pretendido (CONSORTIUM et al., 2008).

Apesar de não haver processo de purificação com aplicação geral, é possível traçar passos genéricos aconselháveis de acordo com cada caso de processo e finalidade do produto. A purificação com um olhar genérico pode ser dividida em quatro etapas: separação de células e seus debrís do caldo de cultivo (clarificação); concentração e pré-purificação de baixa resolução; purificação de alta resolução; e operações de tratamento final (PESSOA; KILIKIAN, 2005). A Figura 2.8 ilustra as etapas genéricas de um processo de purificação de enzimas.

Figura 2.8 - Etapas genéricas de um processo de purificação de enzimas.



Fonte: PESSOA; KILIKIAN, 2005.

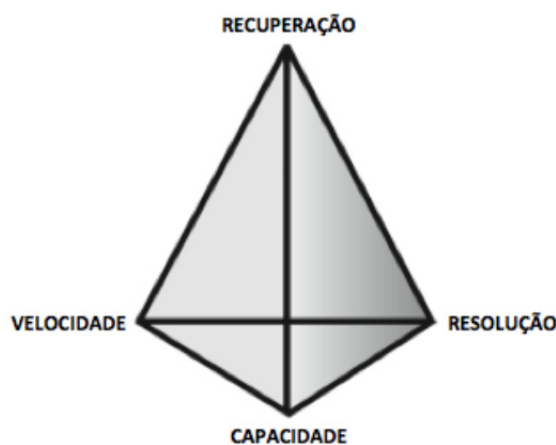
Segundo Najafpour, 2007, as etapas para purificação de uma determinada enzima compreendem uma gama de operações que variam de acordo com cada finalidade. São elas:

- Clarificação trata-se da remoção de partículas insolúveis. Operações comuns são filtração, centrifugação e filtração tangencial, processos esses baseados na separação por tamanho das partículas.
- Rompimento de células é uma operação necessária para produtos de interesse intracelular, como exemplo, as bactérias que produzem a proteína alvo no citoplasma e as armazenam em corpos de inclusão ou no espaço periplasmático. As operações mais comuns são, ultrassom e moagem em moinhos de bolas que rompem por cisalhamento. Também podem ser utilizados rompimento químico ou enzimático.

- A pré-purificação envolve processos de baixa resolução. Tratam-se de operações que separam moléculas com características muito distintas. Nessa etapa se utiliza a precipitação através da adição de sais, polímeros ou solventes para diminuir a solubilidade da proteína, ou também a ultrafiltração para separar as proteínas de acordo com a massa molar e raio hidrodinâmico.
- A etapa de alta resolução compreende uma ou mais operações cromatográficas como: troca-iônica, afinidade, imunoafinidade, interação hidrofóbica e exclusão molecular. Essas etapas visam a adsorção da proteína alvo ou das proteínas contaminantes em uma fase estacionária, com exceção da exclusão molecular que separa proteínas por diferença de tamanho em uma matriz inerte.
- O polimento pode ser obtido através de técnicas de secagem realizadas em tambores rotativos, secagem por pulverização, liofilização e cristalização, todas envolvendo o princípio de equilíbrio sólido-líquido. Os últimos passos devem conferir ao produto desejado forma adequada para a formulação final. Em muitos casos a etapa de polimento não é realizada.

Para qualquer técnica de bioseparação, se obtêm um desempenho diferente em relação à recuperação, resolução, capacidade e velocidade. A técnica pode ser otimizada levando em consideração apenas um desses parâmetros, como exemplo, resolução, ou para alcançar o melhor equilíbrio entre dois parâmetros, como recuperação e capacidade. A separação otimizada para um destes parâmetros pode levar a resultados bastante diferentes do que os produzidos usando a mesma técnica, mas focando em outro parâmetro. O esquema típico de apresentação do efeito da escolha desses parâmetros é ilustrado em forma de um tetraedro (Figura 2.9); conforme é escolhido 1 ou 2 parâmetros, se afasta dos parâmetros da aresta oposta.

Figura 2.9 - Combinação equilibrada entre resolução, capacidade, recuperação e velocidade de cada operação.



Fonte: GE Hand Book.

Capacidade se refere à quantidade de proteína alvo que o procedimento suporta, por isso, é uma abordagem mais comum de processos cromatográficos. Em alguns casos, a quantidade de amostra suportada pode ser limitada pelo volume (filtração em gel), ou por grandes quantidades de contaminantes (troca iônica, ultrafiltração).

A velocidade do processo é de máxima importância quando no início a purificação há contaminantes que degradem a proteína alvo, tais como proteases. Assim, a proteína alvo deve ser removida tão rápido quanto possível, para evitar sua degradação.

A recuperação se refere ao rendimento do processo e torna-se cada vez mais importante conforme o valor do produto purificado aumenta. A recuperação é influenciada, por exemplo, por processos de desnaturação da proteína alvo pelas condições do processo.

Resolução da operação é a capacidade do processo em separar a proteína alvo dos contaminantes. De modo geral, a resolução se torna mais difícil nas fases finais de purificação, quando as impurezas apresentam propriedades muito semelhantes as da proteína alvo.

A correta escolha e integração das operações unitárias para o sucesso do processo de bioseparação faz parte do "Process Design". Esse trabalho, é uma avaliação de engenharia realizada antes de construir, expandir ou adaptar um

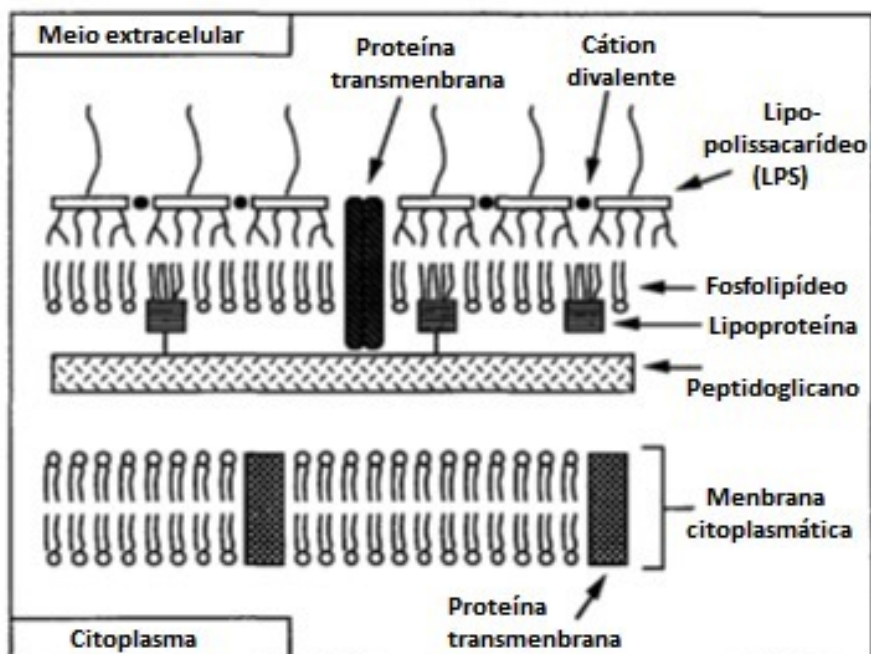
processo industrial e se trata de duas etapas de trabalho, o processo de síntese e o processo de análise. O processo de síntese refere-se à seleção e arranjo de um conjunto de operações unitárias de forma ser capaz de produzir o produto de interesse com qualidade aceitável e custo competitivo. O processo de análise consiste na avaliação e comparação de diferentes processos de síntese. No entanto, um passo de síntese é seguido por um passo de análise e o resultado da análise dita o próximo passo de síntese. O “Process Design” deve ser realizado junto com o projeto de avaliação econômica, no entanto, exigem uma integração multidisciplinar entre disciplinas científicas e de engenharia com muitos níveis de detalhes (HARRISON, 2003).

2.3.1 Rompimento Celular

O aumento da demanda por produtos biotecnológicos trouxe à tona a importância dos processos de rompimento celular para recuperação de proteínas intracelulares. A partir do domínio da engenharia genética, surgiram muitas moléculas que vêm sendo sintetizadas em sistemas procariotos e eucariotos, e muitas delas são intracelulares, demandando o desenvolvimento de técnicas de rompimento para recuperação desses bioprodutos. (PESSOA; KILIKIAN, 2005). A extração de proteínas intracelulares a partir de *Escherichia coli* é tradicionalmente conseguida por tecnologia de ruptura mecânica, química ou enzimática.

A parede celular de *E. coli* é constituída por uma membrana externa e uma camada de mureína ou peptidoglicano, que lhe confere resistência mecânica, principalmente devido à camada de peptidoglicano reticulada que liga a camada de fosfolípidos logo acima. Além disso, a bactéria contém uma membrana citoplasmática, composta por uma bicamada de fosfolípidos e proteínas transmembrana, a qual mantém gradientes de concentração entre a célula e o espaço periplasmático, espaço no qual abriga a PGA madura, como ilustrado na Figura 2.10. A membrana não possui resistência mecânica, portanto, após a remoção da parede externa é possível extrair a PGA e também é possível perturbar o equilíbrio osmótico da membrana citoplasmática e liberar o conteúdo intracelular (MIDDELBERG, 1995).

Figura 2.10 - Estrutura simplificada da parede celular de *E. coli*.



Fonte: MIDDELBERG, 1995.

Com as estruturas típicas das paredes celulares elucidadas, é possível desenvolver estratégias de rompimento. A ruptura completa da parede celular e a liberação de todos os componentes intracelulares exige a destruição dos componentes rígidos da estrutura da parede, ou seja, do peptidoglicano nas bactérias gram-negativas e glicanos em leveduras. A destruição da parede de forma não-específica é normalmente alcançada através de meios mecânicos, enquanto que os métodos não-mecânicos (física, química e enzimática) são mais específicos (HARISON, 1991).

O rompimento celular é uma das principais operações unitárias na recuperação de produtos intracelulares. No bioprocessamento como um todo, o rompimento da célula tem de ser otimizado, tanto na quantidade de produto liberado, quanto na influência sobre as operações de purificação subsequentes (ZHOU et al., 2000). No caso de um produto localizado no periplasma, evita-se a libertação citoplasmática, limitando a quantidade de DNA liberado, evitando assim o aumento na viscosidade, melhorando a eficiência da etapa subsequente de separação sólido-líquido como a microfiltração. Além disso, com a redução da quantidade de contaminantes liberados, espera-se aumentar a ligação do produto durante as operações de purificação secundárias, como a adsorção. Métodos de rompimento por cavitação,

entre eles cavitação hidrodinâmica e ultrassom, tem demonstrado boa seletividade na extração de componentes periplasmáticos em bactérias e leveduras. (BALASUNDARAM; HARISSON, 2011; GOGATE; KABADI 2009).

2.3.1.1 Sonicação

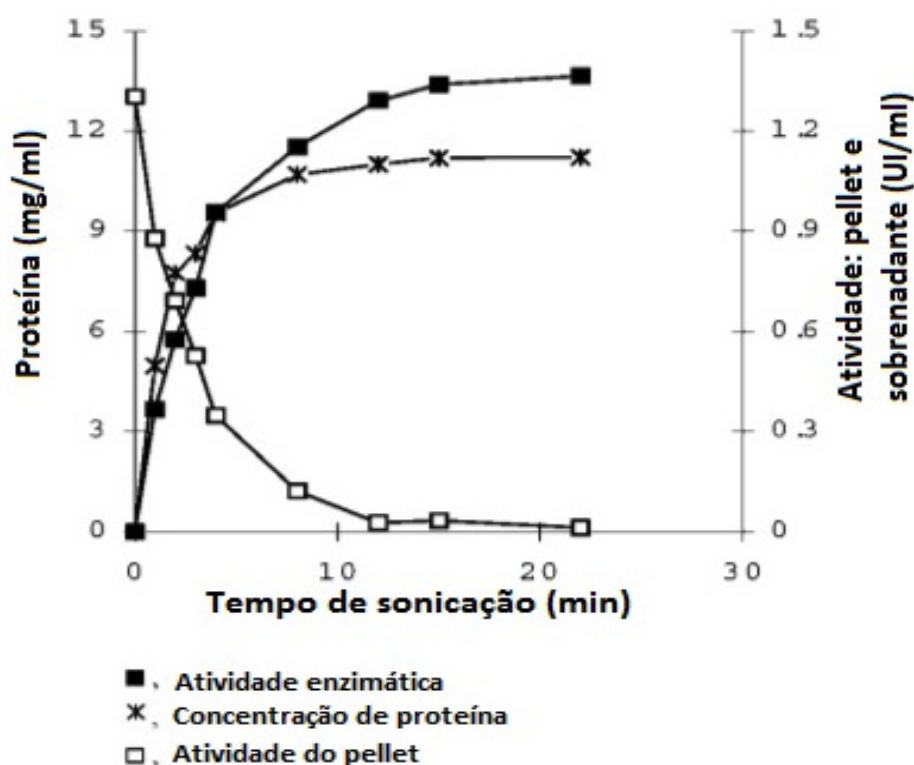
A sonicação é um dos métodos de rompimento celular mais utilizados em escala de bancada (ENGLER et al., 1985). O ultrassom são ondas sonoras de alta energia com frequência de 15-20kHz. O mecanismo de rompimento celular está associado ao fenômeno de cavitação, ou seja, tensão de cisalhamento desenvolvida por turbilhões, formados pelo colapso de pequenas bolhas de ar. As forças de cisalhamento que criam turbilhões maiores do que as células são mais susceptíveis de mover as células, em vez de rompê-las, enquanto que turbilhões menores do que as células são capazes de realizar a ruptura. Assim, as células maiores terão turbilhões mais perturbadores do que as células menores (GECIOVA;BURY; GELEN, 2001).

Na indústria química, a sonicação é utilizada no processo de desinfecção, mas, não é comum sua utilização em escala industrial para o rompimento de microrganismos. O fato pode ser atribuído ao aquecimento excessivo gerado no processo. A maior parte da energia acústica é absorvida pela suspensão e convertida em calor, surgindo a necessidade de um eficiente sistema de refrigeração para a dissipação do calor. As cavidades geradas nas paredes celulares por ultrassons não possuem simetria esférica, assim o colapso gerado pelas bolhas provoca uma descarga devido à distribuição assimétrica dos elétrons e, subsequentemente, ionização. A cavitação ultrassônica produz detritos de células muito finas podendo gerar problemas nos subsequentes passos da purificação, como exemplo na microfiltração (HARISON, 1991).

Apesar de o ultrassom ser uma técnica versátil para escala de bancada laboratorial, o rompimento em escala industrial torna-se inviável economicamente, pela necessidade dos grandes números de sondas e um sistema muito eficiente de refrigeração, já que as proteínas podem sofrer desnaturação durante o processo (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Fonseca e colaboradores em 2002 verificaram a eficiência do rompimento de *E. coli* para recuperação da PGA intracelular por ultrassom, realizando o processo com devida refrigeração, os autores verificaram que não houveram perdas durante o processo de rompimento. Os resultados da sonicação mostraram bom rendimento de ruptura celular, aplicando-se 12 minutos de ultrassom e pulsos de 30 em 30 segundos. Os dados estão ilustrados na Figura 2.11.

Figura 2.11- Evolução da atividade enzimática e proteínas totais no sobrenadante e atividade de células no pellet durante a sonicação a 200 W de 80 mL de suspensão celular com concentração de 26 g.L⁻¹.



Fonte: FONSECA; CABRAL, 2002.

2.3.2 Separação por membranas: Diálise, ultrafiltração e diafiltração

Membrana é uma barreira que separa duas fases restringindo total ou parcialmente o permeio de um ou mais compostos químicos presente no meio. Processos de separação por membranas são energeticamente favoráveis, pois promovem a separação dos componentes de uma mistura à temperatura ambiente, sem mudança de fase. Além disso, apresentam especificidade, podem separar

compostos termolábeis, característica importante para produtos biotecnológicos (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

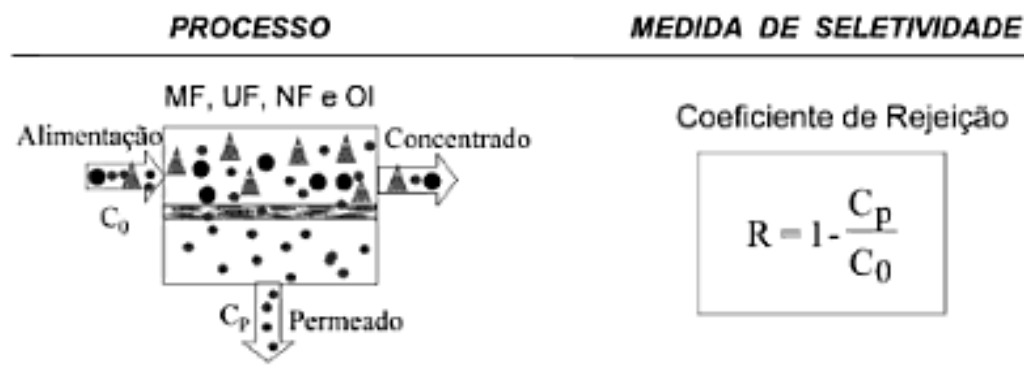
Por apresentar tal versatilidade, a ultrafiltração é atualmente utilizada para concentração e pré-purificação de uma grande variedade de produtos, incluindo moléculas terapêuticas recombinantes, enzimas industriais e produtos alimentares. A diálise de proteínas em solução permite separar facilmente solutos de baixo peso molecular por meio de uma membrana semipermeável, capaz de reter as moléculas proteicas, permitindo a passagem de moléculas menores do soluto. A vantagem sobre a ultrafiltração é o baixo consumo de energia.

