Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ Centro de Ciências da Matemática e da Natureza – CCMN Instituto de Química – IQ Departamento de Bioquímica

Estudo de estratégias de cultivo utilizando *Pichia pastoris* como plataforma de expressão gênica constitutiva e reaproveitamento de biomassa

Julia de Macedo Robert

Rio de Janeiro

2019

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ Centro de Ciências da Matemática e da Natureza – CCMN Instituto de Química – IQ Departamento de Bioquímica

Estudo de estratégias de cultivo utilizando *Pichia pastoris* como plataforma de expressão gênica constitutiva e reaproveitamento de biomassa

Julia de Macedo Robert

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Orientador: Denise Maria Guimarães Freire

Rio de Janeiro

2019

Estudo de estratégias de cultivo utilizando *Pichia pastoris* como plataforma de expressão gênica constitutiva e reaproveitamento de biomassa

Julia de Macedo Robert

Orientador: Denise Maria Guimarães Freire

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Aprovada por:

Prof. Dra. Denise Maria Guimarães Freire

Prof. Dra. Evelin Andrade Manoel

Prof Dra. Maria Alice Zarur Coelho

Prof. Dra. Viridiana Santana Ferreira Leitão

Prof. Dr. Ivaldo Itabaiana Júnior

"Chaos is a ladder." Baelish, Petyr

Agradecimentos

Será difícil fazer jus a todos que me acompanharam, incentivaram e ajudaram ao longo destes quatro anos, espero que todos se sintam representados! Lembro de ter reclamado diversas vezes que os meses demoravam a eternidade para acabar, mas olhando agora para trás, parece que foi ontem que estava fazendo a seleção para ingressar no doutorado e agora estou aqui... escrevendo a última seção da tese.

Gostaria de agradecer primeiramente a minha mãe que está comigo sempre, a postos a todo momento para me ajudar no que precisar, mesmo que ela não entenda muito bem sobre o que estou falando, afinal... pitaco é com ela mesma! HAHAHA. Ao meu pai, madrasta e irmãos que mesmo longe sei que sempre torcem por mim e entendem minha ausência repetidas vezes.

Ao Guilherme e família por ter dado apoio em momentos críticos, sei que torcem por mim, estarei sempre aqui mandando muitos fogos! Muito obrigada!

A Karol, minha melhor amiga, que mesmo não fazendo mais parte do meu diaa-dia é essencial na minha sanidade mental e cada vez que nos encontramos é como se nenhum tempo tivesse passado. Te amo!

Agradeço também a professora Denise Freire, minha orientadora, exemplo de mulher e profissional que guardarei para sempre no coração. Seus posicionamentos, visões e garra somados ao conhecimento e técnica são sensacionais! Não poderia ter escolhido orientadora melhor.

A equipe do LaBiM como um todo, que constituem um ambiente leve, descontraído e acolhedor para se trabalhar. Em especial Fabio, Douglas, Francisco, Rui e Vanessa que estavam diariamente comigo, me ajudando, aconselhando e sofrendo com as faltas de luz, de ar condicionado em janeiro e equipamentos temperamentais HAHAHA.

Ao professor Francisco Valero, meu orientador no tempo que passei na Universidade Autônoma de Barcelona (UAB), que pessoa incrível! Aprendi MUITO sobre planejamento, como unir a engenharia a biologia, fazer relações entre diferentes projetos, focar em objetivos estruturados e também sobre família, como você mesmo gosta de chamar a equipe de trabalho. A toda equipe do departamento de engenharia química biológica e ambiental da UAB que foi super solícito no tempo que estive lá.

A minha nova família, que apesar de todos brasileiros, nos encontramos do outro lado do atlântico! Núbia, Tainã, Fernando e Gabriela, vocês são todos sensacionais e estarão nas minhas lembranças para sempre! Muito obrigada pelo ano que passamos juntos, eu AMO vocês. Não importa quantos anos passem, o sentimento não mudará e perdão pela displicência em manter contato. Todo episódio novo de Masterchef meu coração está com vocês e é isso que importa HAHAHA. Gabi, é muito irônico que tenhamos consolidado nossa amizade tão longe de casa sendo que sempre estivemos a dois andares de distância kkk, obrigada pelo companheirismo, pelas risadas, pelas ideias, eu estou com você sempre! Conta comigo!

Ao Antônio Carlos que, apesar de não estar diretamente envolvido com esta tese, foi meu mentor nessa vida de biorreatores e o ponto de partida de todo o trabalho que foi construído. Nada disso teria acontecido sem você! Obrigada por me empolgar e me fazer crescer tanto como profissional e pessoa!

A equipe do SENAI/CETIQT, em especial a Marcelo, Giulia, Patrick, Lucas, Carlos, Giordano e Felipe, o stress dos últimos meses foi suportável graças a vocês! Obrigada!

A CAPES pela bolsa para realização do estudo.

Estudo de estratégias de cultivo utilizando *Pichia pastoris* como plataforma de expressão gênica constitutiva e reaproveitamento de biomassa

Julia de Macedo Robert

Denise Maria Guimarães Freire

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

As lipases têm características que são de interesse para a biotecnologia pois permitem, por exemplo, substituir rotas químicas por enzimáticas com bons rendimentos e alto grau de pureza no produto obtido. Elas apresentam características seletivas mesmo atuando sobre inúmeros substratos. Dentre as lipases mais utilizadas comercialmente encontra-se a lipase B de *Candida antactica* (CalB), enzima alvo deste trabalho, que possui excelente enancioseletividade sob diversas condições e substratos.

Por outro lado, a inserção de genes de interesse industrial em hospedeiros de simples cultivo permite a expressão heteróloga, como por exemplo, a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* que pode crescer até altas densidades celulares. Esta característica é especialmente importante uma vez que o gene da CalB, foi inserido sob controle de um promotor constitutivo, o P_{PGK}, o que conferiu a produção desta lipase associado ao crescimento de biomassa.

Assim, a estratégia de produção em biorreator para otimizar a produtividade do sistema está intimamente ligada ao promotor, ao modo de condução do bioprocesso, a escolha apropriada do meio de cultivo e ao sistema de aeração utilizado.

No modo contínuo, a produção atingiu 1,89.10⁸ U, número 5,8 vezes maior que o atingido na batelada alimentada considerando 6 semanas de operação. Sendo, portanto, considerado a opção mais vantajosa para operações em maior escala. A influência da salinidade do meio de cultivo foi testada e identificou-se problemas de transporte da lipase para o meio extracelular quanto maior era a força iônica do meio utilizado no cultivo. Por outro lado, a troca do sistema de aeração por borbulhamento para contactor de membrana não foi benéfica para a obtenção da enzima de interesse. Apesar de evitar a formação de espuma, a utilização do sistema de membranas causou diminuição drástica na produtividade, por ter resultado no acúmulo de biomassa e de enzima na membrana.