A diafiltração é uma opção alternativa para operar o sistema de ultrafiltração. Tal tipo de operação pode ser entendida como processo de purificação a volume constante, pois adiciona-se em modo contínuo, solvente ou solução tamponada, na mesma vazão de saída do permeado. Esse modo de operação pode ser empregado para sistemas de microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose inversa, e é utilizado com intuito de eliminar compostos de menor massa na mistura contendo a proteína de interesse (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Os parâmetros utilizados para a classificação das membranas são natureza morfológica e propriedades de transporte. Quando se trata de membrana porosa, características como distribuição, número e espessura de poros são parâmetros morfológicos importantes. No caso de membranas densas, propriedades físico-químicas que envolvem o polímero utilizado, as moléculas a serem separadas e também a espessura do filme de polímeros são parâmetros importantes do processo.

Além disso, a morfologia da membrana pode definir os principais parâmetros que representam sua capacidade seletiva. Portanto, em processos com membranas porosas, a capacidade seletiva está ligada diretamente ao tamanho e quantidade de poros e com o tamanho das espécies envolvidas na separação. Independente do tipo, material, morfologia e força motriz, propriedades de transporte como medida de seletividade, são adotadas como parâmetros característicos (Figura 2.12) (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

Figura 2.12- Processos de separação por membrana porosa e sua medida de seletividade correspondente, onde R é o coeficiente de rejeição C_P e C_0 representam a concentração do soluto no permeado e na alimentação, respectivamente.



Fonte: HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006.

De maneira geral, as espécies presentes na mistura devem ser inertes em relação ao material da membrana. No caso das membranas de ultrafiltração, a força motriz da separação é o gradiente de pressão através da membrana, sendo o fluxo do permeado necessariamente convectivo, ao contrário da diálise, que separa por gradiente de concentrações, nesse caso o fluxo é difusivo.

Por outro lado, a ultrafiltração apresenta algumas limitações como a redução do fluxo permeado, provocada pela polarização de concentração e por incrustações (*fouling*). A polarização de concentração é o fenômeno resultante do acúmulo de material em suspensão na superfície da membrana, promovendo resistência à transferência de massa do solvente. O *fouling* pode ser ocasionado por adsorção de moléculas de soluto na superfície da membrana e/ou no interior dos poros, devido a interações físico-químicas destas substâncias com o material da membrana, por entupimento dos poros das membranas por partículas em suspensão, depósito de material em suspensão sobre a superfície da membrana, no caso de macromoléculas em concentração elevada que possibilita a formação de gel nesta área. O fenômeno da polarização de concentração é reversível; através da limpeza da membrana é possível recuperar a permeabilidade da mesma, enquanto que os fenômenos que envolvem a incrustação são considerados total ou parcialmente irreversíveis (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

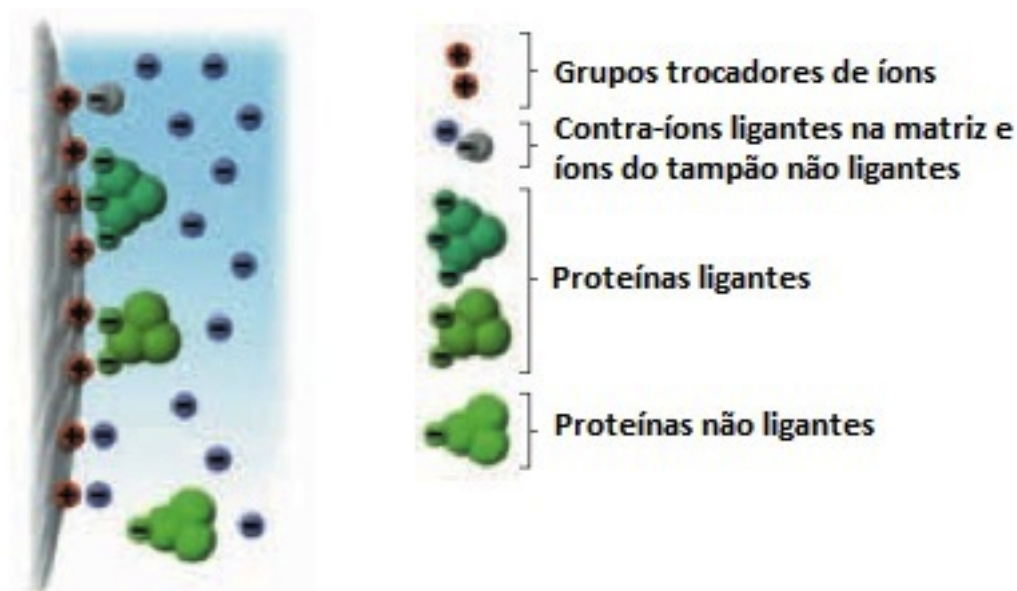
A diálise também pode apresentar problemas, além da diminuição da solubilidade das proteínas em solução, o caldo fermentado pode conter enzimas que degradem a membrana, no caso, celulases em membrana de celulose regenerada.

Outro problema dessa operação é quando o caldo contém proteases, que são enzimas que hidrolisam outras proteínas de maneira aleatória, assim o processo fica comprometido, devido ao grande tempo de contato que a solução dialisada deve ficar em contato contra a solução de equilíbrio.

2.3.3 Adsorção de troca iônica

A adsorção de troca iônica é uma operação de *downstream* que pode separar moléculas ou grupos de moléculas que têm apenas pequenas diferenças na carga. A separação baseia-se na interação reversível entre uma molécula carregada e a fase estacionária de carga oposta (Figura 2.13). Atualmente a troca iônica é uma operação muito utilizada na purificação de proteínas, peptídeos, ácidos nucleicos e outras biomoléculas carregadas. Existe grande variedade de grupos de separações de alta resolução e com elevada capacidade de carga.

Figura 2.13- Esquema ilustrativo da adsorção de troca iônica



Fonte: Adaptada de handbook Amersham Biociências, 2004.

Tipicamente, as condições do processo são selecionadas para assegurar que as moléculas de interesse se liguem aos grupos carregados na fase estacionária. As condições são então alteradas de modo a que as substâncias ligadas são eluídas

diferencialmente. Dependendo das condições de adsorção e dos contaminantes a estratégia pode ser inversa, ou seja, a fase estacionária sequestrar somente contaminantes e deixar a molécula alvo passar pela coluna. A eluição é mais frequentemente realizada empregando um gradiente contínuo ou aumentando gradualmente a força iônica, geralmente utilizando NaCl para conseguir o aumento da força iônica.

A carga líquida da superfície de proteínas varia de acordo com o pH da solução, quando o pH está abaixo do pI a carga da proteína tem carga positiva, quando o pH está acima do pI a proteína terá carga líquida negativa. Normalmente, quando o pH está acima do ponto isoelétrico, a proteína irá se ligar a um trocador de ânions carregado positivamente, quando abaixo do seu pI irá ligar-se a uma carga negativa, um trocador de cátions. As resinas comerciais mais comuns estão ilustradas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1- Resinas comerciais comuns

Nome	Designação	Estrutura	pKa
Ânions fortes			
Trimetilaminoetil	TAM	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	-
Trietilaminoetil	TEAE	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_3$	9,5
Dietil-2-hidroxiopropil aminoetil	QAE	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$	-
Ânions fracos			
Aminoetil	AE	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}_3$	6,5-7,0
Dietilaminoetil	DEAE	$-\text{C}_2\text{H}_4\text{N}^+\text{H}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$	9,5
Cátions fortes			
Sulfonato	S	$-\text{SO}_3^-$	2,0
Sulfometil	SM	$-\text{CH}_2\text{SO}_3^-$	-
Sulfopropil	SP	$-\text{C}_3\text{H}_6\text{SO}_3^-$	2,0-2,5
Cátions fracos			
Carbóxi	C	$-\text{COO}^-$	-
Carboximetil	CM	$-\text{CH}_2\text{COO}^-$	3,5-4,0

FONTE: HANDBOOK da Amershan Biociências, 2004.

Trocadores de íons fortes não mostram nenhuma variação na capacidade de troca iônica com a mudança no pH ou esta variação não é significativa. Estes trocadores não perdem prótons com a mudança de pH, assim não têm capacidade de tamponamento, mantendo-se totalmente carregados sobre uma ampla faixa de pH. Trocadores de íons fortes incluem Q, TAM, TEAE (aniônicas), S, SM e SP (catiônicas).

Uma vantagem dos trocadores de íons fracos, tal como DEAE (aniônico), AE (aniônico), C (catiônico) e CM (catiônico) é que eles podem oferecer maior seletividade em relação aos trocadores de íons fortes. Uma desvantagem é que os trocadores fracos podem perder prótons facilmente com a mudança do pH.

Contudo, mesmo que a proteína tenha carga líquida negativa, ela pode ligar-se a um trocador de cátions carregado negativamente, uma vez que pode haver grupos carregados positivamente na superfície da proteína suficientes para a ligação ocorrer. Naturalmente, a recíproca é verdadeira. Ligações não previstas ou ausência de ligações também podem ser causadas por alterações do pH do microambiente no interior do bulk (efeito Donnan). Isto pode aumentar o pH em trocadores aniônicos e diminuí-lo em troca catiônica.

A adsorção de uma molécula na superfície sólida do suporte é uma questão termodinamicamente definida desta molécula entre as fases; quando o sistema atinge o equilíbrio não ocorre mais adsorção. O equilíbrio é expresso em quantidade de molécula adsorvida por quantidade de adsorvente (q^*), isso pode ser medido através da concentração da molécula de adsorbato (C^*) em solução, a expressão obtida é denominada isoterma de adsorção. Existem vários modelos matemáticos desse tipo na literatura, os mais comuns são os modelos de Langmuir, Freundlich e linear (SILVA; 2010).

Langmuir é um modelo clássico e dentre os modelos citados, é o único com base teórica. Os fundamentos deste modelo são: formação de uma camada homogênea na superfície sólida, sem que haja interações entre as moléculas adsorvidas e recobrimento da superfície adsortiva em monocamada. A representação matemática desta isoterma é apresentada na Equação 1.

$$q^* = \frac{qm \times C^*}{K_L + C^*} \quad (1)$$

onde C^* é a concentração da molécula em solução em equilíbrio com a quantidade adsorvida por quantidade de adsorvente q^* , K_L é a constante de equilíbrio e qm é capacidade máxima de adsorção. (DUTTA; BORAH; DUTTA, 2004).

O modelo de Freundlich corresponde à adsorção em uma superfície que contém sítios não uniformes. A falta de uniformidade pode ser causada também pelas forças repulsivas entre átomos ou moléculas adsorvidas. A equação assume que a quantidade adsorvida tende à infinito, levando à formação de multicamadas de moléculas adsorvidas. A Equação 2 descreve matematicamente esta isoterma:

$$q^* = K_F \times C^{*n} \quad (2)$$

Onde K_F é a constante da isoterma de Freundlich e n é um índice desta isoterma.

O valor de n representa o grau de heterogeneidade da superfície, $n > 1$ quando a isotérma é favorável e $n < 1$ no caso de isotérma desfavorável. A isotérma de Freundlich apresenta a desvantagem de ajustar bem os dados experimentais somente numa faixa estreita de concentrações de soluto (DUTTA; BORAH; DUTTA, 2004).

A isoterma de adsorção linear é o modelo mais simples de isoterma. Esta descreve o equilíbrio de adsorção linear segunda a equação abaixo:

$$q^* = K_L \times C^* \quad (3)$$

onde, K_L é a constante da isoterma.

Esse modelo apresenta a vantagem de descrever um conjunto de dados de adsorção em função de um único parâmetro, K_L . Porém, raramente se ajusta para grandes variações de concentração. Portanto, não se devem fazer extrapolações utilizando este modelo (DUTTA; BORAH; DUTTA, 2004).

2.3.4 Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular ou gel de filtração (GF) é um método para a separação de proteínas e peptídeos com base no seu tamanho. A matriz de cromatografia é constituída de partículas porosas, e o tamanho dos poros da partícula define o tamanho das proteínas que podem ser separadas (PESSOA; KILIKIAN, 2005).

O princípio básico do método é a partição entre as moléculas de diferentes tamanhos, entre uma fase estacionária inerte com porosidade definida e uma fase móvel. Proteínas pequenas tendem a entrar nos poros da fase estacionária, proteínas maiores não entram nos poros e acabam encontrando um menor volume para atravessar a coluna. Por isso, são as primeiras a sair da coluna. Uma vez que nenhuma ligação com a matriz é necessária e condições rigorosas de eluição podem ser evitadas, a filtração em gel raramente inativa as enzimas.

Os fatores experimentais que determinam a resolução nesse tipo de cromatografia são fluxo e volume de amostra. O volume de amostra é expresso como porcentagem do volume total; volumes menores de amostra ajudam a evitar a sobreposição de picos de eluição.

Para fracionamento de alta resolução, recomenda-se volume de amostra a partir de 0,5% a 4% do volume total da coluna. Para a maioria das aplicações, o volume da amostra não deve exceder 2% para alcançar a máxima resolução. Dependendo das características da amostra a ser separada, pode ser possível aplicar volumes maiores, especialmente se os picos de interesse estão bem resolvidos, este fator pode ser determinado experimentalmente (GE Hand Book, 2001).

2.3.5 Purificação de PGA

A purificação de PGA tem sido extensivamente estudada. Como a aplicação da enzima pode ser realizada em diversas áreas, o grau de purificação exigido para cada caso pode variar significativamente. Em geral procura-se empregar o menor número de etapas possíveis para que o processo seja simples, eficiente e custo-efetivo.

Entre as PGAs, a enzima de *E. coli* é a mais estudada. Na literatura são encontradas diversas estratégias para purificá-la. Técnicas como precipitação (BALASHINGAM et al., 1972), sistema aquoso bifásico (AGUILAR et al., 2006), adsorção hidrofóbica (ZHOU et al., 2007), adsorção de pseudo-afinidade (FITTON et al., 2001), adsorção de troca iônica (AGUILAR et al., 2006; BALASHINGAM et al., 1972; ORR et al., 2013; PINOTTI et al., 2009) já foram utilizadas para purificar a PGA de *E. coli*. O procedimento mais estudado para purificar PGA de *E. coli* envolve pelo menos uma etapa de adsorção de troca aniônica, porém, somente um trabalho do grupo do DEQ/UFSCar (PINOTTI et al., 2009) e um trabalho de Zhou e colaboradores, 2008, reportaram a adsorção de troca catiônica. Contudo, estratégias não convencionais de purificação como adsorção e imobilização da enzima em uma única etapa e integração de processos podem ser alternativas, pois do ponto de vista operacional é interessante reduzir ao máximo o número de etapas de purificação.

A purificação da PGA de *B. megaterium* é menos explorada. Somente dois trabalhos reportaram a purificação da enzima de *B. megaterium* expressa no próprio *B. megaterium* (PINOTTI et al. 2009; SHENTHILVEL; PAI, 1996). Kang e colaboradores 1991, e Yang et al. (2001), estudaram a purificação de PGA de *B. megaterium* expresso em *B. subtilis* e obtiveram ótimo resultado de purificação utilizando um passo de adsorção hidrofóbica combinada com uma etapa de adsorção aniônica.

Pinotti e colaboradores, 2009, avaliaram a recuperação de PGA produzida por *E. coli* e *B. megaterium* através de adsorção em resina de troca catiônica STREAMLINE SP XL[®]. A adsorção de PGA em leito expandido (ALE) foi comparada com o leito fixo. A PGA foi recuperada diretamente a partir do clarificado de *E. coli*, homogeneizados *E. coli*, e clarificados de *B. megaterium* através de ALE. Os

rendimentos globais de recuperação de 91, 55 e 7,4% e os fatores de purificação de 4,5, 7,5 e 12,7 vezes foram atingidos, respectivamente. Foi constatado que a adsorção em ALE é pouco eficiente em recuperação da enzima quando comparada com a adsorção em leito fixo, fato que pode ser explicado pela grande competição entre as enzimas e os debris celulares. Os trabalhos em discussão estão listados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2- Exemplos de estudos com purificação de PGA encontrados na literatura.

Microrganismo	Técnica utilizada	Ai	Af	F.P.	R	Método	REFERENCIA
<i>E. coli</i>	Adsorção de troca catiônica em leito fixo de clarificado	0,374	1,68	4,5	95	PDAB	PINOTTI et al., 2009
<i>B. megaterium</i>	Adsorção de troca catiônica em leito expandido de clarificado	0,213	2,66	12,5	7,5	PDAB	PINOTTI et al., 2009
<i>E. coli</i>	Precipitação com sulfato de amônio, diálise, adsorção aniônica	0,093	6,35	68,3	25	PDAB	BALASHINGAM et al., 1972
<i>E. coli</i>	Sistema aquoso bifásico PEG/citrato	5,1	17,8	3,5	97	PDAB	AGUILAR et al., 2006
<i>B. megaterium</i>	Adsorção hidrofóbica, adsorção aniônica, gel de filtração	1,8	111,3	61,8	54	PDAB	KANG et al., 1991
<i>B. megaterium</i>	Ultrafiltração, precipitação com sulfato de amônio, gel de filtração	0,4	2,6	6,5	15	PDAB	SHENTHILVEL; PAI, 1996
<i>P. chrysogenum</i>	Adsorção pseudo-afinidade	0,012	0,121	10,1	90	NIPAB	KECILI et al., 2006
<i>P. Purpurogenum</i>	Adsorção pseudo-afinidade	0,062	0,22	3,55	89	NIPAB	KECILI et al., 2006
<i>B. megaterium</i>	Adsorção iônica, adsorção hidrofóbica	1,56	45	28,8	85	NIPAB	YANG et al., 2001
<i>Providencia rettgeri</i>	Diálise, adsorção aniônica	18	42,9	2,38	98	NIPAB	SENEROVIC et al., 2005
<i>Alcaligenes faecalis</i>	Adsorção hidrofônica, diálise, adsorção aniônica	0,051	2,11	41,3	57,7	NIPAB	ZHOU et al., 2008
<i>E. coli</i> extracelular	Adsorção aniônica	1,05	1,32	1,2	97	PDAB	ORR et al., 2013
<i>E. coli</i> extracelular	Ultrafiltração, adsorção aniônica	1,05	16,3	15,5	98	PDAB	ORR et al., 2013

Ai e Af =Atividade específica inicial e final respectivamente (U/mg), F.P. = Fator de purificação (Ai/Af), R = Recuperação da atividade enzimática em %, Método = Método da leitura da atividade enzimática.