Finalmente o reaproveitamento da biomassa gerada nos cultivos durante a produção de CalB foi investigada e otimizada objetivando a obtenção de extrato de levedura. O extrato obtido deste cultivo gerou uma concentração de aminoácidos livres (FAN) de 2218 mg N/L e um perfil de aminoácidos compatível com os extratos de levedura disponíveis comercialmente.

Palavras-chave: *Pichia Pastoris*; *Komagataella phaffii*; Lipase B de *Candida antarctica*; Estratégias de bioprocessos; Planejamento experimental; Reaproveitamento de biomassa; Oxigenação não-dispersiva; Promotor constitutivoP_{PGK}.

Strategies cultivation study using *Pichia pastoris* as constitutive gene expression platform and biomass reuse

Julia de Macedo Robert

Denise Maria Guimarães Freire

Abstract da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências – Bioquímica.

Lipases have characteristics that are interesting for biotechnology as it allows replacing chemical with enzymatic routes having better yields with a high degree of purity of the product obtained. They have selective characteristics and still catalyze the reactions of numerous substrates. Among the commercial ones, Lipase B from *Candida antactica* (CalB) is one of the most applied, it has excellent enanciosiletivity and was the target molecule for this work.

On the other hand, heterologous expression allows the insertion of genes with industrial interest into hosts that require simple parameters for cultivation, as, for example, the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. It can achieve high cell densities, a particularly important feature, for this work, since the CalB gene was inserted under the control of a constitutive promoter, P_{PGK}, which causes lipase production to be associated with biomass growth.

Therefore, the production strategy used for bioreactor cultivation is linked to the promoter choice, the cultivation mode, medium and aeration system used.

On continuous mode, production reaches 1.89.10⁸ U, 5.8 times higher than that reached in the fed-batch considering a 6-weeks operation. Therefore, this mode was considered the most advantageous option on a bigger scale. The influence of salinity in the culture medium was tested and was identified a difficulty on lipase secretion when medium had a higher ionic strength. The exchange of

bubbling aeration system for membrane contactor was not beneficial for lipase production. Although foam formation was avoided, it causes a dramatic drop in productivity due to accumulation of biomass and lipase in the membrane.

Finally, the reuse of the biomass generated in cultures, during CalB production, was also studied and optimized in order to obtain yeast extract. This extract had a concentration of 2218mgN/L free amino acids with a profile comparable to yeast extracts sold commercially.

Keywords: *Pichia Pastoris; Komagataella phaffii; Candida antarctica* lipase B; Bioprocess estrategies; Design of experiments; Biomass reuse; Nondispersive oxygenation; Constitutive promoter P_{PGK}.

Sumário

Introdução		1
Capítulo 1		6
1 Funda	imentação teórica	7
1.1	Mercado de enzimas	7
1.2	Lipases	10
1.3	Lipase B de Candida antarctica	13
1.4	Sistemas de expressão heteróloga	15
1.5	Leveduras	
1.6	Pichia pastoris	
1.6.1	Promotores indutivos	
1.6.2	Promotores constitutivos	
1.7	Estratégias de produção	
1.7.1	Batelada	
1.7.2	Batelada alimentada	
1.7.	2.1 Adição contínua	
1.7.	2.2 Adição por Pulsos	
1.7.	2.3 Adição exponencial	33
1.7.3	Continuo	
2 Mater	ais e métodos	
2.1	Micro-organismo	
2.2	Estoque e pré-inóculo	
2.3	Meios de cultivo	
2.4	Modo de Condução do Bioprocesso	
2.4.1	Cultivo em batelada alimentada	
2.4.2	Cultivo em sistema contínuo	
2.5	Métodos analíticos	
2.5.1	Biomassa	39
2.5.2	Nitrogênio em forma de NH4 ⁺	
2.5.3	Atividade lipolítica titulométrica	
2.5.4	Glicerol	
2.6	Equações utilizadas	
2.6.1	Taxas específicas	
2.6.2	Rendimentos	41
2.6.3	Coeficientes de manutenção	41

	2.6.4	Controle open loop	42
3	3 Resultados e Discussão		
	3.1	Cultivo em sistema contínuo	43
	3.2	Cultivo em batelada alimentada limitada por glicerol.	47
	3.3	Comparação entre as estratégias adotadas	53
Сар	ítulo 2		57
1	Funda	mentação teórica	58
	1.1	Temperatura e pH	58
	1.2	Oxigênio dissolvido, agitação e aeração	58
	1.3	Meio de cultivo	59
	1.3.1	Fonte de carbono	59
	1.3.2	Fonte de nitrogênio	60
	1.3.3	Vitaminas	60
	1.3.4	Sais específicos	61
	1.4	Secreção de proteínas recombinantes	62
2	Materia	ais e métodos	64
	2.1	Meios de cultivo	64
	2.1.1	Batelada	64
	2.1.2	Meio para quimiostato	64
	2.1.3	Batelada alimentada	65
	2.2	Métodos de cultivo	65
	2.2.1	Sistema contínuo	65
	2.2.2	Batelada alimentada	65
	2.3	Métodos analíticos	65
	2.3.1	Biomassa, NH4 ⁺ , glicerol e atividade lipolítica	65
	2.3.2	Proteínas totais	65
	2.3.3	Sulfatos e fosfatos	
	2.3.4	Contagem de células	
	2.3.5		
3	Result	ados e Discussão	
Сар	ítulo 3		78
1	Funda	mentação teórica	79
	1.1	Utilizações da levedura residual	79
	1.2	Mercado	81
	1.3	Processo de obtenção do extrato de levedura	82

1.4	Planejamento experimental	84		
2 Mate	riais e métodos	85		
2.1	Micro-organismo	85		
2.2	Autólise 1	86		
2.3	Autólise 2	86		
2.4	Concentrações de biomassa, proteína total e ativ	vidade 86		
2.5	Porcentagem de nitrogênio total	86		
2.6	Concentração de nitrogênio de aminoácidos livre	es (FAN) 87		
2.7	Validação do crescimento celular com extrato pr	oduzido 87		
2.8	Planejamento de experimentos (DOE)	87		
3 Resu	Itados e Discussão	89		
Capítulo 4		100		
1 Fund	amentação teórica	101		
1.1	Oxigenação não-dispersiva	101		
1.2	Tipos de membrana	104		
1.3	Transferência de massa em contactores	106		
2 Mate	riais e métodos	107		
2.1	Micro-organismo	107		
2.2	Método de cultivo	107		
2.2.1	Meio de cultivo	107		
2.2.2	Batelada	108		
2.2.3	Contactor de membrana	108		
2.2	2.3.1 Limpeza	109		
2.3	Método de análise	110		
2.3.1	Concentrações de biomassa, glicerol e atividade	110		
3 Resu	Itados e Discussão	110		
Conclusão g	geral	116		
Trabalhos fu	ituros	118		
Referências		119		
Anexo I				

Lista de Figuras

Figura 1: Market share em importações e exportação dos principais 15 países
em 2018 segundo trademap.org para produto 3507.
Figura 2: Principais campos de utilização de enzimas, em 2012 (FREEDONIA
GROUP, 2014)
Figura 3: Tipos de reações catalisadas por lipase11
Figura 4: Mecanismo de transesterificação da reação catalisada por lipase. A
tríade catalítica está numerada de acordo com a enzima Cal B de Candida
antarctica. (Traduzido de SIMAS e colaboradores (2011)) 12
Figura 5: Estrutura tridimensional da CalB com ênfase nas estruturas
secundárias e a tríade catalítica (azul)14
Figura 6: Microscopia de levedura em brotamento
Figura 7: Fases do crescimento celular sob um substrato
Figura 8: Rota metabólica de consumo de metanol. Adaptado de GELLISSEN
(2000)
Figura 9: Rota metabólica de consumo de glicose e glicerol. Em destaque
verde as enzimas referentes aos promotores constitutivos GAP e PGK, em
laranja o glieraldeido-3-fosfato que é a integração com o metabolismo de
consumo do metanol. Adaptado de ÇALIK e colaboradores (2015) 26
Figura 10: Esquema de correntes em batelada 29
Figura 11: Esquema de correntes em batelada alimentada
Figura 12: Perfil de biomassa e substrato quando há inibição, em cinza etapa
inicial de batelada para crescimento da biomassa
Figura 13: Perfil de biomassa e substrato quando não há inibição, em cinza
etapa inicial de batelada para crescimento da biomassa
Figura 14: Perfil de biomassa e substrato em uma alimentação por pulsos, em
cinza etapa inicial de batelada para crescimento da biomassa
Figura 15: Perfil de biomassa e substrato em uma alimentação exponencial, em
cinza etapa inicial de batelada para crescimento da biomassa
Figura 16: Esquema de correntes em sistema contínuo
Figura 17: Principais parâmetros obtidos em sistema contínuo para crescimento
de P.pastoris produzindo CalB sob promotor PGK a μ =0,05, 0,09 e 0,16 h ⁻¹ .
(A) Rendimento produto por biomassa (Y _{P/X}) e atividade de CalB (B) XIV

Figura 19: Variáveis de processo e taxa específicas medias durante a fase de alimentação para crescimento de P. pastoris produzindo CalB sob promotor PGK a μ =0,14h⁻¹ em glicerol. (A) concentrações de biomassa, glicerol e atividade de CalB, (B) Determinação das taxas específicas médias: e crescimento (μ), de consumo de glicerol (qs) e de produção de CalB (qP). 48 Figura 20: Principais parâmetros do bioprocesso durante a fase de alimentação para crescimento de P. pastoris produzindo CalB sob promotor PGK em glicerol. (A) Rendimento produto por biomassa (YP/x) e atividade de CalB. (B) Rendimento produto por substrato (YP/s) e biomassa por substrato (Yx/s). (C) Taxa específica de consumo (qs) e produção (qP). 50 Figura 21: Influência da taxa específica de crescimento nas produtividades volumétrica e específica para crescimento de P.pastoris produzindo CalB sob

Figura 27: Valores de exportações e importações mundiais do produto 210220 Figura 28: Principais países exportadores do produto 210220, em 2018, Figura 29: Aspecto do extrato de levedura comercial (A) e dos produzidos com a Figura 30: Gráfico de Pareto obtido como resultado do PB12 realizado Figura 31: Gráfico gerado entre os valores da variável de resposta observados experimentalmente e os valores preditos pelo modelo obtido no DCCR 2³..... 96 Figura 34:Esquema de fluxos em um contactor gás/líquido. Adaptado de Figura 35: Vista lateral de membranas com os três tipos de morfologia mais Figura 36: Vista transversal de um contactor de membrana porosa nos dois casos de desequilíbrio de pressão das fases......105 Figura 37: Aparência externa e esquema da parte interna do contactor de membrana SuperPhofic......109 Figura 38: Acompanhamento das concentrações de biomassa, glicerol e atividade ao longo da batelada de P. pastoris utilizando contactor de membrana como método de oxigenação. 111 Figura 39: Porcentagem de oxigênio dissolvido e O2 no meio de cultivo ao longo da batelada de P. pastoris utilizando contactor de membrana como método de oxigenação 112

Lista de Tabelas

Tabela 1: Trabalhos utilizando a lipase B de Candida antarctica de fonte
comercial ou não-comercial como catalisador15
Tabela 2:Comparativo de vantagens e desvantagens inerentes a cada sistema
de expressão apresentado (adaptado de TAMÁS e SHEWRY (2006)) 16
Tabela 3: Promotores indutivos utilizados na transformação de P. pastoris e os
indutores utilizados para produção de diferentes moléculas recombinantes 25
Tabela 4: Promotores constitutivos utilizados na transformação de P. pastoris
para produção de diferentes moléculas recombinantes
Tabela 5: Vantagens e desvantagens do uso de promotores constitutivos e
indutivos para produção de proteínas recombinantes
Tabela 6: Taxas específicas e cinéticas para consumo de substrato e produção
em sistema contínuo
Tabela 7: Sumário dos principais parâmetros do bioprocesso obtidos em
sistema contínuo
Tabela 8: Taxas específicas e cinéticas para consumo de substrato e produção
em batelada alimentada51
Tabela 9: Sumário dos principais parâmetros do bioprocesso obtidos em
batelada alimentada53
Tabela 10: Concentração de sulfatos e fosfatos e condutividade obtidas do
sobrenadante do cultivo em sistema contínuo de P. pastoris a μ =0,10 h ⁻¹ com
os cinco meios de cultivo testado69
Tabela 11: Produtividade, rendimentos e atividade obtidos em sistema continuo
com os cinco meios de cultivo testados a μ =0,11h ⁻¹ 70
Tabela 12: Rendimentos e taxas específicas de produção e crescimento
obtidos com batelada alimentada a μ =0,05h ⁻¹ com os três meios de
alimentação testados
Tabela 13: Concentração de sulfatos e fosfatos e condutividade obtidas do
sobrenadante do cultivo em batelada alimentada de P. pastoris a μ =0,05 h ⁻¹
com alimentação com e sem sal75
Tabela 14:Trabalhos recentes com usos alternativos do extrato de levedura 80