Novas técnicas envolvendo a integração de processos de recuperação e purificação em apenas uma etapa foram investigadas e utilizadas com sucesso em várias proteínas. Uma dessas estratégias é purificar PGA utilizando adsorção por afinidade e pseudo-afinidade (FITTON et al., 2001; KECILI et al., 2006; KHEIROLOMOOM et al., 2001). No entanto, quando são utilizados homogenatos (enzima não clarificada), a adsorção por afinidade tem geralmente pouco sucesso na purificação da enzima. A principal razão para essa falta de sucesso é devido a uma baixa atividade específica de soluções enzimáticas e altas concentrações de impurezas, principalmente de outras proteínas resultantes do rompimento celular.

Como a PGA é utilizada industrialmente na forma imobilizada, trabalhos recentes tem relatado a estratégia de realizar a purificação e a imobilização da enzima em uma única etapa (CHEN et al., 2007; CHEN, et al., 2011). Em um desses estudos, Chen e colaboradores, 2007, estudaram uma membrana bifuncional contendo grupos epoxi e íons de cobre imobilizados em ácido iminodiacético (IDA), desenvolvida para estudar o efeito sobre purificação e imobilização simultânea da PGA. Primeiramente a enzima foi adsorvida iônica pelos íons cobre, e a posteriori, foi imobilizada através de ligação covalente com os grupos epoxi da matriz em condição alcalina de pH 10, para formação das bases de Schiff. A purificação por afinidade com os íons cobres alcançou um fator de purificação de 4,26 vezes e 1,96 U/mg de atividade específica. Além disso, o derivado apresentou 96% de atividade recuperada após 26 ciclos de atividade durante dois meses.

A precipitação pode ser uma técnica atraente para concentrar e fracionar proteínas. Em 2006 um estudo conduzido por Aguilar avaliou a precipitação seletiva em sistema aquoso bifásico PEG/citrato de sódio. Para isso utilizou PEGs com diferentes concentrações e massas moleculares. Os dados foram confrontados com o processo tradicional de purificação, realizado por precipitação da enzima com sulfato de amônio e posterior troca aniônica. O sistema aquoso bifásico conseguiu recuperar 97% da enzima e purificar 3,5 vezes, atingindo uma atividade específica de 20,3 U/mg, enquanto a purificação tradicional por troca iônica recuperou 45% da enzima e purificou 5,7 vezes.

Yang e colaboradores, 2001, estudaram a purificação da PGA de *Bacillus megaterium* expressa em *Bacillus subtilis*, partindo do caldo de fermentação com 40 U/mL e atividade específica 1,56 U/mg, realizaram a purificação em dois passos.

Primeiro realizaram a adsorção em óxido de alumínio (Al_2O_3) e posteriormente realizaram uma cromatografia hidrofóbica com fenil sepharose CL-4B. Obtiveram uma atividade específica de 45 U/mg correspondendo a uma purificação de 29 vezes e a uma recuperação de 85% da atividade total.

Zhou e colaboradores, 2008, estudaram a purificação de PGA através da técnica high-throughput screening (HTS), um método de seleção de diferentes matrizes adsorptivas em microplaca de 96 poços, variando condições de pH e força iônica em cada matriz. Depois de encontrada a melhor condição, Zhou et al. (2008) puderam realizar um scale-up do processo em coluna para conferir se os parâmetros eram os mesmos do microensaio, e obtiveram menos de 6% de diferença no comportamento. A purificação de PGA de *Alcaligenes faecalis* expressa em *E. coli* por adsorção hidrofóbica, seguida de troca aniônica, apresentou um fator de purificação de 41,3 e uma recuperação de 57,7%, produzindo uma solução enzimática com atividade específica de 2,11 U/mg.

Orr e colaboradores, 2012a, conseguiram construir um clone de *E. coli* com produção de PGA extracelular num nível de 90% de enzima secretada. Com isso, foi possível realizar a purificação em uma única etapa de adsorção aniônica utilizando Q-Sepharose e compararem com a adsorção adicionando uma etapa anterior de ultrafiltração. O tratamento que utilizou o caldo bruto diretamente na troca iônica, obteve somente 1,3 de fator de purificação, já utilizando o pré-tratamento excluindo os pequenos peptídeos foi possível purificar a PGA 15,5 vezes atingindo uma atividade específica de 16 U/mg e iguais recuperações para os dois tratamentos. Nesse caso, a adição da etapa de ultrafiltração é indispensável para obter uma purificação significativa, sendo que somente essa operação purificou 5 vezes o caldo de fermentação.

Num segundo trabalho Orr et al., (2012b), com o mesmo clone de *E. coli* de produção extracelular, estudaram a filtração tangencial ligada à membrana cromatográfica de troca aniônica. No experimento a etapa de clarificação era realizada por microfiltração tangencial que era diretamente ligada antes da membrana de troca aniônica. Foi observado que realizando a etapa de adsorção iônica com os oligopeptídeos (sem prévia ultrafiltração) a purificação da PGA era muito baixa, já realizando uma pré-purificação por diafiltração com membrana de

3 kDa, foi possível purificar a enzima 13 vezes e obter 100% de rendimento no processo.

Shenthilvel et al.,(1996), e Kang et al.,(1991), realizaram a purificação de PGA de *Bacillus megaterium* por adsorção em coluna com DEAE (troca aniônica), seguida de gel de filtração utilizando sephadex G-100 e sephacryl S-200, respectivamente. Os pesquisadores obtiveram boa recuperação na etapa de exclusão por tamanho, perdendo somente 3 e 7% de atividade enzimática, respectivamente.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Equipamentos

- Agitador mecânico IKA® RW 20 digital
- Agitador orbital MA 830 Marconi
- Agitador orbital Innova® 44 New Brunswick
- Balança Bio Precisa FA 2104N
- Banho Termostático Nova Ética
- Bomba peristáltica Master Flex/LS
- Bomba peristáltica Bio Rad Tecno Pump
- Centrífuga Eppendorf 5810R
- Coletor de frações Bio Rad modelo 2120
- Coluna encamisada GE healthcare XK 16/20
- Coluna GE SR 25/45
- Concentradores Sartorius 50 kDa 15 mL
- Cuba de eletroforese GE gel box
- Espectrofotômetro de luz UV/Visível Pharmacia Biotec Ultrospec 2000
- Fonte Bio Rad Power Pac 1000
- Purificador de água Milli-q Millipore
- Holder Milipore Pellicon™ XX42PMINI
- pHmetro Qualxtron QX 1500
- Membrana Milipore PVA 50 kDa de 1m²
- Sonicador Sonics Vibra Cell
- Ultra freezer Forma Scientific

3.1.2 Reagentes e materiais

PGA comercial de *E. coli*, reativo de Bradford, 6-nitro-3-fenilacetamida de ácido benzoico (NIPAB) e albumina de soro bovino padrão (BSA) foram adquiridos da Sigma Chemical (St. Louis, EUA). Também foram utilizados: marcador de massa molecular see blue 2 (Invitrogen), concentrador Vivaspin 20 de 50 kDa (Sartorius), Immobead IB-C435 (Chiral Vision), STREAMLINE DEAE XL[®], STREAMLINE Q XL[®], STREAMLINE SP XL[®], Superdex 200 prep. Grad. e poliacrilamida da GE Healthcare. Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico de diferentes marcas.

3.1.3 Fonte de PGA intracelular: *Escherichia coli*

As suspensões de células de *Escherichia coli* BL21 (DE3), foram doadas pelo Laboratório de Bioquímica do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar. O plasmídeo pT101/D-TOPO com o gene *pac*, produtor de PGA (ABIAN et al., 2003; MONTES et al, 2007), foi gentilmente cedido pelo Laboratório de Biocatálise do ICP-CSIC-Madri, Espanha. O processo de transformação de *Escherichia coli* foi realizado no Laboratório de Engenharia Bioquímica do Departamento de Engenharia Química da UFSCar. A biomassa utilizada na preparação das suspensões foi produzida a partir de cultivos de *E. coli* recombinante em auto indução, em biorreator de 5 L, contendo meio complexo com lactose como indutor e glicerol e glicose como fontes de carbono (VELEZ, et al. 2011). Após o término do cultivo, a biomassa foi separada por centrifugação a 18000 g por 30 minutos a 4°C e armazenada em ultra freezer a -80°C. Os nutrientes utilizados nos cultivos estão listados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Composição do meio nutriente de *E. coli* utilizado no cultivo de auto indução em biorreator de 5L.

Nutriente (g/L)	Meio de autoindução	
	Batelada	Pulsos
Glicose	10.0	---
Glicerol	60.0	258.3
Lactose	20	130.0
Triptona	10.0	10.0
Extrato de levedura	5.0	5.0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.5	0.5
KH ₂ PO ₄	3.4	3.4
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	9.0	9.0
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	9.0	9.0
NH ₄ Cl	2.7	2.7
Na ₂ SO ₄	0.7	0.7

FONTES: VELEZ-tese, 2013.

3.1.4 Fonte de PGA extracelular: *Bacillus megaterium*

Neste estudo foi utilizada a seguinte construção para a produção de PGA recombinante: vetor pSSBm110-pga49 transformada em *B. megaterium* PV361 (cepa doada pela professora Patricia Vary, Universidade de Illinois, EUA), desenvolvido segundo Cueva et al. (2011). Os caldos utilizados no trabalho foram produzidos por dois cultivos de batelada alimentada em biorreator de 5 litros. Os dois cultivos continham os mesmos nutrientes, diferenciando-se apenas na fonte de nitrogênio, sendo caldo sintético composto por cloreto de amônio e o caldo complexo por peptona (Tabela 3.2).

Tabela 3.2 - Composição dos meios nutrientes utilizados nos cultivos de batelada alimentada de *B. megaterium* em biorreator de 5L.

Componente	Caldo sintético (g/L)	Caldo complexo (g/L)
MgCl ₂ x6H ₂ O	0,298	0,298
MnCl ₂ x4H ₂ O	0,0815	0,0815
FeSO ₄ x7H ₂ O	0,0123	0,0123
CaCl ₂	0,5	0,5
NH ₄ Cl	1,97	1,97
K ₂ HPO ₄	0,23	0,23
H ₃ BO ₃	2,01E-04	2,01E-04
CuSO ₄	2,19E-05	2,19E-05
ZnSO ₄	7,48E-06	7,48E-06
Na ₂ MoO ₄	3,54E-05	3,54E-05
CoCl ₂	6,91E-05	6,91E-05
KCl	6,038	6,038
NaCl	0,745	0,745
K ₂ SO ₄	0,048	0,048
Glicerol	533	533
Xilose	133	133
Biotina	2,7 mg/L	2,7 m/L
Fonte de nitrogênio complexa	---	90
Tetraciclina	10 mg/L	10 mg/L

FONTE: VELEZ, 2013

3.2 Métodos

3.2.1 Métodos de análise

3.2.1.1 Análise da atividade enzimática

Atividade da penicilina G acilase foi determinada utilizando a hidrólise de 6-nitro-3-fenilacetamida de ácido benzóico (NIPAB) através do método da velocidade inicial. O ensaio foi realizado com 0,15 mM de NIPAB em 50 mM de tampão fosfato pH 7,5 à 37°C e sob agitação magnética. A atividade inicial de hidrólise foi medida de 1 em 1 segundo, acompanhando o aumento da absorbância a 405 nm por 5 minutos. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima

necessária para hidrolisar 1 μmol de substrato por minuto nas condições específicas. A reação foi realizada em espectrofotômetro com controle de temperatura e agitação.

O coeficiente de absorção molar do NIPAB ($9,09 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) foi usado para calcular a atividade enzimática (Equação 4). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima capaz de catalisar a produção de 1 μmol de ácido-6-amino-nitrobenzóico (NABA) por minuto nas condições experimentais estabelecidas.

$$AE = \frac{(\text{Abs/min}) \cdot V_{\text{total de reação}} \cdot \text{FD}}{9,09 \cdot V_{\text{enzima}}} \quad (4)$$

No qual:

Coeficiente de absorção do NIPAB = $9,09/\mu\text{M}$

$V_{\text{total de reação}}$ = Volume da cubeta (1,5 mL)

V_{enzima} = Volume da solução enzimática (0,05 mL)

FD = Fator de diluição

AE = U/mL

3.2.1.2 Análise da concentração de proteínas

O procedimento utilizado foi o método descrito por Bradford (1976). Em eppendorfs, adicionou-se 1,5 mL do reativo comercial e 50 μl da amostra. A amostra foi diluída quando necessário, para que a concentração de proteína total não ultrapassasse a 500 mg/L. Amostra foi agitada em vórtice, e deixada em repouso por 5 minutos. A leitura da absorbância das amostras foi em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteína foi calculada através da comparação dos resultados com uma curva de calibração construída com BSA conforme o protocolo de diluição do fabricante.

3.2.1.3 Eletroforese

Para monitorar o perfil proteico presente nas etapas do processo de purificação realizaram-se eletroforeses SDS-PAGE em diferentes amostras do caldo fermentado e de cada operação de bioseparação. Gel de poliacrilamida 12% foi utilizado. Primeiramente, foi realizada uma pré-corrída de 12 min a 160 V, em seguida as amostras foram aplicadas e foi realizada a corrída com uma corrente de 160 V por 60 min. A revelação era realizada usando Coomassie Blue (WILSON et al., 1983) ou nitrato de prata (BLUM et al., 1987).

3.2.2 Purificação da PGA de *E. coli*

3.2.2.1 Preparo das suspensões celulares para o rompimento.

Foram preparados tampões de diferentes sais em concentrações de 20 mM para avaliar o desempenho na etapa de rompimento. A biomassa foi descongelada e resuspendida em cada tampão na proporção 30 g_{células seca}/L. Após o rompimento foi coletada uma amostra da suspensão rompida para análise de atividade enzimática. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante foi coletado para medir o pH e atividade enzimática.

O experimento foi conduzido com os tampões citrato e acetato com intuito de avaliar se o tampão citrato, por conter 3 grupos ionizáveis, competia mais pela resina comparado ao tampão acetato, que apresenta somente 1 grupo ionizável. Além destes, os tampões fosfato e carbonato foram utilizados para avaliar condição de pH neutro e alcalino no rompimento. Os valores de pH foram:

- Acetato pH 4,5; 5,0 e 5,4
- Citrato pH 4,5; 5,0 e 5,4
- Fosfato pH 7,0; 7,5 e 8,0
- Carbonato pH 9,0; 10,0 e 11,0

3.2.2.2 Rompimento da células: Sonicação

A biomassa foi descongelada lentamente e resuspendida no tampão selecionado em cada experimento. O processo de sonicação ocorreu pela aplicação de pulsos ultrassônicos durante 30 segundos e intervalos de 30 segundos, completando um total de 12 minutos de ultrassom. Todo o processo foi realizado em tubos falcon de 50 mL imersos em banho de gelo, para evitar a desnaturação térmica da enzima (FONSECA; CABRAL, 2002).

A solução após o rompimento foi chamada de homogenato. O homogenato foi centrifugado a 12000xg por 20 min a 4°C. A solução clarificada foi reservada para ensaios posteriores.

3.2.2.3 Influência do pH na adsorção em sistema descontínuo

Foram utilizadas seringas de 5 mL com suporte de algodão para reter a resina (STREAMLINE SP XL[®]), contendo 0,5 g de gel equilibrado com tampão de adsorção. Nesse processo aplicou-se um volume de 5 mL de clarificado, fez-se a lavagem com 8 mL do tampão de adsorção e por fim, a eluição da enzima, 2 vezes, utilizando 1,5 mL de tampão de adsorção adicionado de 150 mM de NaCl. A atividade enzimática e concentração de proteínas totais foram medidas em cada etapa (clarificado, lavagem e eluições).