Tabela 15: Matriz de PB12 utilizada para primeiro planejamento experimental visando otimização da metodologia de autólise para produção de extrato de Tabela 16: Matriz de DCCR 2³ utilizada para segundo planejamento experimental visando otimização da metodologia de autólise para produção de Tabela 17: Concentração de FAN presente no extrato de levedura comercial e nos obtidos em cada metodologia de autólise de Pichia pastoris testada....... 90 Tabela 18: Biomassa, concentração de proteínas totais e atividade obtidos, após 30h, pela fermentação de Pichia pastoris utilizando o meio YPD 2% onde Tabela 19:Variáveis de resposta medidas em cada ensaio do PB12 realizado. Tabela 20: Variável de resposta medida em cada ensaio do DCCR 2³ realizado. Tabela 21: Biomassa final obtida para crescimento de Pichia pastoris e Tabela 23: Parâmetros calculados para batelada de Pichia pastoris crescendo em glicerol utilizando contactor de membrana como método de oxigenação. 113 Tabela 24: Atividades e concentração de biomassa obtidos na água de limpeza de cada lavagem sequencial feita no contactor de membrana após a batelada.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

- µ taxa específica de crescimento
- AOX álcool desidrogenase
- ATP adenosina trifosfato
- CalB lipase B de Candida antarctica
- D taxa de diluição
- DCCR delineamento composto central rotacional
- DCW dry cell weight (peso seco)
- DHAS di-hidroxicetona sintase
- DO dissolved oxygen (oxigênio dissolvido)
- DOE planejamento de experimento (design of experiments)
- EC enzyme comission (comissão de enzimas)
- ER endoplasmatic reticulum (retículo endoplasmático)

EURASYP - european association for specialty yeast products (Associação europeia de produtos de levedura)

- EVTE estudo de viabilidade técnico-econômica
- F vazão de alimentação
- FAN free amino nitrogen (nitrogênio de aminoácidos livres)
- FDA food and drug administration (Administração de alimentos e drogas)
- FLD formaldeído desidrogenase
- GAPDH gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase
- GRAS generally regarded as safe (geralmente reconhecido como seguro)
- ICL isocitrato liase
- KLa coeficiente volumétrico de transferência de massa

- m coeficiente de manutenção celular
- mp coeficiente de manutenção para cinética de produção
- ms coeficiente de manutenção para consumo de substrato
- OD optical density (densidade ótica)
- OGM organismo geneticamente modificado
- OUR taxa de consumo de oxigênio
- P produto
- p/v peso/volume
- PB plackett & burman
- PBS phosphate buffer saline (tampão fosfato salino)
- PEX8 proteina de membrana do peroxissomo
- PGK fosfoglicerato kinase
- PMSF phenylmethilsulfonil fluoride (fluoreto de fenilmetilsulfonil)
- PVDF difluoreto de polivinilideno
- Qe produtividade específica
- Q_P produtividade volumétrica
- qP Taxa específica de produção
- qs taxa específica de consumo de substrato
- Qs taxa volumétrica de consumo de substrato
- S substrato
- STR stirred tank reators (reatores de tanque agitado)
- t_d tempo de duplicação
- Vvm volume de ar por volume de meio por minuto
- X biomassa

- YE_{Labim} extrato de levedura *home-made*
- $Y_{\text{p/s}} \text{rendimento} \text{ de produto por substrato}$
- Y_{p/x} rendimento de produto por biomassa
- Ys/x rendimento intrínseco de substrato por biomassa
- Y_{x/s} rendimento de biomassa por substrato
- α -MF alpha-mating fator
- τ tempo de residência

Introdução

A comercialização de enzimas é um mercado bilionário e, para o Brasil, representa a movimentação de 161,5 bilhões de dólares em importações. Mundialmente entre 2014 e 2018 houve crescimento de 2% ao ano e a expectativa é que a tendência seja mantida no futuro próximo, segundo Trademap.org considerando o produto 3507. Especificamente, as lipases representavam 5% do *market share* em 2014 (FREEDONIA GROUP, 2014).

As lipases são hidrolases que agem na parte carboxílica de triacilgliceróis e são consideradas enzimas versáteis por catalisar diversas reações (hidrólise, transesterificação, esterificação, alcoólise, acidólise e aminólise), além de serem químio, régio e enantioseletivas (JOSEPH et al., 2008). Estas características são propriedades de interesse para a biotecnologia pois permitem, por exemplo, substituir parcial ou totalmente rotas químicas por enzimáticas mantendo bons rendimentos com alto grau de pureza do produto.

Dentre os diversos micro-organismos produtores de lipases os fungos filamentosos são reconhecidos como os melhores produtores das mesmas. Porém, fungos leveduriformes como *Candida sp., Saccharomyces sp., Saccharomycopsis sp.* e *Yarrowia sp* também as produzem (ALMEIDA, 2009). A lipase B de *Candida antarctica* (CalB) foi escolhida como modelo neste trabalho por ter uma ampla gama de utilizações, indo desde a síntese orgânica até catálise em meios aquosos, mantendo alta atividade e estabilidade. Outra característica de interesse é atuar frente a diferentes substratos (ANDERSON et al., 1998), o que a torna excelente primeira opção de catalizador numa aplicação quando o processo ainda não está bem estabelecido.

A produção desta lipase no micro-organismo selvagem, a levedura *Candida antarctica*, é dificultada devido a condições específicas para produção e secreção da mesma, além de apresentar produtividade inferior e ter a expressão fortemente regulada. Neste contexto, a expressão heteróloga surge como alternativa para superar estas desvantagens. Sistemas heterólogos de expressão em bactérias e leveduras são normalmente utilizados devido sua flexibilidade para manipulação genética e expressão de diversas proteínas de interesse (WELCH et al., 2009).

Neste trabalho, optou-se por trabalhar com o sistema que utiliza levedura como hospedeiro heterólogo pois, por serem micro-organismo eucariotos, permitem modificações pós-traducionais na proteína como a formação de ligações dissulfeto, N- e O- glicosilações e maturação proteolítica, que serão necessárias para o correto funcionamento de diversas proteínas e, em especial, da lipase B de *Candida antartica*. A levedura metilotrófica *Pichia pastoris* (recentemente reclassificada como *Komagataella phaffii*) foi escolhida então como hospedeiro por ser de fácil cultivo – crescendo em meios definidos salinos – ter preferência pelo metabolismo aeróbio, baixo nível de proteínas secretadas pela cepa selvagem – o que facilita os processos de *downstream* – e, principalmente, por crescer até altas densidades celulares (CEREGHINO et al., 2002; CREGG et al., 2000).

Esta última característica é especialmente importante pois o gene da CalB, nesta tese, foi inserido sob controle de um promotor constitutivo, o P_{PGK}, conferindo a produção da enzima de interesse associado ao crescimento do micro-organismo.

O promotor associado ao gene é o que determina a condição sob a qual o gene será transcrito. A *P.pastoris* é especialmente utilizada por seus fortes promotores relacionados a assimilação de metanol como fonte de carbono, o P_{AOX}. Este é um promotor indutivo, pois só ativa a transcrição dos genes sob seu controle em presença de metanol no meio de cultivo. No entanto, este é um ponto crítico uma vez que, concentrações maiores que 3 g/L, são tóxicas à célula e o estoque e utilização deste álcool representam um perigo ao operador do cultivo (CEREGHINO et al., 2002).

Apesar da maioria dos estudos na literatura utilizar este tipo de promotor, um outro tipo, o constitutivo, também é uma alternativa. O mais popular destes é o P_{GAP}, originalmente associado a enzima gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase, expresso ao longo da via glicolítica, durante o crescimento celular. O P_{PGK} participa da mesma via, porém ligado a outra enzima, a fosfoglicerato kinase

2

(ZHANG et al., 2009). As produtividades relacionadas a estes promotores geralmente são inferiores as obtidas com os cultivos indutivos, porém, com otimizações do processo e as vantagens operacionais dos promotores constitutivos, estes representam uma alternativa interessante para cultivos em maior escala.

A estratégia de produção em biorreator pode ser tão complexa ou simples quanto for necessário ao processo. Ela está intimamente ligada a escolha do promotor que será associado ao gene, já que é este que indicará a fase metabólica em que será produzida a substância alvo. Como já mencionado anteriormente, o estudo caso-a-caso é indicado para que se obtenha o sistema mais adequado. Neste trabalho serão explorados prioritariamente a batelada alimentada exponencialmente e o sistema contínuo, todavia, outros métodos já foram estudados para esse sistema em trabalhos anteriores (ROBERT et al., 2016).

Uma nova abordagem no sistema de oxigenação também foi estudada para viabilizar estudos em hipóxia e a não formação de espuma durante o cultivo. Sendo este último importante pois evita a necessidade de adição de antiespumante, componente que pode dificultar a etapa de *downstream* e prejudicar a pureza final do produto. Visando aliar essas duas vantagens, o uso de um contactor de membrana para realizar a oxigenação não-dispersiva do meio durante o crescimento celular mostra-se uma boa alternativa. Esta também é uma técnica versátil, pois pode ser adaptada de acordo com o processo, uma vez que o material de que a membrana é composta afeta diretamente o resultado da difusão do oxigênio por ela, além de poderem ser utilizadas membranas em conformação de fibra-oca o que aumenta significativamente a área superficial de troca gasosa (GABELMAN; HWANG, 1999).

Além do sistema de cultivo escolhido, o meio também pode ter forte influência na produtividade de um bioprocesso. Fatores como stress celular, desequilíbrio redox no metabolismo e dificuldade no transporte para meio extracelular (quando a substância de interesse é secretada) podem ser ajustados e otimizados com adição ou readequação de componentes do meio de cultivo. Ademais, conhecer as necessidades nutricionais de cada cepa e as faixas que podem ser inibitórias de cada componente do meio são informações importantes para a otimização do cultivo (ANANE et al., 2016; ISIDRO et al., 2016).

Por outro lado, quando o objetivo de um bioprocesso é chegar à escala industrial, a preocupação com os resíduos gerados durante o processo deve ser outro ponto a ser estudado. O principal resíduo, no caso da produção de CalB por *Picha pastoris,* é a elevada massa celular gerada (cultivo em elevadas densidades celulares), e que não é aproveitada diretamente.

O resíduo sólido de células gerado é muito rico em proteínas e aminoácidos essenciais e, por isso, é interessante que esses nutrientes sejam reutilizados (DAWOOD et al., 2013). Os quatro destinos mais comuns para este tipo de resíduo são: queima, uso para crescimento de micro-organismo, ração animal e, ultimamente, flavorizante para alimentação humana. Neste caso, o cultivo proveniente de um micro-organismo geneticamente modificado (OGM) não é permitido nos dois últimos destinos citados. Devido a isso, a transformação desta biomassa em extrato de levedura é interessante, já que pode servir como insumo para o próprio processo que o gera, além de poder ser comercializado como coproduto.

Diante do exposto acima, esta tese teve como objetivo geral avaliar diferentes estratégias operacionais para o cultivo de *Pichia pastoris* e relacionar estas estratégias à produção de lipase B de *Candida antarctica* (CalB) recombinante. Além disso, estudou-se o reaproveitamento da biomassa gerada no processo e a utilização de um contactor de membrana para oxigenação não-dispersiva do cultivo. A estrutura da tese foi dividida em quatro capítulos para melhor compreensão dos temas estudados, cada capítulo contém a revisão bibliográfica, material e métodos e resultados e discussão referentes aos assuntos pertinentes a ela.

O primeiro capítulo, intitulado "Estudo de estratégias de produção com *Pichia pastoris*", contempla a comparação entre rendimentos e taxas obtidos em sistema contínuo e batelada alimentada exponencialmente, utilizando meios de

cultivo padrões da literatura, com o objetivo de escolher o meio de produção mais interessante para um tempo de processo estendido.

O segundo capítulo, intitulado "Influência da concentração salina na produção de lipase", são discutidos os possíveis efeitos da pressão osmótica na produção da lipase e em sua secreção para o meio extracelular. Diferentes meios de cultivo foram testados em sistema contínuo e em batelada alimentada. A atividade intracelular foi verificada, no último caso, para identificar possíveis problemas de secreção da proteína relacionado a salinidade do meio.

O terceiro capítulo, intitulado "Reaproveitamento de biomassa", explora os possíveis destinos da biomassa gerada durante a produção de CalB, a fim de agregar valor a este resíduo. O extrato de levedura surge como alternativa para utilizar um organismo geneticamente modificado (OGM) e ainda ser aproveitado no próprio circuito de produção, fechando assim um ciclo sustentável.

O quarto e último capítulo, intitulado "Uso de oxigenação não-dispersiva para produção de CalB recombinante", mostra os resultados obtidos, em sistema de batelada, alterando-se a clássica aeração por borbulhamento por uma nãodispersiva, utilizando contactor de membrana. Este sistema visa ser uma estratégia para estudos específicos em baixas concentrações de oxigenação e evitar a formação de espuma no cultivo. Os rendimentos e taxas são comparados aos obtidos nos capítulos anteriores e alterações no sistema são propostas para que esta tecnologia seja viável para implementação futura.

No anexo I se encontram as produções científicas derivadas desta tese em ordem cronológica de publicação.

5

Capítulo 1

Estudo de estratégias de produção com Pichia pastoris

Publicado na Biochemical Engineering Journal como "Continuous operation, a realistic alternative to fed-batch fermentation for the production of recombinant lipase B from <u>Candida antarctica</u> under the constitutive promoter PGK in <u>Pichia</u> <u>pastoris</u>"

1 Fundamentação teórica

A determinação da melhor estratégia de produção para um bioprocesso dificilmente pode ser generalizada, uma vez que envolve questões metabólicas e inibitórias inerentes ao micro-organismo utilizado e a biomolécula alvo do estudo. Tendo isto em vista, é altamente indicado que o sistema de expressão e as vias metabólicas referentes a molécula-alvo sejam bem conhecidas, no entanto, devido a imensa diversidade existente na natureza, seria complicado estudar e compreender completamente as vias de produção de cada nova biomolécula prospectada. Atualmente, graças as técnicas de biologia molecular e sintética, é possível encurtar esse tempo de estudo clonando genes de interesse em micro-organismo modelo já bem conhecidos e fáceis de cultivar para a produção de moléculas recombinantes. Neste âmbito é possível inclusive otimizar as vias biológicas alcançando produções ainda maiores que as naturalmente obtidas.