3.2.2.4 Isotermas de adsorção

Para obter as isotermas de adsorção, os ensaios foram realizados em tubos falcon de 50 mL contendo 0,5 g de resina previamente equilibrados com tampão citrato 20 mM pH 5,0. Uma alíquota de 10 mL de clarificado, com atividades entre 100-1500 U.L⁻¹ foi adicionada aos tubos. A adsorção ocorreu sob agitação orbital em 200 rpm, à 4°C e 22°C. Para assegurar que o equilíbrio já tinha sido atingido, os ensaios foram realizados durante 2,5 h. As amostras foram coletadas com filtro de 40 µm, e para os cálculos de atividade e proteína adsorvida foram utilizadas as Equações 5 e 6.

$$\text{Ads (UI)} = (A_0 - A_{\text{eq}}) * V_T \quad (5)$$

$$\text{Ads (mg proteínas)} = (P_0 - P_{\text{eq}}) * V_T \quad (6)$$

Onde: A_0 (U/mL) e P_0 (mg_{prot}/mL) são respectivamente a atividade e concentração de proteína total na solução protéica no início do processo. A_{eq} e P_{eq} são as concentrações de enzima e de proteínas atingidas no equilíbrio. V_T = Volume total oferecido.

Com os dados obtidos no teste de adsorção, ajustou-se, com o auxílio do software *OriginPro 6.0*, curvas de adsorção baseadas na expressão da isoterma de Langmuir (ajuste não linear), apresentada na Equação 7 (PORPINO, 2009):

$$q^* = \frac{qm \times C^*}{K_L + C^*} \quad (7)$$

em que q^* é a quantidade de atividade adsorvida no sólido (em U/g), qm é a constante de Langmuir que fornece a capacidade máxima de adsorção teórica na monocamada (em U/g), K_L é uma constante relacionada à energia de ligação da enzima ao suporte e C^* é a concentração de atividade no equilíbrio (em U/ml).

3.2.2.5 Adsorção em coluna de leito fixo

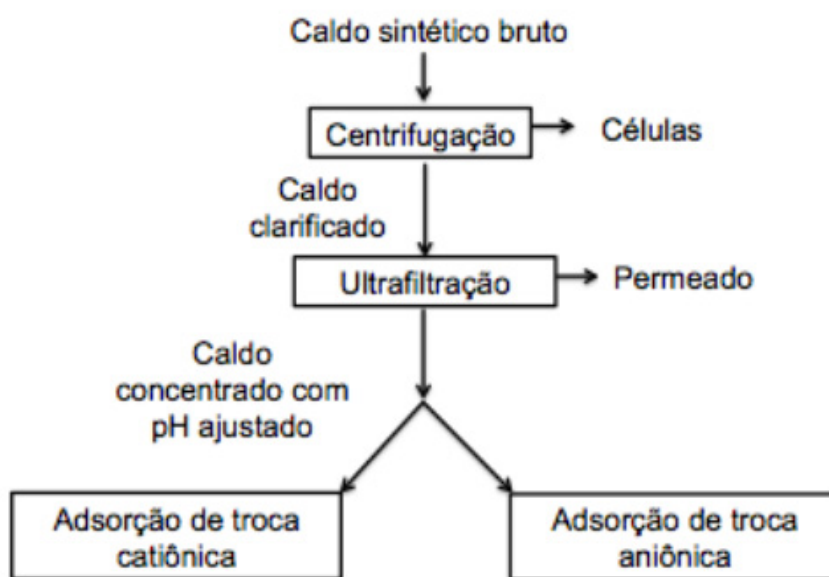
Uma coluna GE Healthcare XK 16/20 foi empacotada com 9 mL de gel (STREAMLINE SP XL[®]). Inicialmente a resina foi equilibrada com o tampão de adsorção (citrato 20 mM pH 5,0). Após o equilíbrio, foi aplicado o clarificado com um vazão de 6 mL/mim, então a coluna foi lavada com tampão de adsorção à mesma vazão. A etapa de eluição foi realizada com o tampão de eluição adicionado de 150 mM de NaCl e vazão de 3 mL/mim. Amostras foram coletadas ao longo do processo para avaliar a concentração de proteínas totais e atividade enzimática.

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

3.2.3 Purificação de PGA de *B. megaterium*

A purificação da PGA de *B. megaterium* foi realizada a partir dos dois últimos e principais cultivos realizados pela Dr. Ana María Velez. O primeiro deles foi o cultivo em meio sintético; sua purificação está representada de maneira global na Figura 3.1.

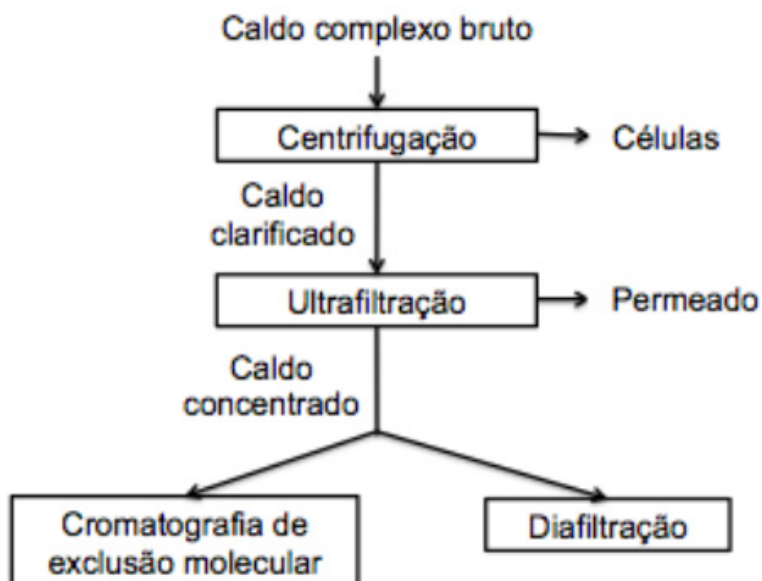
Figura 3.1 –Esquema da purificação de PGA de *B. megaterium* recombinante cultivado em meio sintético.



Fonte: Própria elaboração.

O último cultivo foi realizado em meio complexo (Tabela 3.2). A produção da enzima alcançou um nível muito acima do esperado, portanto a estratégia de purificação nesse caso foi diferente, troca iônica foi substituída por gel de filtração e diafiltração, os procedimentos experimentais utilizados estão ilustrados na Figura 3.2.

Figura 3.2 -Esquema da purificação de PGA de *B. megaterium* recombinante cultivado em meio complexo.



Fonte: Própria elaboração.

3.2.3.1 Clarificação do caldo: Centrifugação

Após o final de cada cultivo, o caldo bruto foi centrifugado à 10000xg por 30 min a 4°C. Após a clarificação o caldo foi armazenado em freezer à -20°C ou levado diretamente para ultrafiltração tangencial em membrana de PVA com corte de 50 kDa.

3.2.3.2 Ultrafiltração do caldo dos cultivos de alta densidade

Os caldos provindos dos cultivos de alta densidade foram ultrafiltrados em membrana de PVA (1m²) com corte de 50 kDa, suportada em um holder de filtração tangencial. A saída do retido foi estrangulada para forçar a passagem do permeado e foi disposta para voltar à solução inicial, no intuito de concentrar o caldo. A vazão foi controlada para que a pressão transmembrana de entrada não ultrapasse 1,0 Bar.

3.2.3.3 Preparação do suporte MANAE-AGAROSE

Suportes monoaminoetil-N-etil-agarose (MANAE-AGAROSE) foram preparados por aminação de glioxil-agarose, sendo este preparado por eterificação da agarose com glicidol e posterior oxidação dos grupos gliceril com periodato de sódio. Sob agitação suave e em um banho de gelo, 105 g de agarose, previamente lavadas com água destilada, foram misturadas com 30 mL de água destilada, 50 mL de NaOH 1,7 N, contendo 1,425 g de borohidreto de sódio (previamente preparado a frio), 36 mL de glicidol foram adicionados lentamente para evitar elevação da temperatura. A suspensão formada foi agitada por 15 h. O suporte eterificado (gliceril-agarose) foi lavado com água destilada e seco por sucção à vácuo. Em seguida, 105 g do gel foi ressuspenso em 895 mL de água (relação suporte suspensão de 1:10) e periodato de sódio foi adicionado, 3,13 g para o suporte com alta ativação (80 μ moles de grupos aldeídos por grama de gel) ou então 1,56 g para o suporte com baixa ativação (40 μ moles de grupos aldeídos por grama de gel). Depois de 2h de agitação suave na temperatura ambiente, o suporte glioxil-agarose foi lavado com água destilado e seco por sucção à vácuo (TARDIOLI; ZANIN; MORAES, 2006).

O suporte glioxil-agarose foi aminado com etilenodiamina, de acordo com o método de Fernández-Lafuente (1993). Para cada grama de suporte adicionou-se 4 mL de uma solução de etilenodiamina 2 M, pH 10 (preparado previamente a frio) e após agitação suave por 2 h à temperatura ambiente adicionou-se 0,0571 g de borohidreto de sódio e agitou-se por mais 2 h. O suporte MANAE-AGAROSE foi lavado com tampão acetato de sódio 100 mM, pH 4, para a remoção do borohidreto residual, e tampão borato de sódio 100 mM, pH 9,0, para desprotonar os grupos aminos, e por fim, água destilada em abundância.

3.2.3.4 Influência do pH na adsorção da enzima (caldo sintético)

Foram selecionados os melhores valores de pH para adsorção em diferentes resinas, catiônica fraca (IMMOBEAD IB-C435), catiônica forte (STREAMLINE SP XL[®]), aniônicas fracas (MANAE-AGAROSE e STREAMLINE DEAE XL[®]) e aniônica forte (STREAMLINE Q XL[®]).

Os valores de pH de adsorção foram definidos em relação ao pI da enzima, em torno de 7. Para as resinas de troca catiônica o pH do caldo foi ajustado através da diluição em tampão acetato (20mM) em pH 5; 5,5 e 6. Na troca aniônica foram avaliados os pH 6,5; 7 e 7,5 em tampão fosfato (10mM) para MANAE-AGAROSE e para as STREAMLINE Q e DEAE foram testados pH 7,5 e 8,5 em tampão tris-HCl (10mM). Após o processo de ajuste do pH, 10 mL do caldo foram colocados em tubo falcon contendo 0,5 g de resina previamente equilibradas com o respectivo tampão de diluição. A adsorção foi realizada com agitação orbital em shaker à 100 rpm e 4°C. Foram retiradas amostras do sobrenadante até que o equilíbrio fosse atingido.

3.2.3.5 Isotermas de adsorção

Após selecionar o melhor pH de adsorção para cada matriz, foi avaliada a capacidade de adsorção de cada resina. O caldo sintético foi diluído, com diferentes atividades, na faixa de 50-5000 U.L⁻¹. A adsorção foi realizada em tubos falcons contendo 0,5g de resina e 10 mL de cada diluição, com agitação orbital em shaker a 150 rpm e 4°C. Foram coletadas amostras até 1h de experimento para garantir o equilíbrio em cada adsorção, e foram quantificadas atividades e proteínas totais nos sobrenadantes. Para o ajuste da isoterma de Langmuir foi utilizado o *Origin 6.0* conforme a Equação 9 contida no item 3.2.2.4.

3.2.3.6 Adsorção em coluna de leito fixo (caldo sintético)

Uma coluna GE 16/20 foi empacotada com 8 g de STREAMLINE Q para troca aniônica e para troca catiônica 10 g de STREAMLINE SP. Para alimentação do leito fixo foi oferecida a carga máxima de atividade encontrada na isoterma de Langmuir, a vazão utilizada foi 2 mL/min para todo processo. A eluição foi realizada com o próprio tampão de processo com diferentes forças iônicas, ajustadas com NaCl para concentrações finais de 50-1000 mM. Foram coletadas amostras a cada minuto para quantificação de atividade e proteína.

3.2.3.7 Gel de filtração (caldo complexo)

Com o caldo complexo foi realizada purificação em coluna de exclusão molecular. Para esse processo, foi utilizada uma coluna GE SR 25/45 empacotada com 140 mL de Sephadex 200 prep grad. Foi aplicado na coluna um volume de clarificado de 3,5% do volume da coluna, e a eluição foi realizada com tampão fosfato 50 mM pH 7,5. A vazão foi de 1 mL/min do começo ao fim do processo. Foram coletadas amostras de 1 mL até que não fosse detectado atividade e proteína na saída da coluna. Para detecção de proteínas foi avaliada absorbância a 280 nm, comprimento de onda onde os aminoácidos com cadeia lateral aromática absorvem luz.

3.2.3.8 Diafiltração (ultrafiltração do caldo complexo)

O caldo clarificado foi diafiltrado em tubos falcon contendo membrana de ultrafiltração com corte de 50 kDa. Cada falcon recebeu 2,5 mL de enzima e foi diafiltrado contra tampão fosfato 50 mM pH 7,5. A centrifugação foi realizada a 3000 g, a 4° C por 15 min de cada vez. Assim que acabava uma centrifugação novamente era completado o volume do retido para 5 mL, coletado o permeado e repetia-se o processo, até que não fosse mais detectada proteína no permeado.

4. RESULTADOS

4.1 Purificação de PGA de *E. coli*

4.1.1 Influência do tampão e do pH no rompimento celular

Pinotti e colaboradores, 2009, realizaram um trabalho de purificação de PGA de *E. coli* selvagem, utilizando uma única etapa de adsorção em resina de troca catiônica STREAMLINE SP XL[®]. Foi verificado pelos autores que quanto menor o pH melhor é a adsorção da enzima, e que para valores de pH maiores que 5,0 a capacidade de adsorção diminui significativamente. Contudo, a maior dificuldade nesse procedimento era ajustar o pH do clarificado no valor desejado para realizar a adsorção. Apesar da enzima se apresentar estável em pH 4,8, o ajuste do pH acarreta inativação da enzima, principalmente quando ajustado com ácido concentrado, devido à grande queda do pH e calor localizado. Esse problema motivou a busca de novas estratégias para o ajuste do pH do extrato enzimático. Planejou-se inicialmente, um experimento para estudar a influência do pH no rompimento.

Sabendo-se que era necessário realizar a adsorção em pH próximo de 5,0, tentou-se realizar o rompimento no menor pH possível. No intuito de se verificar a existência de competição entre grupos negativos do tampão e os da enzima pela resina, foram testados os tampões acetato e citrato, os quais possuem 1 e 3 grupos ionizáveis respectivamente.

Nesse experimento, também foi necessário avaliar se a enzima sofria desnaturação no rompimento a pH ácido. Para isso foi coletada uma amostra do homogenato, sob agitação, logo após o rompimento. A atividade enzimática foi medida sob agitação magnética, para facilitar reação entre substrato e enzima, mesmo que esta estivesse adsorvida em debris celulares. Dessa forma foi possível medir a atividade enzimática do homogenato de maneira precisa.

Todas as suspensões foram rompidas com as mesmas concentrações de biomassa e o procedimento foi sempre realizado a 4°C para evitar desnaturação da enzima. Dessa forma, se o pH tivesse influência no rompimento das células ou na

desnaturação da enzima, as atividades dos homogenatos seriam diferentes. Os resultados são mostrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Atividade de PGA medida no homogenato e no clarificado após rompimento de *E. coli* em ultrassom, em diferentes pHs e tampões.

Tampão	pH Inicial	pH Final	Homogenato (U/mL)	Clarificado (U/mL)	Recuperação (%)
Acetato	4,5	5,0	2,83 ± 0,04	0,04 ± 0,01	1,26
	5	5,4	2,90 ± 0,07	0,18 ± 0,01	5,56
	5,4	5,8	2,88 ± 0,03	1,53 ± 0,07	52,80
Citrato	4,5	4,9	2,88 ± 0,07	0,13 ± 0,01	4,71
	5	5,4	2,99 ± 0,12	0,62 ± 0,03	22,35
	5,4	5,7	2,80 ± 0,1	1,97 ± 0,04	71,88
Fosfato	7	7,1	2,88 ± 0,07	2,75 ± 0,04	96,07
	7,5	7,4	2,88 ± 0,03	2,78 ± 0,03	99,18
	8	7,9	2,88 ± 0,03	2,73 ± 0,05	96,37
Carbonato	9	8,5	2,85 ± 0,05	2,78 ± 0,05	97,50
	10	9,5	2,81 ± 0,1	2,81 ± 0,07	100
	11	10,5	2,74 ± 0,09	2,75 ± 0,04	100

Homogenato = Suspensão celular após o rompimento, Clarificado = sobrenadante do homogenato, após centrifugação

Os resultados mostram que não ocorre desnaturação da enzima com o rompimento em nenhum dos valores de pH ou tampão testado. Contudo, parece ocorrer adsorção iônica da enzima nos debris celulares, quando são usados os tampões citrato e acetato.

Esses dois tampões têm pKas por volta de 4,7. Assim, menor o pH maior a concentração da forma não ionizada e menor a da forma ionizada. Isso explica o aumento da atividade enzimática no clarificado com o aumento do pH para os dois tampões. À medida que o pH aumenta, ocorre aumento da concentração das formas desprotonadas dos ácidos acético e cítrico, que passam a interagir com a enzima, o que permite que mais moléculas desta fiquem no clarificado. Uma vez que o ponto isoelétrico de PGA de *E. coli* é 6,9, a enzima deverá então, portanto, estar carregada positivamente a pHs abaixo desse valor, menor o pH, maior a carga positiva da

enzima. Por outro lado, a maioria dos debrís celulares têm carga negativa (fosfolípidos, RNAs, etc.). Assim, menor o pH, maior a carga positiva da enzima e menor a capacidade do tampão de interagir com a enzima, facilitando sua adsorção nos debrís. O aumento do pH aumenta a concentração da forma ionizada dos ácidos e desloca a enzima dos debrís para o meio. Ácido cítrico tem três grupos ionizáveis, com $pK_1=3,15$. Assim, mesmo no menor pH testado (4,5), esse meio já possui uma carga negativa que compete com os debrís pela enzima, o que explica os melhores resultados de atividade obtidos no clarificado com esse tampão, para pHs até um pouco menores que os testados para tampão acetato, sendo que o pK do acetato é muito próximo do pK_2 do citrato.

Os tampões fosfato e carbonato foram testados a pHs acima de 7,0. Nessa faixa, a enzima se encontra com carga global negativa, situação onde não será mais atraída pelos debrís celulares. Concordantemente, não se observa qualquer influência do pH na atividade enzimática presente nos clarificados, além disso, foi possível encontrar a atividade perdida na clarificação com tampões ácidos através da resuspender o pellet da centrifugação dos tratamentos ácidos e assim recuperar a atividade perdida na clarificação.

A partir dos rompimentos realizados em valores de pH alcalinos foi possível observar que a recuperação da enzima no clarificado é total, confirmando a hipótese anteriormente discutida, de que o problema estaria no ajuste de pH. O problema da adsorção nos debrís já havia sido observado por Pinotti et al., 2009, quando compararam os resultados da adsorção catiônica de PGA de *E. coli* em leite expandido do homogenato e do clarificado. Observaram então menor capacidade de adsorção da enzima para o homogenato que para o clarificado, o que justificaram por uma possível competição dos debrís celulares. Os resultados aqui apresentados confirmam essa hipótese.

Uma alternativa para preparar a enzima para a adsorção é trabalhar com rompimentos em valores de pH com boa recuperação da enzima no clarificado, e encontrar um método para acertar o pH sem que seja adicionado ácido concentrado, evitando a redução localizada de pH. Além disso, é possível trabalhar com um clarificado de pH alcalino e partir para adsorção de troca aniônica, evitando a etapa de ajuste do pH.

4.1.2 Seleção do pH para adsorção em STREAMLINE SP XL®

Verificou-se, portanto, que para não ocorrer perdas da enzima por adsorção em debris o rompimento pode ser realizado a valores de pH acima do ponto isoelétrico da enzima ou acima de 5,4, tendo-se em conta o ponto isoelétrico da enzima para evitar precipitação desta. A seguir, centrifuga-se o homogenato e concentra-se o clarificado por ultrafiltração. Este é então diluído em tampão concentrado no pH desejado, na proporção calculada para se atingir o pH e molaridade desejada para para testar a adsorção. Conforme já estudado por Pinotti e colaboradores, 2009, menor o pH maior a capacidade de adsorção da resina catiônica.

Foram testados tampão acetato e citrato. O tratamento com acetato foi descartado, pois no momento da diluição a solução precipitava. A partir de então, o experimento foi conduzido somente com tampão citrato 20 mM o qual apresentou boa estabilidade na diluição. Diluindo 3 vezes foi possível se obterem soluções clarificadas de PGA a valores de pH 5,0 e 5,4, com mesma atividade enzimática inicial. Os resultados são mostrados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Influência do pH na adsorção de PGA de *E. coli* em STREAMLINE SP XL® à 4°C, eluição com 2 vezes de 1,5 ml (150 mM de NaCl).

	q^{Act} (U/g)	q^{Prot} (mg/g)	η^{Ads} (%)	η^{Elu} (%)	η^{Proc} (%)	PF 1	PF 2
pH 5,0	8,34 ± 0,44	6,81 ± 0,57	51,1	65,4	33,1	2,7	3,3
pH 5,4	3,4 ± 0,21	3,92 ± 0,38	37,3	87,2	32,2	0,9	1,6

q^{Act} = capacidade de adsorção de atividade; q^{Prot} = capacidade de adsorção de proteínas totais; η^{Ads} = rendimento de adsorção de atividade; η^{Elu} = rendimento de eluição de atividade; η^{Proc} = rendimento global no processo; FP 1 = fator de purificação da primeira eluição; FP 2 = fator de purificação da segunda eluição.

Nessa faixa de pH estudada, os grupos sulfopropil (pKa~1,2) devem estar todos desprotonados (negativos) e a enzima deve estar com alta carga positiva, pois, praticamente, todos os grupos amino estão protonados. Conforme esperado, os melhores resultados foram obtidos no menor pH, 5,0.

Uma diminuição ainda maior de pH aumentaria a concentração de resíduos aspártico e glutâmico protonados (neutros), com conseqüente aumento da carga líquida positiva da enzima e da capacidade de adsorção na resina negativa. No entanto, não foi possível se obter experimentalmente valores ainda menores de pH. Passou-se assim à etapa de determinação da máxima capacidade de adsorção da

resina e de sua afinidade pela enzima, através de ensaios de equilíbrio realizados a pH 5,0.

4.1.3 Isotermas de Langmuir

A adsorção é uma reação exotérmica e se espera, portanto, que seja favorecida em baixas temperaturas. Os ensaios de equilíbrio foram, por isso, realizados a 4°C e 22°C.

O modelo de Langmuir (PORPINO, 2009) foi ajustado aos dados experimentais, usando o software *Origin 6.0* (ver cap. 3.2.2.4). Os resultados dos pontos experimentais, obtidos nas duas temperaturas em triplicata, são ilustrados na Figura 4.1, e os valores dos parâmetros estimados pelo ajuste do modelo de Langmuir à média dos pontos em cada temperatura estão mostrados na Tabela 4.3. Observa-se que foram estimados iguais valores para qm nas duas temperaturas, e que os desvios-padrão dos valores estimados para as constantes K_L são da mesma ordem de grandeza da diferença entre os valores estimados para esse parâmetro. Os resultados indicam, portanto, que dentro da precisão experimental com que foram obtidos os dados, não há influência da temperatura na adsorção, na faixa de temperatura estudada.

Figura 4.1 - Isotermas de adsorção de PGA a pH 5,0 em STREAMLINE SP XL®.

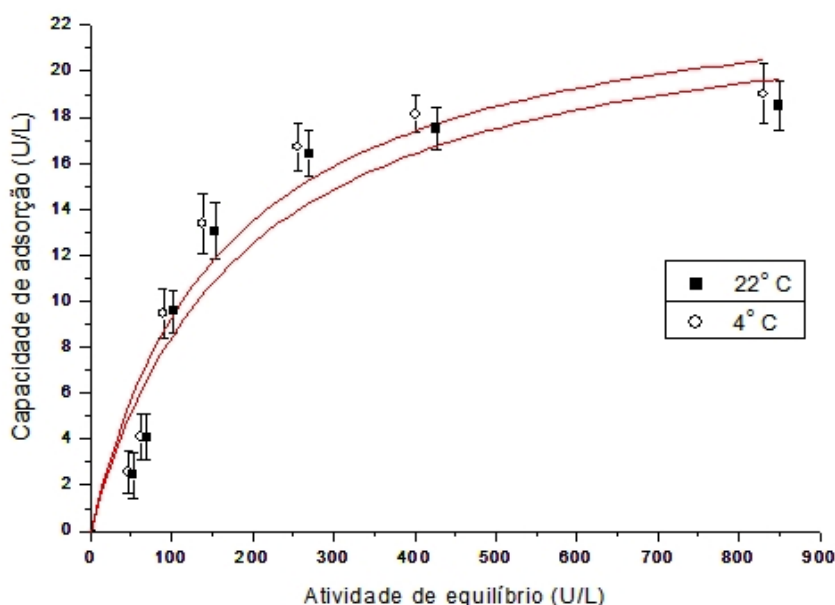


Tabela 4.3 - Parâmetros das isotermas de Langmuir para 4 e 22°C.

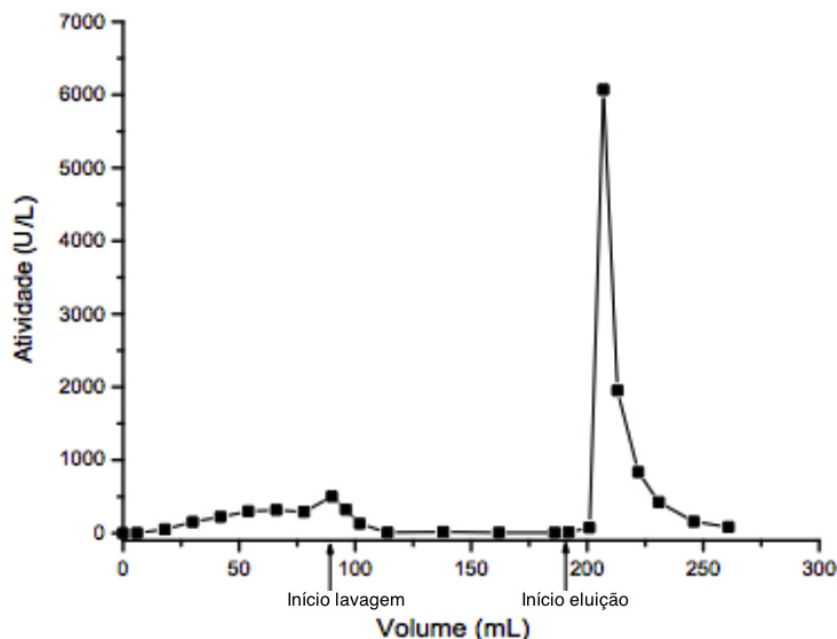
Temperatura	K_L (U/L)	qm (U/g _{resina})	R^2
4°C	175,9 ± 61,4	25,6 ± 3,5	0,91
22°C	194,5 ± 70,9	25,15 ± 3,7	0,91

Uma unidade de atividade de PGA de *E. coli* medida com NIPAB à 37°C equivale 0,44 unidades através da hidrólise de penicilina G a 37°C (Vélez et al., 2014). Pinotti et al. 2009, encontraram qm de 18 U_{PenG}/mL_{resina} para adsorção da PGA de *E. coli* selvagem na mesma resina. Convertendo os resultados do presente trabalho para base volumétrica (1 g = 1,5 mL), a capacidade máxima da resina é 17 U_{NIPAB}/mL_{resina} , que equivale à qm de 38 U_{PenG}/mL_{resina} . Esse resultado já era esperado, pois PGA de *E. coli* recombinante se apresenta mais pura inicialmente no caldo clarificado. A etapa seguinte foi o estudo do sistema em coluna de leito fixo.

4.1.4 Adsorção em coluna de leito fixo.

A alimentação da coluna foi realizada a partir do clarificado com pH ajustado, o mesmo utilizado para as isotermas (pH 5,0). A vazão de alimentação foi 6 mL/min e 2,5 mL/min para eluição. O leito foi empacotado com 9 mL de resina STREAMLINE SP XL[®] e volume de aplicação de 90 mL de clarificado com atividade 1300 U/L. Os resultados estão ilustrados na Figura 4.2.

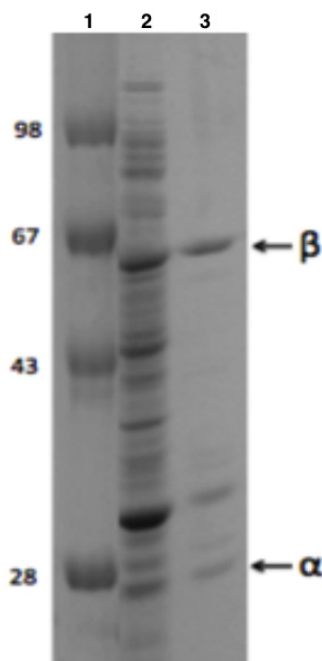
Figura 4.2 - Adsorção de PGA de *E. coli* recombinante em coluna de leito fixo empacotada com STREAMLINE SP XL[®], à pH 5,0 e 22°C.



A capacidade de adsorção da PGA no leito foi de 10,9 U_{NIPAB}/mL_{resina} ou atividade convertida 24,7 U_{PenG}/mL_{resina}. Pinotti et. al., 2009, obteve 6,4 U_{PenG}/mL_{resina} para enzima de *E. coli* selvagem na mesma operação, capacidade de adsorção 3,8 vezes menor, resultado proporcional a atividade específica inicial das PGAs comparadas. O rendimento de adsorção foi de 74% e eluição 66%, gerando 48% de recuperação global, resultados inferiores aos encontrados por Pinotti et al. (2009), que obteve um resultado de 75% de rendimento global. Contudo, alguns parâmetros podem ser otimizados nessa operação, tais como tempo de residência e aplicação de eluição gradiente.

Eletroforese SDS-PAGE (Figura 4.3) revela o perfil de proteínas no homogenato com 0,6 U/mg e no pico de eluição da enzima com 5,2 U/mg. Apesar da quantidade de proteínas no gel não estar padronizada, é possível observar que o F.P. de 8,6 vezes foi suficiente para remover a maioria das proteínas contaminantes, restando poucas bandas de proteínas contaminantes.

Figura 4.3 - Eletroforese SDS-PAGE (12%) das proteínas de *E. coli*, homogenato e pico de eluição da coluna empacotada com STREAMLINE SP XL[®].



Linha 1, Marcadores de tamanho molecular; linha 2, homogenato após rompimento (10 μ g de proteína); linha 3, pico de eluição da coluna 5,16 U/mg (5 μ g de proteína).

4.2 Purificação de PGA de *B. megaterium*

Conforme já comentado no Capítulo 1, a produção de PGA por *B. megaterium* selvagem foi estudada por vários anos no DEQ/UFSCar (NUCCI et al., 2007; PINOTTI et al., 2000, 2002, 2007a, 2007b, 2009; SILVA et al., 2006, 2008; SOUZA et al., 2005). Pinotti, 2003, estudou a concentração/purificação da enzima por ultra/diafiltração, mas os resultados foram sempre prejudicados pela baixa atividade volumétrica da enzima produzida e grande concentração de proteínas contaminantes provenientes do soro de queijo usado como substrato. Pinotti e colaboradores, 2009, estudaram então de forma sistemática, a aplicação da técnica de adsorção iônica para a purificação de PGA, de modo comparativo, para a enzima produzida de duas formas por microrganismos selvagens. Uma, secretada por *B. megaterium* e, outra, produzida no espaço periplasmático por *E. coli*.

Há vários anos o grupo passou a estudar também a produção da enzima por microrganismo recombinante. Recentemente, esse estudo permitiu obtenção de um

clone promissor de *B. megaterium* para produção de PGA. Além disso, técnicas de algoritmo genético e seleção de meios de cultivos possibilitaram um aumento significativo na produção da enzima. No melhor cultivo em shaker foi atingido 3,0 UI/mL. Passou-se então à aplicação da técnica de adsorção para PGA secretada por microrganismo recombinante, portanto em meio distinto do utilizado por Pinotti e col., 2009.

4.2.1 Ultrafiltração dos caldos de alta densidade

Para *B. megaterium* selvagem, os resultados obtidos em câmara rotativa sempre eram melhores que os obtidos em reator (PINOTTI, 2003, SILVA, 2006). Esperava-se assim uma atividade volumétrica igual ou inferior a essa no primeiro cultivo realizado em bioreator. Programou-se, por isso, a concentração do caldo por ultrafiltração. Surpreendentemente, contudo, obteve-se atividade final de 48 UI/mL no caldo complexo. Uma vez que já estava programada, foi realizada a ultrafiltração do caldo clarificado, obtido após centrifugação. Os resultados da ultrafiltração dos caldos clarificados estão ilustrados na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 -Parâmetros do processo de ultrafiltração dos cultivos de *B. megaterium* recombinante para produção de penicilina G acilase utilizando meio sintético e meio complexo em holder com membrana de 50 kDa de PVA com 1 m².

		Volume (L)	Atividade (U/L)	Proteína (mg/L)	A _{esp} (U/mg)	R %	F.P.	F.C.
Meio Sintético	INICIAL	2,50	3000,0	1265,8	2,37	-	-	-
	RETIDO	0,55	12600,0	5050,0	2,50	92,4	1,05	4,54
	PERMEADO	1,95	300,0	160,0	1,88	7,80	0,79	-
Meio Complexo	INICIAL	2,30	48500,0	11000,0	4,41	-	-	-
	RETIDO	1,00	104000,0	21300,0	4,88	94,2	1,10	2,30
	PERMEADO	1,30	7100,0	3200,0	2,22	8,20	0,50	-

A_{esp} = Atividade específica (U_{NIPAB}/mg_{Proteína}); R % = Atividade total no retido ou permeado/Atividade inicial total; F.P. = Atividade específica retida ou permeado/Atividade específica inicial; F.C. = Volume inicial/Volume de retido

O processo de ultrafiltração tangencial foi eficiente para concentração do caldo, com perdas menores que 8%. Para o meio complexo, a alta concentração de proteínas (11 g/L) não permitiu o fator de concentração obtido para o caldo sintético. O fator de purificação para os dois caldos de cultivo foram baixos, 1,1 e 1,05, para sintético e complexo, respectivamente. Contudo, proteína foi quantificada pelo método Bradford, que não detecta pequenos peptídeos (<5000 kDa), sendo que a única fonte de origem proteica utilizada como fonte de nitrogênio era peptona (peptídeos). Um maior fator de purificação ainda também poderia ser obtido com a realização de uma diafiltração.

Para o cultivo com caldo sintético a produtividade de PGA foi a esperada, o cultivo em biorreator não apresentou diferenças de produtividade em relação ao cultivo em frascos agitados. O próximo passo de purificação para este caldo foi o estudo de adsorção iônica. Como a operação de adsorção é uma operação de concentração e o caldo seria diluído novamente para alcançar o pH desejado, seria dispensável a operação de ultrafiltração, porém operando como diafiltração é possível utilizar tal operação como uma maneira de pré-purificar e ajustar pH. Apesar da característica de concentração da operação adsorção, a ultrafiltração contribui para a concentração da enzima, gerando facilidades no processo de adsorção como menores dimensões de coluna e menores tempos de residência.