1.1 Mercado de enzimas

A utilização industrial de enzimas vem apresentando um crescimento considerável nos últimos anos devido às suas características bioquímicas que as tornam biocataliadores muito eficientes para uso tecnológico. Elas podem apresentar características muito interessantes como a especificidade quimio, régio e enanciomérica, que permitem que as reações químicas corram com a formação de menos subprodutos (BERG et al., 2002). De um ponto de vista tecnológico, estas características são úteis pois muitas vezes os subprodutos gerados podem dificultar a purificação do produto de interesse ou ainda possuir natureza tóxica. Assim, a especificidade enzimática permite maximizar a conversão do substrato e ainda torna o processo de purificação mais simples e menos custoso.

Esta importância e vasta utilização industrial se traduzem em países como o Brasil num elevado volume de importação das mesmas. Segundo dados do Trademap.org (considerando o produto 3507 que inclui enzimas e preparados enzimáticos) as enzimas representaram para o Brasil, em 2018, um gasto de 161,5 bilhões de dólares em importações sendo ao total 18,601 toneladas adquiridas. Por outro lado, o crescimento anual do mercado mundial de enzimas entre 2014 e 2018 foi de 2% com previsão de manutenção deste crescimento para os próximos anos. Neste mercado bilionário o Brasil ocupa a oitava posição em termos de importação e a décima sexta em exportação, o *market share* para importações e exportações dos 15 países principais neste mercado é mostrado na Figura 1.



Figura 1: Market share em importações e exportação dos principais 15 países em 2018 segundo trademap.org para produto 3507.

A diferença no posicionamento do Brasil entre importações e exportação revela um atraso tecnológico e estratégico em termos de produção de biocatalisadores, uma vez que grande parte da demanda enzimática é importada. Esse quadro já é identificado desde 2006, quando houve esforços para uma Política de Desenvolvimento da Biotecnologia (PDB) que incluía a produção e o uso industrial de enzimas no Brasil. Em 8 de fevereiro de 2007 foi instituído o Decreto nº 6.041 para tentar reverter essa situação, aliando o setor privado às universidades. No entanto, como pode ser visto pela Figura 1, não houve mudanças significativas. A transferência de tecnologia para as empresas é de fundamental importância para a geração de conhecimento de novos processos e é o gargalo para que essa balança comercial seja invertida.

A Holanda se destaca no setor de exportação superando o segundo colocado, os Estados Unidos, pelo dobro. Este país foi o berço de três grandes empresas ligadas ao desenvolvimento e pesquisa em biotecnologia, com foco em enzimas, são elas Dyadic International, Inc.; DSM e Gecco. Esta última é uma coleção de enzimas e cofatores, alocada dentro da Universidade de Groningen, que vende principalmente serviços de pesquisa e desenvolvimento na área e, portanto, não aparece como grande vendedor, mas influencia diretamente o reconhecimento do país como referência na área.

Até o ano de 2012, 71% do mercado era concentrado em enzimas de uso industrial, como por exemplo, destinadas para a indústria alimentícia, de bebidas, detergentes e ração animal. No entanto, o crescimento previsto para os próximos anos será destinado ao grupo de enzimas ditas especiais, que abrangem as áreas de pesquisa, diagnóstico e biotecnologia. A Figura 2 mostra a distribuição de utilização das enzimas, no ano de 2012, segundo estudos do Grupo Freedonia (2014).

5% 8% 26% 8% Alimentos e bebidas Produtos de limpeza Pesquisa e biotecnologia Produção de biocombustível 9% Outros usos industriais Ração animal Diagnóstico Outras enzimas especiais 10% 18% 16%

Campo de utilização de enzimas

Figura 2: Principais campos de utilização de enzimas, em 2012 (FREEDONIA GROUP, 2014).

Ao todo, nove empresas dominam o mercado de enzimas, suas porções de mercado juntas representam mais de 60% do total, são elas: AB Enzymes; Advanced Enzyme Technologies Limited; Biocatalysts LTD.; Buckman Laboratories INC.; DuPont; DSM; Enzyme Solutions PTY. LTD.; Novozymes A/S e Specialty Enzymes & Biotechnologies CO (BCC RESEARCH, 2014).

As enzimas mais comercializadas neste mercado são carboidrases, proteases, polimerases, nucleases, fitases e lipases. Sendo que esta última responsável por 5% do mercado em 2014 (FREEDONIA GROUP, 2014).

1.2 Lipases

As lipases são uma classe de enzimas muito versáteis, oficialmente denominadas como EC 3.1.1.3 pela Comissão de Enzimas (*Enzyme Comission* – EC). Elas são hidrolases que agem em ligações éster, mais especificamente na parte carboxílica de triacilglicerois. Devido a sua enorme versatilidade as lipases possuem a capacidade de catalisar diversas reações como hidrólise, transesterificação, esterificação, alcoólise, acidólise e aminólise, como representado na Figura 3 (JOSEPH et al., 2008).

Hidrólise

$$R_1 \xrightarrow{R_2} H_2 \longrightarrow R_1 \xrightarrow{OH} R_2 \xrightarrow{OH} R_2 \xrightarrow{OH}$$

Transesterificação



Esterificação



Alcoólise



Acidólise



Aminólise



Figura 3: Tipos de reações catalisadas por lipase

Em geral, a reação de hidrólise ocorre na presença de água, e as reações de síntese, na ausência ou quase ausência da mesma. O mecanismo de atuação da lipase aceito para essa classe foi descrito por SIMAS e colaboradores (2011) e está representada na Figura 4.



Figura 4: Mecanismo de transesterificação da reação catalisada por lipase. A tríade catalítica está numerada de acordo com a enzima Cal B de Candida antarctica. (Traduzido de SIMAS e colaboradores (2011))

As etapas que seguem na reação de transesterificação são: 1) Ataque nucleofílico ao átomo de carbono suscetível da ligação éster do substrato pelo grupamento hidroxila da serina; 2) Estabilização do intermediário tetraédrico formado por ligações de hidrogênio com os grupamentos NH do esqueleto peptídico; 3) Formação do intermediário covalente enzima "acilada"; 4) Ataque nucleofílico ao carbono suscetível do intermediário acil enzima; 5) Retorno da ligação C=O, rompimento do segundo intermediário tetraédrico e liberação do ácido carboxílico e da enzima livre.