4.2.2 Influência do pH na adsorção de troca iônica (caldo sintético)

Foi verificada a influência do pH na adsorção de troca iônica, com as resinas: STREAMLINE SP XL[®], IMMOBEAD IB-C435 (troca catiônica), MANAE-AGAROSE 40 e 80 $\mu\text{mol/g}_{\text{resina}}$, STREAMLINE DEAE XL[®] e STREAMLINE Q XL[®] (troca aniônica).

Conforme determinado por Pinotti et al, 2009, e confirmado neste trabalho, menor o pH, melhor a adsorção de PGA de *B. megaterium* em STREAMLINE SP XL[®]. Sabendo que o pKa do grupo sulfopropil é 1,2, qualquer pH acima de 2,0 é viável para que o grupo sulfopropil esteja desprotonado e possa fazer a troca catiônica. Já para a segunda matriz de adsorção catiônica, a IMMOBEAD IB-C435, era preciso testar valores de pH mais elevados, pois o grupo trocador de cátions, o ácido carboxílico, apresenta pKa por volta de 5,5 (Tabela 4.5).

Tabela 4.5 - Avaliação da influência do pH na adsorção de PGA de *B. megaterium* em resina de troca catiônica a 20 mM de força iônica em tampão acetato à 4°C.

pH	STREAMLINE SP XL®				Immobead IB-C435			
	A _{ativ}	A _{prot}	(U/g)	(mg/g)	A _{ativ}	A _{prot}	(U/g)	(mg/g)
5	93,1	90	40,5	3,2	74,8	35	32,5	1,8
5,5	48,9	35,9	21,6	2,7	81	20,5	35,9	1,6
6	15	2,6	6,5	0,1	77	15,8	32,8	1,2

A_{ativ} = Atividade adsorvida em %

A_{prot} = Proteínas totais adsorvidas em %

Atividade oferecida de 22 U/g

Para adsorção em resina com grupo ácido carboxílico, a faixa de pH estudado não mostrou grande influência na adsorção, porém em pH 5,5 apresentou pequeno aumento. Como a resina Immobead tem pKa 5,5, abaixo desse pH a adsorção fica desfavorecida em função da pequeno grau de ionização do suporte. Em contrapartida, valores de pH mais altos se aproximariam do pI da enzima.

Para os ensaios de troca aniônica, foram preparados suportes MANAE-AGAROSE com 40 e 80 µmoles de grupos amino por grama de suporte. Como esse grupo amino apresenta pKa 6,7 (FERNANDEZ-LAFUENTE; et al., 1993), valores de pH acima de 7,5 impossibilitam a troca aniônica, pois os grupos amino do suporte ficam desprotonados. Os resultados da adsorção estão ilustrados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 - Avaliação da influência do pH na adsorção de PGA de *B. megaterium* em resina de troca catiônica a 10 mM de força iônica em tampão fosfato à 4°C.

pH	MANAE 40				MANAE 80			
	A _{ativ}	A _{prot}	(U/g)	(mg/g)	A _{ativ}	A _{prot}	(U/g)	(mg/g)
6	1,9	7,3	0,8	0,4	5,2	17,1	2,1	1,3
7	4,1	5,0	1,9	0,3	5,5	5,0	2,3	0,3
7,5	6,8	2,4	3,1	0,1	10,0	2,4	4,4	0,1

A_{ativ} = Atividade adsorvida em %

A_{prot} = Proteínas totais adsorvidas em %

Atividade oferecida de 22 U/g

O grupo amino primário do MANAE-AGAROSE, apresentou melhor adsorção da PGA em pH 7,5. O suporte com 80 µmoles de ativação apresentou pequena vantagem na capacidade adsorção. A atividade cedida nesta adsorção e na anterior com resinas de troca catiônica foram às mesmas, então, é possível comparar diretamente as capacidades de adsorção. A melhor capacidade de adsorção para o suporte MANAE-AGAROSE foi de 4,4 U/g, enquanto que, no melhor modo de

operação, STREAMLINE SP XL[®] apresentou uma adsorção de 40,5 U/g, capacidade da ordem de 9 vezes maior.

As adsorções em STREAMLINE Q XL[®] e STREAMLINE DEAE XL[®] foram realizadas com os caldos sintéticos de cultivos em shaker, os quais apresentavam baixa atividade volumétrica. Tal fato levou a uma menor oferta de atividade para esses dois suportes. No entanto, com metade da atividade oferecida em relação à MANAE-AGAROSE, as resinas STREAMLINE de troca aniônica apresentaram maior capacidade de adsorção da PGA. As duas resinas STREAMLINE de troca aniônica não apresentaram influência para a faixa de pH testada (Tabela 4.7).

Tabela 4.7 - Avaliação da influência do pH na adsorção de PGA de *B. megaterium* em resina de troca catiônica a 10 mM de força iônica em tampão Tris-HCl à 4°C.

pH	STREAMLINE Q XL [®]				STREAMLINE DEAE XL [®]			
	A _{ativ}	A _{prot}	(U/g)	(mg/g)	A _{ativ}	A _{prot}	(U/g)	(mg/g)
7,5	17,9	52,6	4,3	2,1	18,8	47,4	4,5	1,8
8,5	19,5	52,9	4,4	1,9	21,2	47,1	4,8	1,6

A_{ativ} = Atividade adsorvida em %

A_{prot} = Proteínas totais adsorvidas em %

Atividade oferecida de 12 U/g

Diferentemente da resina MANAE, que não adsorveu nem PGA, nem proteínas contaminantes, as outras duas resinas aniônicas, curiosamente, não adsorveram PGA, mas adsorveram cerca de metade do total de proteínas. Uma vez que PGA deve contribuir significativamente para os restantes 50% de proteínas que permaneceram, é de se supor que essas duas resinas sejam interessantes para retirar do meio as proteínas contaminantes. Decidiu-se, por isso, testar uma das duas resinas em coluna de leito fixo. Foi selecionada para isso a resina STREAMLINE Q XL[®], pH 8,0.

4.2.3 Isotermas de adsorção (Caldo sintético)

Após a etapa de seleção de pH, ensaios de adsorção para a obtenção das isotermas foram realizados com as seguintes resinas e valores de pH: STREAMLINE SP XL[®] em pH 5,0 e IMMOBEAD IB-C435 em pH 5,5. As capacidades das resinas trocadoras de ânions foram medidas em relação a adsorção de proteínas pois o interesse neste tipo de troca era adsorver proteínas contaminantes.

Ensaio de adsorção foram realizados a partir do mesmo caldo sintético clarificado. Para cada resina, o caldo foi diluído separadamente em seu respectivo tampão e seguiu para adsorção. As Figuras 4.4 e 4.5 apresentam as isotermas de adsorção de atividade enzimática e proteína, para troca catiônica e aniônica respectivamente.

Figura 4.4 – Isoterma de adsorção de PGA utilizando caldo sintético clarificado a pH 5,0 para STREAMLINE SP XL[®], e pH 5,5 para IMMOBEAD IB-C435, a 4°C.

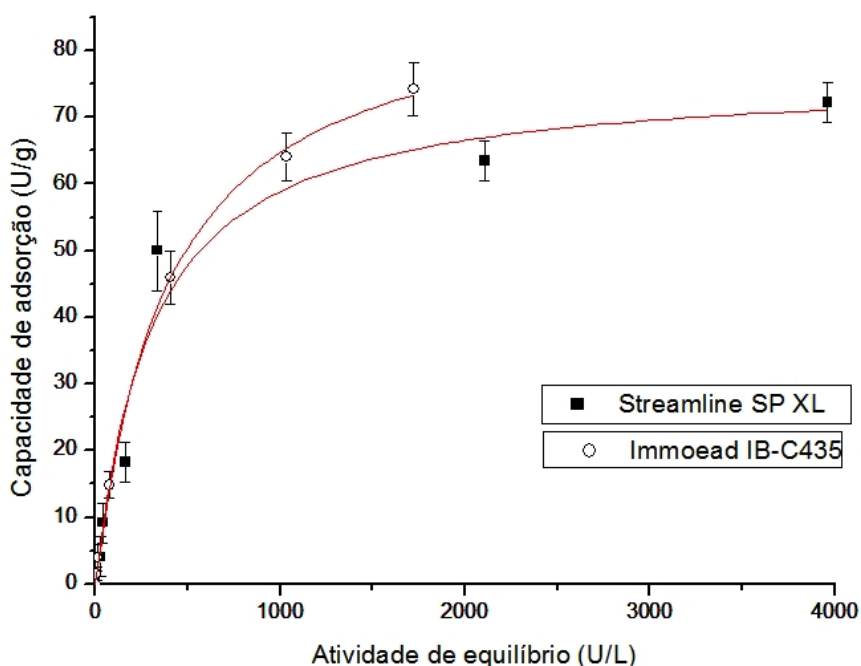
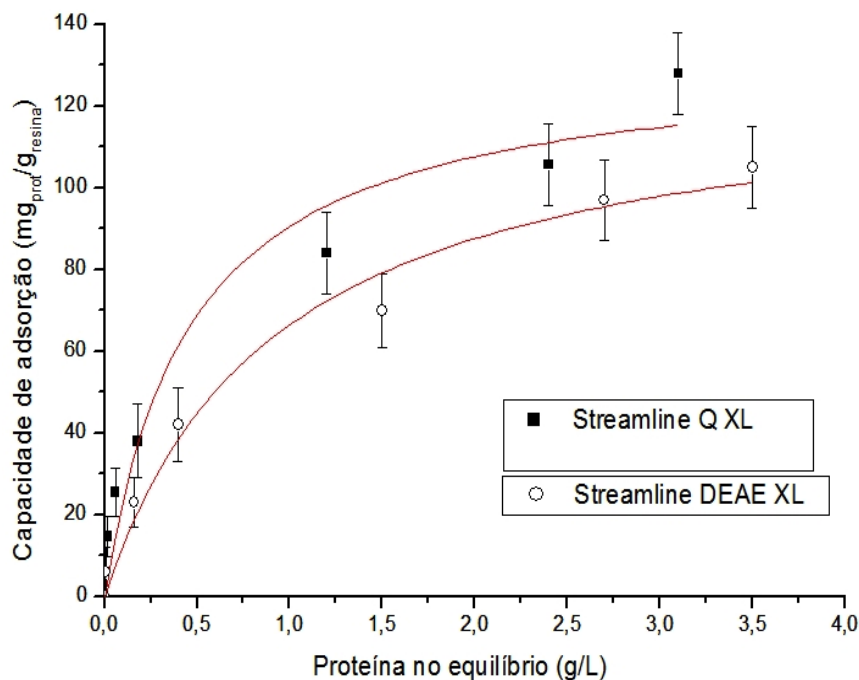


Figura 4.5 - Isoterma de adsorção de proteínas utilizando caldo sintético clarificado a pH 8,0 para STREAMLINE Q XL[®] e STREAMLINE DEAE XL[®], a 4°C.



As isotermas apresentaram bons ajustes ao modelo de Langmuir, com R^2 superior à 95%. A troca catiônica apresentou capacidades de adsorção (q_m) de 76,6 e 91,5 U/g para STREAMLINE SP XL[®] e IMMOBEAD IB-C435. Para as isotermas de proteína a troca aniônica apresentou boa capacidade de adsorção (q_m) de 132,7 e 128,3 mg/g para STREAMLINE Q XL[®] e STREAMLINE DEAE XL[®], respectivamente. (Tab. 4.8). Passou-se a seguir para o estudo em coluna de leito fixo.

Tabela 4.8 - Parâmetros do ajuste da isoterma de Langmuir aos dados de adsorção de PGA à 25°C.

Matriz	q_m (U/g)	K_L (U/g)	R^2
STREAMLINE SP XL [®] , pH 5,0	76,58 ± 6,62	294,68 ± 95,5	95,73
IMMOBEAD IB-C435, pH 5,5	91,55 ± 2,44	412,33 ± 34,5	99,88
	q_m (mg/g)	K_L (mg/g)	
STREAMLINE Q XL, pH 8,0	132,75 ± 10,01	0,46 ± 0,14	97,31
STREAMLINE DEAE XL, pH 8,0	128,29 ± 7,40	0,93 ± 0,16	99,10

q_m = Capacidade máxima de adsorção

K_L = Energia de ligação

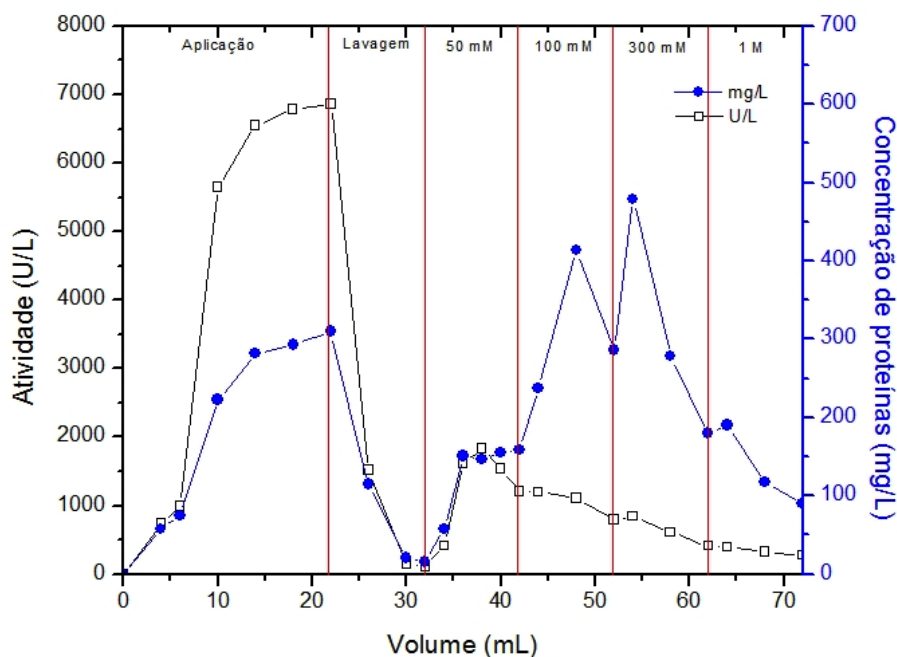
R^2 = Ajuste do modelo (%)

4.2.5 Adsorção de troca iônica em coluna de leito fixo (Caldo sintético)

4.2.5.1 Adsorção aniônica em STREAMLINE Q XL®

A primeira resina testada em coluna teve o comportamento esperado. PGA teve passagem praticamente livre pela coluna, mas a maior parte das proteínas contaminantes foi adsorvida nessa fase do processo. A Figura 4.6 mostra os resultados obtidos.

Figura 4.6 - Gráfico de concentração da atividade e atividade específica na saída da coluna, em função do volume do processo para adsorção de PGA de *B megaterium* em STREAMLINE Q XL®.



Parâmetros do processo: adsorção realizada com 8g de gel (12 mL), aplicação de 20 mL atividade 8,7 U/mL, lavagem de 10 mL com próprio tampão, eluídos com 10 mL em cada força iônica e vazão mantida para todo processo de 2 mL/min, 22°C e pH 8,0.

A atividade adsorvida nas condições ensaiadas foi de 7,1 U/g. A recuperação total da enzima foi de 6,6% na fração de eluição de 50 mM, onde ocorreu um pico de eluição de atividade, com F.P. máximo de 1,95. Já considerando o processo como adsorção de contaminantes, a recuperação da enzima na fração não adsorvida está próxima dos 70% com F.P. de 4 vezes, e ainda, garantindo a concentração inicial da enzima.

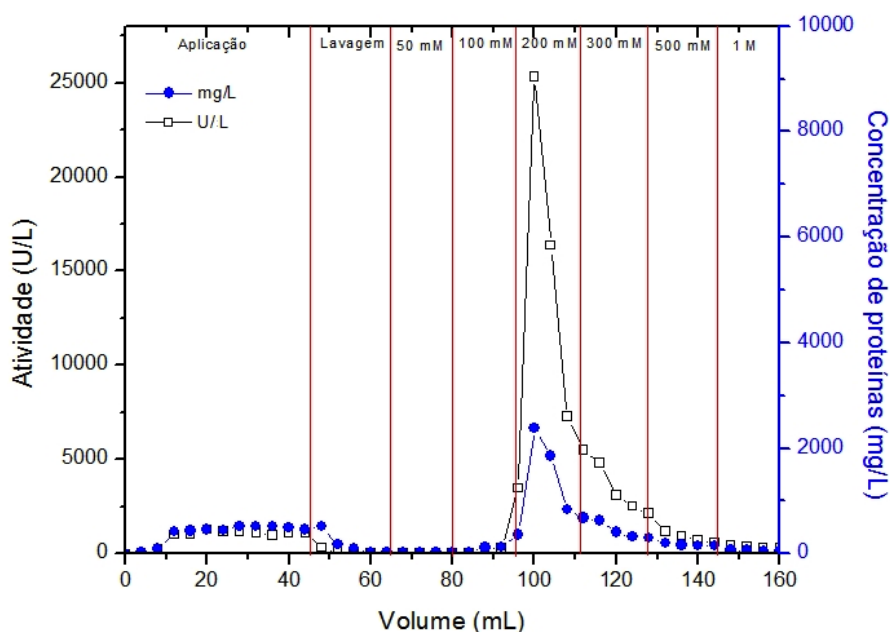
4.2.4.2 Adsorção catiônica em STREAMLINE SP XL®

Para a adsorção em resina de troca catiônica optou-se por testar a STREAMLINE SP XL®, assim é possível comparar com os resultados publicados por Pinotti, et al. 2009. Como no item anterior foi estabelecida a diálise prévia antes da aplicação do clarificado na coluna para a adsorção, se o resultado fosse ruim com dialisado, testar o caldo direto na alimentação da coluna seria dispensável.