Embora as lipases sejam produzidas também por eucariotos superiores (plantas e animais), as mais utilizadas são as de origem microbiana. Estas são muito apreciadas por suas características peculiares como atividade e estabilidade em solventes orgânicos e em condições extremas de pH e temperatura, seletividade pelo substrato, régio- e/ou enantiosseletividade. As propriedades destas enzimas variam de acordo com sua procedência e os micro-organismos que podem produzi-las são arqueobactérias, bactérias, actinomicetos e fungos (MESSIAS et al., 2011). Dentre os fungos, alguns

gêneros leveduriformes são capazes de sintetizar lipases, como: *Candida sp., Saccharomyces sp., Saccharomycopsis sp.* e *Yarrowia sp.* (ALMEIDA, 2009). Entretanto, os melhores produtores destas enzimas são os fungos filamentosos (CARDENAS et al., 2001). Dentre as diversas lipases uma particularmente interessante, que será o foco de estudo desta tese, e será descrita em maiores detalhes é a lipase B de *Candida antarctica* (CalB)

1.3 Lipase B de Candida antarctica

A CalB é naturalmente produzida pela levedura extremófila *Candida antarctica*, que coloniza diversos ambientes desde solos de lagos da Antárctica, cultivo de arroz no Japão, frutas tropicais no Brasil, flores de *Albizia julibrissin* de Taiwan até grama nos Estados Unidos (BOEKHOUT, 2011). Esta enzima é amplamente utilizada em síntese orgânica pois apresenta alta atividade e estabilidade tanto em meios aquosos e não-aquosos, além de sua especificidade ser variável frente a diferentes substratos (ANDERSON et al., 1998). Ela foi caracterizada estruturalmente pela primeira vez por UPPENBERG e colaboradores em 1995, é composta por 317 aminoácidos e tem uma massa molar média de 33kDa. Foi descrito também o típico dobramento α/β hidrolase e a tríade catalítica envolvida em sua atividade: Serina-Asparagina-Histidina. Esta estrutura do sítio ativo garante excelente enancioseletividade (GOTOR-FERNÁNDEZ et al., 2006).

Diferente da maioria das lipases, a estrutura cristalográfica da CalB parece ter uma conformação aberta, com o sítio ativo acessível. Ela não possui um domínio que age como uma tampa típica mas possui uma hélice curta com alta mobilidade que pode atuar como tampa (SALIS et al., 2003). No entanto, a presença desta estrutura não está necessariamente correlacionada com a ativação interfacial, já que este fenômeno não é observado para CalB nem para lipases de *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia glumae* que também possuem a estrutura e não exibem ativação interfacial (MARTINELLE et al., 1995; PIETRO; PIETRO, 2004; SALIS et al., 2003).

Suas principais propriedades e características bioquímicas são: ponto isoelétrico 6,0; pH ótimo 7,0; estabilidade a pHs básicos; regioespecificidade

contra triacilglicerol em sn-3 (KIRK; CHRISTENSEN, 2002). A Figura 5 apresenta a estrutura tridimensional da CalB.



Figura 5: Estrutura tridimensional da CalB com ênfase nas estruturas secundárias e a tríade catalítica (azul).

A lipase B de *Candida antarctica,* para ser produzida pela levedura que originalmente a contem, demanda baixa temperatura (17°C), longos tempos de cultivo (5 dias) e substratos específicos (ácidos graxos) para sua produção (BOEKHOUT, 2011). Mesmo sob condições específicas são obtidos baixos rendimentos e, a fim de contornar estas desvantagens, grandes empresas produtoras de enzimas desenvolveram a produção das mesmas em hospedeiros heterólogos. A principal responsável pela comercialização de CalB é a Novozymes. Ela é vendida em sua forma livre ou imobilizada (Novozymes-435) e, em ambos os casos, é produzida de maneira recombinante usando como plataforma de expressão o fungo *Aspergillus oryzae*.

A Tabela 1 a seguir compila trabalhos relevantes utilizando a Lipase B de *Candida antarctica*, seja em sua forma comercial (vendida na forma solúvel como CalB ou Novozymes-435) ou não-comercial obtidas em trabalhos da literatura com hospedeiros heterólogos distintos.

Tabela 1: Trabalhos utilizando a lipase B de *Candida antarctica* de fonte comercial ou não-comercial como catalisador.

Tipo de Lipase B	Micro-organismo	Produto gerado	Referência
Comercial e	Asperaillus niger	Ésteres etílicos de	(PEREIRA
não-comercial	Asperginus niger	ácidos graxos de soja e	CIPOLATTI et al.,
		dendê	2018)
	Pichia pastoris	Isopropil palmitato	(QUADROS
Não-comercial			BARSÉ et al.,
			2019)
Comercial e	Aspergillus niger e Pichia pastoris	Butirato metilico	(RIOS et al.,
não-comercial			2016)
Comorcial o	Acporaillus pigor	Resolução racemica de	(MANOEL et al.,
	Aspergilius niger	derivados de myo-	
nao-comerciai	nao-comercial <i>e Pichia pastoris</i> inuitol		2016)
Não-comercial	Pichia pastoris	Esteres flavorizantes	(JIN et al., 2012)
Comorcial	Aspergillus oryzae	Ácido polilático	(IDRIS;
Comercial			BUKHARI, 2012)
Comoraiol	A	Biodiesel	(TAHER et al.,
Comercial	Aspergilius oryzae		2014)
Comorcial	Éster fenólico de áci		(ROBY et al.,
Contercial	Aspergilius oryzae	docosahexaenoico	2015)
Comercial	Aspergillus oryzae	Éster de frutose	(LI et al., 2015)
Comoroial		Éster etilico (S)-γ-	(TRUPPO et al.,
Comercial	Aspergillus oryzae	fluoroleucina	2008)
Não comorcial	Fach ariain cali	Diadiaaal	(YAN et al.,
Nao-comerciai	Eschericia coli	Biodiesei	2012)
Comorcial	Achoraillus oruzao	Dutan 2 al	(CHAPUT et al.,
Comercial	Aspergilius oryzae	Butan-2-01	2012)
	Aspergillus oryzae	Acetato isoamyl	(EISENMENGER;
Comorcial			REYES-DE-
comercial			CORCUERA,
			2010)
Comorcial	Compreial Accorreillus pruzes Piediosal		(SÉVERAC et al.,
Comercial	Aspergillus oryzae	Bioulesei	2011)

1.4 Sistemas de expressão heteróloga

Uma das ferramentas mais poderosas disponíveis hoje em dia é a biologia molecular, com ela é possível manipular o genoma de uma célula e gerar um mutante com a capacidade de produzir uma substância que não faz parte de seu repertório natural, a isto chamamos de produção heteróloga recombinante. Este tipo de manipulação faz-se vantajosa principalmente quando a molécula de interesse é expressa em baixa concentração pelo hospedeiro natural ou então quando o cultivo do mesmo apresenta dificuldades como por exemplo,
meios de cultivo complexos, dependentes de cofatores ou ainda condições extremas ambientais necessárias – altas temperaturas e pH. Para a expressão heteróloga de proteínas são bastante estudados sistemas bacterianos (por exemplo, *Escherichia coli*) e leveduras (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) que oferecem flexibilidade para manipulação genética e expressão de diversas proteínas (WELCH et al., 2009).