A diálise se mostrou eficiente para acertar o pH da enzima sem desnaturação; foi possível alcançar pH 4,9 nessa etapa. A isoterma de adsorção já apontava capacidade muito superior para a troca catiônica, resultado que ficou evidente após os experimentos em coluna. Apesar de não ter sido aplicada a quantidade máxima para a capacidade da resina, os resultados apresentados pela adsorção da enzima na matriz foram muito superiores ao modo aniônico.

A atividade oferecida para a matriz de adsorção foi de 41 U/g, o rendimento de adsorção foi superior aos 90% e a recuperação total da enzima no pico de eluição foi de 70%. Apesar dos bons rendimentos de recuperação da enzima na operação, o F.P. foi apenas 1,61 vezes. Com esse resultado é possível concluir que não é possível fazer uma eluição seletiva da enzima em relação às outras proteínas presentes no caldo (Figura 4.7)

Figura 4.7 - Gráfico de concentração da atividade e atividade específica na saída da coluna, em função do volume do processo para adsorção de PGA de *B megaterium* em STREAMLINE SP XL®, à 22°C, pH 5,0.



Parâmetros do processo: adsorção realizada com 10,6g de gel (16 mL), aplicação de 40 mL atividade 10,4 U/mL, lavagem de 20 mL com próprio tampão, eluídos com 16 mL em cada força iônica e vazão mantida para todo processo de 2 mL/min.

Através dos resultados dos dois processos em coluna, é possível apontar para o processo de adsorção negativa. A tabela 4.9 ilustra a comparação entre os métodos. Os resultados de recuperação para o processo de adsorção de contaminantes no modo aniônico são similares ao rendimento da troca catiônica. Assim, o primeiro processo se torna mais vantajoso, porque além de alcançar um nível de purificação superior, a atividade volumétrica se mantém constante.

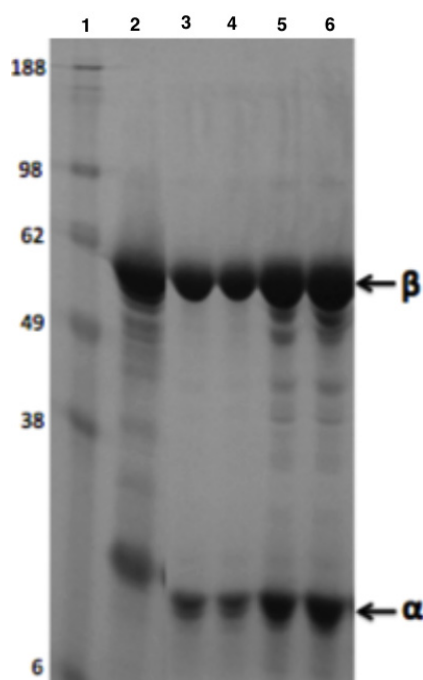
Tabela 4.9 - Comparação dos parâmetros das operações de troca catiônica e aniônica.

Resina	A_{ofer} (U/g)	Ads (U/g)	η_{ads}	η_{elu}	R_g	F.P.
Q (Eluído)	22,12	7,12	30	22	6,6	1,95
*Q (Negativo)	22,12	-	-	-	68	4,00
SP (Eluído)	41,13	37,8	92	75	70	1,61

*Q = Adsorção negativa, enzima recuperada da alimentação; A_{ofer} = Atividade oferecida na aplicação da amostra por massa de suporte; A_{ads} = Atividade adsorvida por massa de suporte; η_{ads} = rendimento de adsorção em %; η_{elu} = rendimento de eluição em %; R_g = rendimento global em % (recuperação da enzima).

A Figura 4.8 mostra de forma clara a diferença entre os dois tratamentos. O gel de eletroforese revela grande diferença entre as purificações em cada processo. A atividade específica do purificado da troca aniônica atingiu 25 U/mg, enquanto o purificado na eluição da troca catiônica alcançou somente 10,6 U/mg. A troca catiônica acabou concentrando algumas proteínas contaminantes, a corrida das proteínas em gel demonstra a baixa efetividade na separação entre enzimas e proteínas contaminantes. Enquanto que para corrida da adsorção negativa em troca aniônica, observa-se uma enzima com alta pureza.

Figura 4.8 - Eletroforese SDS-PAGE (12%) das proteínas de *B. megaterium*, caldo complexo, purificado da troca aniônica e purificado da troca catiônica.

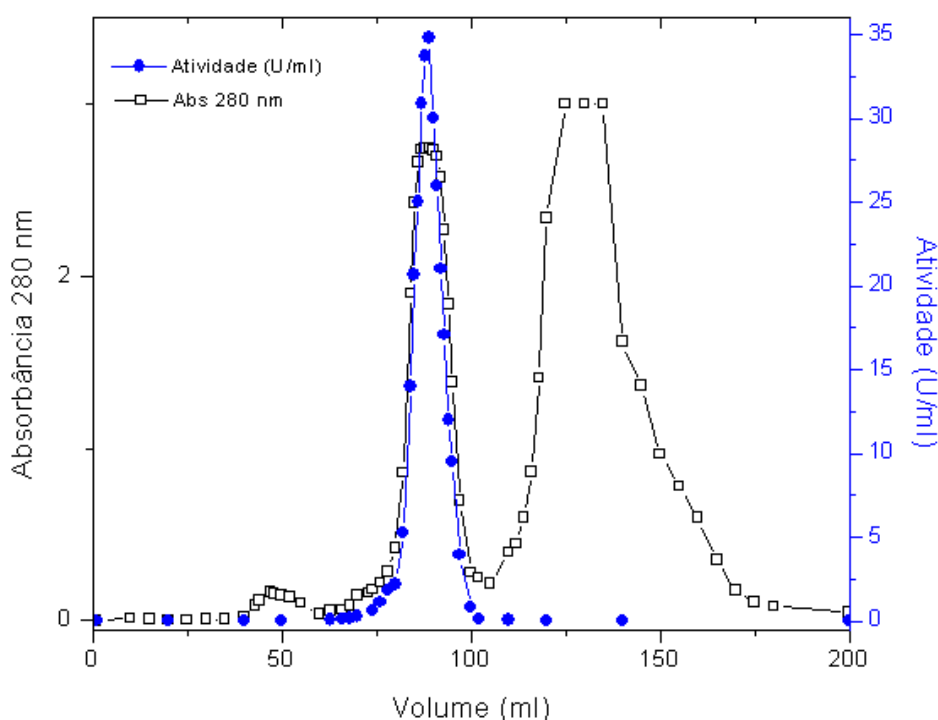


Linha 1: marcadores de massas moleculares, Linha 2: caldo complexo concentrado (20µg), linhas 3 e 4: amostras 10 e 12 mL da troca aniônica (10µg), linhas 4 e 5: amostras 100 e 104 mL da troca catiônica (20µg)

4.2.6 Gel de filtração (caldo complexo)

Como de forma inesperada o último cultivo em biorreator com meio complexo produziu uma atividade de aproximadamente 50 U/mL, outras estratégias de purificação ainda foram testadas com esse caldo. Uma boa alternativa de bioseparação da enzima altamente concentrada no caldo é a separação por tamanho em gel de filtração. A Figura 4.9 mostra o processo de exclusão molecular utilizando a resina Superdex 200 prep grad empacotada em uma coluna S 25/45.

Figura 4.9 - Gel de filtração do caldo complexo concentrado utilizando Superdex 200 prep grad, à 22°C e pH 7,5 (50 mM fosfato de sódio).



Parâmetros do processo: 140 mL de Superdex 200 Prep Grad, amostra de 5 mL (3,5%), 68 U/mL, vazão constante de 1 mL/min, amostragem de 1 mL.

Através da absorbância a 280 nm é possível observar a formação de 3 picos de eluição, o primeiro pico no volume de 50 mL, o segundo grupo pico no volume de 75 mL, onde a PGA é eluída, e no terceiro e maior pico de eluição não é possível detectar atividade enzimática significativa.

O volume de enzima na alimentação foi de 5 mL, o que corresponde a 3,5% do volume total da coluna, considerado dentro da faixa recomendada para obter boa resolução. A recuperação da PGA no processo foi alta, mais de 93% de enzima

recuperada, resultados equiparados aos encontrados na literatura (SHENTHILVEL; PAI, 1996; KANG; HWANG; YOO, 1991). A enzima recuperada apresentou atividade específica de 13 U/mg (F.P. de 2,9 vezes) para todo o pico de eluição.

4.2.7 Diafiltração: ultrafiltração (Caldo complexo)

Foi realizado um experimento preliminar para avaliar a diafiltração do caldo complexo. Como já é obtido um caldo com alta concentração e nível de pureza relativamente alto, uma etapa simples de diafiltração seria ideal para realizar a etapa de purificação em somente um passo antes do polimento ou formulação final da enzima.

O experimento foi realizado em tubos falcons concentradores com membrana de corte de 50 kDa. Uma amostra de 2,5 mL de caldo complexo concentrado foi adicionado ao concentrador com um volume completado para 5 mL com tampão fosfato 50 mM pH 7,5. A centrifugação foi realizada em 10 vezes de 15 minutos, sempre completando a amostra com 2,5 mL de tampão. Os resultados estão ilustrados na tabela 4.10.

Tabela 4.10 - Diafiltração do caldo complexo concentrado em falcon com membrana de 50 kDa.

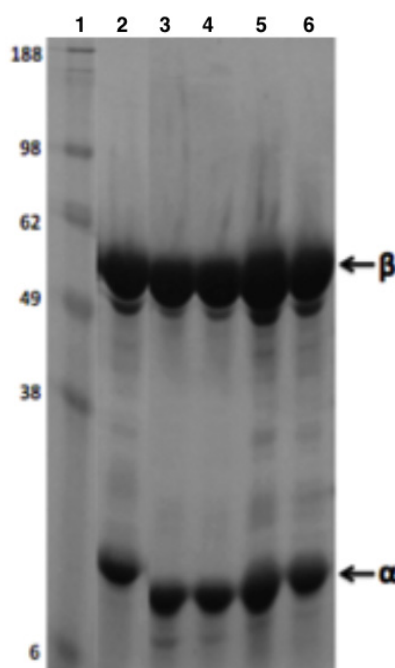
	A_{total} (U)	P_{total} (mg)	A_{esp} (U/mg)	Recuperação (%)
Inicial	220	32,3	6,81	-
Concentrado	175	20,4	8,58	80
Permeado	2,3	3,9	0,59	1

Embora a recuperação da enzima tenha sido de 80%, o F.P. foi de apenas 1,25 vezes. O experimento não apresentou o comportamento esperado; praticamente não houve purificação da enzima. Esse comportamento pode ser devido à polarização das membranas por contaminantes, pois pelo balanço de massa de proteínas, constatou-se uma perda de 20 % da proteína total no processo.

No entanto, a operação de ultrafiltração deve ser realizada novamente com membranas novas, e testar soluções de diafiltração que sejam capazes de estabilizar a estrutura da proteína, como açúcares ou polímeros. O gel de

eletroforese SDS-PAGE (Figura 4.10) apresenta os resultados obtidos com purificação da enzima produzida no caldo complexo, utilizando gel de filtração (exclusão molecular) e diafiltração. Pode-se observar que não ocorreu purificação expressiva na diafiltração. A exclusão molecular, contudo, foi um pouco melhor, atingindo 13 U/mg, com um fator de purificação de 2,9 vezes.

Figura 4.10 - Gel de eletroforese SDS-PAGE do caldo concentrado complexo, o purificado do gel de filtração e o diafiltrado.

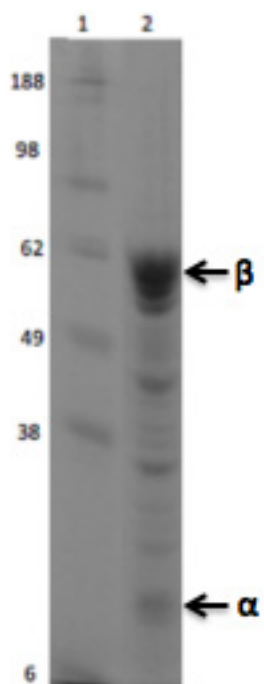


Linha 1, marcadores de massas moleculares; linha 2, caldo concentrado (20 µg); linhas 3 e 4, picos de eluição do gel de filtração (20 µg); linhas 5 e 6, duplicata do diafiltrado (20 µg)

4.2.8 PGA de *E. coli* comercial

PGA comercial de *E. coli* (Sigma) foi testada nas mesmas condições de trabalho para medida de atividade e concentração de proteínas. A enzima foi analisada num gel de eletroforese juntamente com a enzima purificada na troca aniônica (Figura 4.11). A enzima comercial de *E. coli* apresentou uma atividade de 250 U/mL com uma atividade específica de 2 U/mg. O grupo da UFSCar obteve 48 U/mL nos cultivos de *B. megaterium*, e, neste trabalho, se chegou a 100 U/mL, já com atividade específica no caldo de fermentação de 4,5 U/mg. No melhor resultado de purificação, se chegou a 25 U/mg, utilizando a adsorção negativa.

Figura 4.11 -Eletroforese SDS-PAGE da PGA comercial de *E. coli* (Sigma).



Linha 1, marcadores de massas moleculares. Linha 2, PGA comercial de *E. coli*

5. CONCLUSÃO

O primeiro desafio da purificação da PGA de *E. coli* era acertar o pH do clarificado. Inicialmente foi realizado um experimento para verificar a viabilidade de realizar o rompimento celular no pH desejado para a adsorção. O rompimento em valores de pH baixos, acarretam problemas na clarificação da enzima devido sua desnaturação na forma nativa ou possível adsorção da enzima em debris celulares. Após controlado o pH da solução enzimática, foi testada a adsorção em resina de troca catiônica STREAMLINE SP XL[®], esta etapa apresentou resultados similares aos já encontrados pelo grupo com a enzima de *E. coli* selvagem e meio contendo soro de queijo como fonte de nitrogênio.

A purificação estudada para PGA de *E. coli*, apresentou rendimento global de 48% na recuperação da enzima, para uma purificação de 8,6 vezes. Contudo, o rendimento da etapa de clarificação deve ser otimizado, realizando o rompimento a pH neutro ou ligeiramente alcalino para obter máxima recuperação da enzima no sobrenadante e avaliar outros métodos de concentração da enzima. Além disso, a etapa cromatográfica pode ser otimizada, realizando uma eluição gradiente. Outra alternativa é testar novas matrizes de adsorção, aniônica ou hidrofóbicas.

Para a PGA de *B. megaterium* houve mudanças na estratégia de purificação, de pouco concentrada e com muitas impurezas deparou-se com uma situação completamente diferente. Como os meios de cultivo complexo e sintético são diferentes em sua composição, pois no complexo contém fonte de nitrogênio complexo, foram realizadas processos de purificação distintos para cada meio.

Inicialmente esperava-se uma produção de PGA menor de 3000 U/L para o melhor cultivo (meio complexo), por isso já haviam sido traçadas metas para que depois da clarificação, pudesse ser realizada uma etapa de concentração da enzima. Portanto, após os cultivos, os caldos seguiram para clarificação e posterior concentração. A etapa de concentração foi realizada por ultrafiltração, porém os fatores de concentrações foram baixos, 4,5 e 2,3 para meio sintético e complexo respectivamente, isso se deve ao fato que o processo foi interrompido para evitar maiores perdas de atividade enzimática. Para os processos de adsorção a etapa de ultrafiltração poderia ser utilizada como diafiltração para acertar o pH final da solução enzimática.

Para o meio sintético, o qual apresenta somente sulfato de amônia como fonte de nitrogênio, começaram a ser estudados os processos de adsorção de troca iônica, tanto catiônica como aniônica. Para isso foram utilizados trocadores fracos e fortes nos dois tipos de troca iônica, utilizando STREAMLINE SP XL[®] e IMMOBEAD IB-C435 como trocadores catiônicos e STREAMLINE Q XL[®] e STREAMLINE DEAE XL[®] como trocadores aniônicos. Além disso, foram sintetizados suportes MANAE-AGAROSE com dois graus de ativação para avaliar também a troca aniônica.

Na avaliação de diferentes valores de pH para adsorção nas matrizes, já era possível observar que a troca catiônica é muito mais eficiente que a adsorção aniônica, porém a troca aniônica adsorvia grande parte das demais proteínas, por isso tornou-se interessante avaliar o processo de adsorção negativa. Os suportes MANAE-AGAROSE apresentavam uma capacidade ainda menor quando comparado às outras resinas de troca aniônica tanto para adsorção de PGA quanto para adsorção de proteínas, por isso foram descartadas do estudo. Assim as isotermas de atividade foram traçadas com as resinas STREAMLINE SP XL[®] e IMMOBEAD IB-C435.

Para os ensaios de adsorção em coluna, foram utilizadas STREAMLINE Q XL[®] (troca aniônica forte) e STREAMLINE SP XL[®] (troca catiônica forte). Quando a adsorção foi realizada em troca catiônica, a adsorção da enzima era quase total, porém os resultados de purificação não eram bons. Para adsorção em troca aniônica a PGA praticamente não foi adsorvida logo no início da alimentação da coluna, porém muitos contaminantes foram adsorvidos produzindo uma enzima 4 vezes mais puras e com alta atividade específica (25 U/mg). Sendo assim, a adsorção negativa utilizando troca aniônica tornou-se a opção mais promissora para purificação da enzima.

Como o cultivo em meio complexo em biorreator foi realizado somente no final do trabalho e o mesmo apresentou atividade muito superior ao caldo sintético, a estratégia de purificação foi diferente. O caldo complexo apresentou uma atividade de 48000 U/L e como o caldo já havia sido concentrado à mais de 100000 U/L, por isso a estratégia foi levar este caldo para uma etapa de cromatografia de exclusão molecular. Esta etapa de separação apresentou boa recuperação da enzima com uma atividade específica de 13 U/mg.

Considerando o melhor cultivo (meio complexo), a estratégia de purificação mais promissora seria testar a troca aniônica (adsorção negativa) para avaliar a possibilidade de adsorver a maioria dos contaminantes e ainda recuperar a enzima de maneira eficiente e sem diluições. Também seria interessante o estudo mais aprofundado da diafiltração contra soluções estabilizadoras para alcançar a formulação final da enzima.

Nesse momento, a enzima de *B. megaterium* se tornou mais vantajosa, em apenas uma etapa de clarificação (centrifugação) e uma etapa de polimento (troca iônica ou diafiltração) já se obtêm a enzima com o grau de pureza desejado. Já para enzima de *E. coli*, são no mínimo 4 etapas, clarificação, rompimento, clarificação e polimento, e ainda, o purificado final de *E. coli* está praticamente no mesmo nível de pureza do caldo de *B. megaterium*.

6. REFERÊNCIAS

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

AGUILAR, O.; et al. Direct comparison between ion-exchange chromatography and aqueous two-phase processes for the partial purification of penicillin acylase produced by *E. coli*. **Journal of chromatography. B**, v. 835, n. 1-2, p. 77–83, 2006

ARROYO, M. et al. Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 60, p. 507–514, 2003.

AZEVEDO, A. M.; FONSECA, L. P. D.; PRAZERES, D. M. F. Stability and stabilization of penicillin acylase. **Journal Chemical Technology Biotechnology**, v. 74, p. 1110–1116, 1999.

BALASUNDARAM, B.; HARRISON, S. T. L. Optimizing orifice geometry for selective release of periplasmic products during cell disruption by hydrodynamic cavitation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 54, n. 3, p. 207–209, 2001.

BARBERO, J. L.; et al. Complete nucleotide sequence of the penicillin acylase from *Kluyvera citrophila*. **Gene**, v. 49, p. 69–80, 1986.

BOCCU, E.; et al. *E coli* penicillin acylase: purification by affinity chromatography and covalent binding to nylon. **II Farmaco**, v. 45, p. 203–214 1990.

BLUM, H.; HILDBURG, B.; GROSS, H. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93–99, 1987.

BOCK, A.; et al. The Penicillin Acylase From *Escherichia Coli* ATCC 11105 Consists Of 2 Dissimilar Subunits. **FEMS Microbiology Letters**, v. 20, n. 2, pp.135-139, 1983.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, pp. 248-254, 1976.

CABRERA Z; et al. Asymmetric hydrolysis of dimethyl phenylmalonate by immobilized penicillin G acylase from *E. coli*. **Enzyme Microbial Technology**,v. 40, p. 997–1000, 2007.

CAI, G.; et al. Cloning, Overexpression, and Characterization of a Novel Thermostable Penicillin G Acylase from *Achromobacter xylosoxidans*: Probing the Molecular Basis for Its High Thermostability. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2764–2770, 2004.

CAMPBELL, M. K. (2000) **Bioquímica**. Porto Alegre: Ed. Artmed.

CHANDEL, A. K.; et al. The realm of penicillin G acylase in β -lactam antibiotics. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 42, no. 3, p. 199–207, 2008.

CHEN, C. I.; et al. Simultaneous purification and immobilization of penicillin G acylase using bifunctional membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 298, n. 1-2, p. 24–29, 2007.

CHEN, C. I.; et al. Direct penicillin G acylase immobilization by using the self-prepared immobilized metal affinity membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 380, n. 1-2, p. 34–40, 2011.

CHIANG, C.; BENNETT, R. E. Purification and properties of penicillin acylases from *Bacillus megaterium*. **Journal Bacteriology**, v. 93, p. 302–308, 1967.

COLE, M. Hydrolysis of penicillins and related compounds by the cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 115, p. 733–739, 1969.

CONSORTIUM, S. G.; et al. Protein production and purification. **Nature Methods**, v. 5, n. 2, p. 135-146, 2008.

COX, M.; NELSON D. L. **Princípios de Bioquímica de Lehninger - Ed. Comemorativa 25 Anos**, 5ª edição. Artmed, 2005, p 71-73.

CUEVA, E.M.; et al. Cloning and Expression of Penicillin G Acilase (PGA) by Recombinant *Bacillus megaterium* Using Different Signal Peptide. In: **11th International Chemical and Biological Engineering Conference**, Lisboa, Portugal, 5-7 September, 2011.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DEMAIN, A. L.; ELANDER, R. P. The beta-lactam antibiotics: past, present, and future. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 75, n.1-2, p. 5–19, 1999.

DESHPANDE, B. S.; et al. Molecular biology of β -lactam acylases. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 10, p. 129–138, 1994.

DIAGO, J.; LUDESCHER, J. **β -lactam production**. US Patent no 5.719.276, 1998.

DUGGLEBY, H. J.; et al. Penicillin Acylase Has A Single-Amino-Acid Catalytic Center. **Nature**, v. 373, n. 6511, p. 264- 268, 1995.

ENGLER, C. R.; et al. Disruption of microbial cells in comprehensive biotechnology. **Pergamon**, v. 2, p. 305–324, 1985.

ELANDER, R. P. Industrial production of beta-lactam antibiotics. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 6, no5-6, p. 385–92, 2003.

FABER, K., 1997, In: **Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook**, 3 ed., Cap. 1, 2 e 3, Berlin, Germany, Springer-Verlag.

FADNAVIS N.W.; et al. Efficient chemoenzymatic synthesis of (2S, 3S)-3-hydroxyleucine mediated by immobilized penicillin G acylase. **Journal Chemical Society Perkin Trans**, v. 1, p. 3577–8, 1997.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; GUISÁN, J. M. Enzyme reaction engineering: synthesis of antibiotics catalysed by stabilised penicillin G acylase in the presence of organic cosolvents. **Enzyme Microbial Technology**, v. 13, p. 898–905, 1991.

FERNANDEZ-LAFUENTE R, et al. Preparation of activated supports containing low pK amino groups. A new tool for protein immobilization via the carboxyl coupling method. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 15, p. 546-550, 1993.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROSELL, C. M.; GUISÁN, J. M. Dynamic reaction design of enzymic biotransformations in organic media: equilibrium-controlled synthesis of antibiotics by penicillin G acylase. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 24, p. 139–143, 1996.

FONSECA L. P.; CABRAL J. M. S. Optimization of a pseudo-affinity process for penicillin acylase purification. **Bioprocess Engineering**, v.20, p 513–524, 1999.

FONSECA L. P.; PATRICIA I. M.; CABRAL J. M. S. Preliminary studies on continuous recovery and purification of the penicillin acylase under pseudo-affinity conditions using phenyl-Sepharose gel. **Journal Molecular Recognition**,v. 11, n. 252–254, 1998.

FITTON, V.; et al. Penicillin acylase purification with the aid of pseudo-affinity chromatography, **Journal Biochemistry Biophysics Methods**, n. 49, p. 553–560, 2001.

FLEMING, A. On the antibacterial action of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 10, p. 226–236, 1929.

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

GECIOVA, J.; BURY, D.; JELEN, P. Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 541–553, 2002.

GIORDANO, R. C.; RIBEIRO, M. P.; GIORDANO, R. L. C. Kinetics of beta-lactam antibiotics synthesis by penicillin G acylase (PGA) from the viewpoint of the industrial enzymatic reactor optimization. **Biotechnology Advances**, v. 24, no1, p. 27–41, 2006.

GOGATE, P. R.;KABADI, A. M. A review of applications of cavitation in biochemical engineering/biotechnology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 1, p. 60–72, 2009.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processo de separação com membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 2006

Hand book from Amersham Biocienses. **Ion Exchange Chromatography & Chromatofocusing Principles and Methods**, no 11-0004-21, 2004.

Hand book from GE Healthcare. **Gel Filtration Principles and Methods**, no 18-1022-18, 2002.

Hand book from GE Healthcare. **Protein Purification**, no 18-1132-29, 2001.

HARRISON, R. G. **Bioseparations Science and Engineering**. New York, Oxford, Oxford University Press, p. 32,36,37, 2003.

HARISON, S. T. L. Bacterial cell disruption: a key unit operation in the recovery of intracellular products. **Biotechnology Advances**, v. 9, p. 217–240, 1991.

HUNT P. D.; et al. Expression purification and crystallization of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105. **Protein Engineering**, v.3, p. 635–639, 1990.

KANG, J. H.; HWANG, Y.; YOO, O. J. Expression of penicillin G acylase gene from *Bacillus megaterium* ATCC 14945 in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal of biotechnology**, v. 17,n. 2, p. 99–108, 1991.

KARYEKAR S. K.; HEGDE M. V. Affinity purification of penicillin acylase on phenylacetic acid linked to Indion 48-R: effect of spacer variation. **Biotechnology Techniques**, v.3, p. 145–148, 1989.

KECILI, R.; SAY, R.; YAVUZ, H. Synthesis and characterization of pseudo-affinity ligand for penicillin acylase purification, **International Journal Biology Macromolecules**,v. 39, p. 250–255, 2006

KHEIROLOMOOM, A.; Isolation of penicillin G acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105 by physical and chemical treatments, **Biochemistry Engeneering**, v. 8, p. 223–227, 2001.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA, A. **Purificação de produtos biotecnológicos**, 1° ed.; Manole: Barueri, p. 2-5, 2005.

KLEI, H. E., DAUMY, G. O., KELLY, J. A.: Purification and preliminary crystallographic studies of penicillin G acylase from *Providencia rettgeri*. **Protein Science**, v. 4, p. 433–441, 1995.

KRZESLAK, J.; et al. Heterologous production of *Escherichia coli* penicillin G acylase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**,v. 142, p. 250–258, 2009.

KUTZBACH, C.; RAUENBUSCH, E. Preparation and general properties of crystalline penicillin G acylase from *E. coli* ATCC 11105. **Hoppe-Seyler's Z Physiology Chemistry**, v. 354, p. 45–53, 1974.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LANGEN, V. L. M., et al. Penicillin acylase-catalyzed peptide synthesis: a chemoenzymatic route to stereoisomers of 3,6-diphenylpiperazine-2,5-dione. **Tetrahedron Asym.** v. 11, p. 1077–1083, 2000.

LIMA, A. W. O; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**. v. 22, n. 2, p. 229-245, 1999.

MARTIN, L.; et al. Cloning and sequencing of the pac gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium*. **FEBS Microbiology Letters**, v. 125, p. 287– 292, 1995.

MASSOLINI, G.; et al. Elucidation of the enantioselective recognition mechanism of a penicillin G acylase-based chiral stationary phase towards a series of 2-aryloxy-2-arylacetic acids. **Chirality**, v. 18, p. 644-643, 2006.

MCVEY, C. E.; et al. Crystal structures of penicillin acylase enzyme-substrate complexes: structural insights into the catalytic mechanism. **Journal of molecular biology**, v. 313, n. 1, p. 139–150, 2001.

MENEZES, J. C.; ALVES, T. P.; CARDOSO, J. P.; *Biotecnologia Microbiana: A Produção de Penicilina*, **Biotecnologia: Fundamentos e Aplicações**, cap. 12, p. 15, N. Lima e M. Mota (eds.), DIFEL, 2000, 15 p.

MONTES, T.; et al. Genetic modification of the penicillin G acylase surface to improve its reversible immobilization on ionic exchangers. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 1, p. 312–319, 2007.

MORTON, P.; LYDDIATT, A. Direct integration of protein recovery with productive fermentations, in *Separations for Biotechnology*. **The Royal Society of Chemistry**, v. 3, p. 329–335, 1994.

NAJAFPOUR, G. D. **Biochemical Engineering and Biotechnology**. Chapter 7:Downstream Processing, ISBN: 978-0-444-52845-2, 2007.

NOVELLA, I. S.; FARGUES, C.; GREVILLOT, G. Improvement of extraction of penicillin acylase from *E. coli* cells by a combines use of chemical methods. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 379–82, 1994.

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

OHASHI, H.; et al. Expression of the *Arthrobacter viscosus* penicillin acylase gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Applied Environment Microbiology**, v. 55, p. 351–356, 1989.

OZCENGIZ, G.; DEMAIN, A. L. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 2, p. 287–311, 2013.

ORR, V.; et al. Integrated development of an effective bioprocess for extracellular production of penicillin G acylase in *Escherichia coli* and its subsequent one-step purification. **Journal of biotechnology**, v. 161, n. 1, p. 19–26, 2012. (a)

ORR, V. et al. Simultaneous clarification of *Escherichia coli* culture and purification of extracellularly produced penicillin G acylase using tangential flow filtration and anion-exchange membrane chromatography (TFF-AEMC). **Journal of chromatography B**, v. 900, p. 71–78, 2012.(b)

PARMAR, A.; KUMAR, H.; MARWAHA, S.S.; KENNEDY, J.F. Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA). **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 289–301, 2000.

PINOTTI, L. M. **Produção e Purificação de Penicilina G Acilase**. Tese de doutorado em Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2003.

PINOTTI, L. M.; et al. Study of different media for production of penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 84-86, p. 655–663, 2000.

PINOTTI, L. M.; et al. Inoculum Studies in the Production of Penicillin G Acylase by *Bacillus megaterium* ATCC 14945. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98-100, p. 679-689, 2002.

PINOTTI, L. M.; et al. The production of penicillin G acylase by *B. megaterium* is amino acid consumption dependent. **Biotechnology Bioengineering**, v. 97, p. 346–353, 2007. (a)

PINOTTI, L. M.; et al. Maintenance of penicillin G acylase expression by *B. megaterium*: Preservation methods and activity recovery. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 24, p. 307-313, 2007. (b)

PINOTTI, L. M.; et al. Recovery and partial purification of penicillin G acylase from *E. coli* homogenate and *B. megaterium* culture medium using an expanded bed adsorption column. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, p. 111–118. 2009.

PORPINO, K. K. P. **Bissorção de ferro (II) por casca de caranguejo *Ucides cordatus***, Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil, 2009.

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. Recent Biotechnological Interventions for Developing Improved Penicillin G Acylases. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, No. 1, p. 1–13. 2004.

ROCCHIETTI, S., et al. Influence of the enzyme derivative preparation and substrate structure on the enantioselectivity of penicillin acylase. **Enzyme Microbial Technology**, v. 31, p. 88–93, 2002.

SCHROEN, C. G. P. H.; et al. Thermodynamically controlled synthesis of β -lactam antibiotics. Equilibrium concentrations and side-chain properties. **Enzyme Microbial Technology**, v. 24, p. 498–506, 1999.

SHENTHIVEL, S. G.; PAI, J. S. Purification of penicillin acylase of *Bacillus megaterium*. **Biotechnology Techniques**, v. 10, n. 8, p. 621-614, 1996.

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

SILVA, C. S. **Purificação do ácido clavulânico por processo de filtração tangencial, extração por sistema de duas fases aquosas e re-extração com resina de troca iônica**. Tese de doutorado em Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2010.

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

SILVA, R. G.; et al. Artificial neural networks to infer biomass and product concentration during the production of penicillin g acylase for *Bacillus megaterium*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 83, p. 739-749, 2008.

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

TARDIOLI, P. W.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Characterization of *Thermoanaerobacter* cyclomalto-dextrin glucoamylase immobilized on glyoxyl-agarose. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 1270-1278, 2006.

VÉLEZ, A. M.; et al. Produção em frascos agitados e em batelada alimentada de Penicilina G Acilase (PGA) de *Escherichia coli* Recombinante em meio sintético e complexo. In: **XVIII Simpósio Nacional de Bioprocessos**, Caxias do Sul, 2011

VÉLEZ A. M.; **Produção de penicilina G acilase a partir de *Bacillus megaterium* recombinante**. Tese de doutorado em Engenharia Química, UFSCar, São Carlos, 2013.

VÉLEZ A. M., et al. High-throughput strategies for penicillin G acylase production in *E. coli* fed-batch cultivations. **BMC Biotechnology**, 14:6, 2014.

VERHAERT, R. M. D; et al. Molecular cloning and analysis of the gene encoding the thermostable penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis*. **Applied Environment Microbiology**, 63, p. 3412–3418, 1997.

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

WILSON, C. M. Staining of proteins on gels: comparisons of dyes and procedures. **Methods in Enzymology**, v. 91, p. 236-247, 1983.

WEGMAN, M. A.; et al. Towards biocatalytic synthesis of beta-lactam antibiotics. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 343, n. 6-7, p.559-576, 2001.

YANG, S; et al. Expression and Purification of Extracellular Penicillin G Acylase in *Bacillus subtilis*. **Protein Expression and Purification**, v. 21, p. 60–64, 2001.

YANG, Y. **Production and secretion of recombinant proteins using *Bacillus megaterium***. [s.l.] Technical University of Braunschweig, 2007.