O primeiro produto recombinante aprovado para consumo humano pelo FDA (*Food and Drug Administration*) foi a insulina, ao final da década de 1970, utilizando *E.coli* como sistema de expressão. Ainda na mesma época foram sintetizados hormônios de crescimento com finalidade terapêutica (GOEDDEL et al., 1979).

O sistema de expressão ideal varia com o objetivo final e deve ser escolhido caso-a-caso. No entanto, algumas características a serem levadas em consideração são: 1) o sistema tem a capacidade de produzir a proteína de interesse, ou seja, há necessidade de modificações pós-traducionais, glicosilações etc.?; 2) o micro-organismo hospedeiro é de fácil obtenção e manipulação genética?; 3) o processo de purificação será facilitado, com, por exemplo, endereçamento da proteína ao meio extracelular?; 4) apresenta perfil de cultivo que atende as condições industriais e alto rendimento? (HUNT, 2005). A Tabela 2 abaixo sumariza as vantagens e desvantagens dos principais sistemas de expressão estudados.

	Bactéria	Levedura		
	Escherichia coli	Saccharomyces cerevisiae	Pichia pastoris	
Vantagens	Barata, rápida e fácil de usar	Capacidade de glicosilação e proteólise	Capacidade de glicosilação e proteólise	
	Grande gama de vetores e diferentes cepas disponíveis	Possui capacidade de enovelamento e processamento de proteínas no retículo endoplasmático	Possui capacidade de enovelamento e processamento de proteínas no retículo endoplasmático	
	Alto rendimento	Enovelamento da proteína pode ser	Fácil manipulação genética	

Tabela 2: Comparativo de vantagens e desvantagens inerentes a cada sistema de expressão apresentado (adaptado de TAMÁS e SHEWRY (2006)).

		perfeito	
			Boa capacidade secretória
			Alto rendimento
			Capacidade de crescer a alta densidade celular
			Várias cepas e vetores disponíveis
			Integração de vetores em lugares específicos do genoma estável tanto para uma cópia do gene como para múltiplas cópias
			Baixo risco de contaminação
Desvantagens	Promotores não são completamente regulados sob condições não indutivas	Rendimento baixo e de crescimento lento	Acúmulo de metanol afeta o crescimento e o nível de expressão quando a produção é induzida
	Proteína precipita em corpos de inclusão	Padrão de glicosilação e proteólise bastante diferente da humana	Padrão de glicosilação e proteólise bastante diferente da humana
	Ligações dissulfeto ocorre somente em cepas específicas	Baixa capacidade secretória	
	Não é capaz de fazer modificações pós-traducionais		

A bactéria *E. coli*, geralmente é a porta de entrada para o estudo e obtenção de uma nova substância devido ao extenso conhecimento que já se possui nessa plataforma de expressão, a facilidade em sua manipulação, disponibilidade de ferramentas genéticas eficientes e rápido crescimento, o que gera velocidade nas respostas obtidas. Contudo, por ser um procarioto, não possui a habilidade de efetuar modificações pós-traducionais que, muitas vezes, são essenciais ao correto enovelamento e funcionalidade da proteína que está sendo traduzida, além de formar corpos de inclusão com facilidade (que é quando as proteínas produzidas se agregam devido ao enovelamento ineficiente) (SHAPIRO, 2009). As leveduras então são preferidas por serem micro-organismo eucariotos com

sistemas que permitem a formação de ligações dissulfeto, maturação proteolítica, N- e O- glicosilações e as mais diversas modificações póstraducionais, sem perderem a característica de fácil cultivo (uma vez que são unicelulares).

1.5 Leveduras

As leveduras são utilizadas pela humanidade mesmo antes que se soubesse de sua ação nos processos, como por exemplo a fabricação de pão e queijo. Este micro-organismo unicelular, pertencente a classe *Ascomycota*, causa ainda hoje grande impacto nas industrias alimentícia (pão, queijo, iogurte, vinho, cerveja), química (moléculas diversas graças a biologia molecular) e farmacêutica (enzimas, antibióticos, vacinas) influenciando diretamente no desenvolvimento socioeconômico da humanidade (MUSTACCHI et al., 2006).

O potencial deste micro-organismo de produzir proteínas solúveis e realizar modificações pós-traducionais eficientemente, como já mencionado, não são as únicas características que o faz popular. Outras características importantes são: 1) a capacidade de crescer em meios simples e definidos, possibilitando a diminuição do preço do meio de cultivo; 2) rápida propagação de biomassa; 3) boa capacidade de transporte da proteína produzida do meio intracelular para o extracelular, facilitando assim a posterior purificação da molécula de interesse; 4) considerado agente GRAS (geralmente reconhecido como seguro) o que garante ausência de endotoxinas e oncogenes, podendo ser utilizada em produtos alimentícios e farmacêuticos (IDIRIS et al., 2010).

As leveduras são anaeróbias facultativas, o que significa que podem obter energia tanto por fermentação quanto por respiração aeróbia. Em presença de alta concentração de açúcar geralmente o metabolismo fermentativo é preferido, gerando álcool como principal produto, característica que a torna eficiência na produção de pães, queijos, vinhos e cervejas (FERNANDES, 2009). Em ambos os metabolismos, a divisão celular é feita por brotamento (Figura 6) e o crescimento celular da levedura sob uma única fonte de carbono segue o padrão apresentado na Figura 7.



Figura 6: Microscopia de levedura em brotamento.



Figura 7: Fases do crescimento celular sob um substrato.

Nesta curva é possível distinguir as seis fases de crescimento, são elas: A) fase lag, onde a célula está se adaptando metabolicamente a metabolizar a fonte de carbono presente no meio de cultivo, o crescimento nesta etapa é nulo; B) aceleração, o metabolismo está adaptado e começa a divisão celular; C) fase exponencial de crescimento, a divisão celular está em sua velocidade máxima (exponencial); D) desaceleração, a fonte de carbono começa a chegar próximo ao esgotamento e o crescimento de biomassa é freado; E) fase estacionária, a população celular atinge seu máximo; F) morte celular, os nutrientes já estão esgotados e o número de mortes é maior que o de células viáveis.

A fase lag, por não haver crescimento celular e, portanto, considerada "tempo morto" em um processo produtivo é ideal que esta seja o mais curta possível. Para este fim, geralmente é feita a propagação celular em menor volume sob a mesma fonte de carbono que será o cultivo de fato, a isto chama-se pré-inóculo (DUTTA, 2008). Já a fase exponencial é a mais importante a ser estudada. Durante esta fase, o crescimento pode ser descrito como na Equação 1 e o tempo necessário para duplicar a quantidade de biomassa (t_d) como na Equação 2.

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \text{Eq. 1}$$
$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde µ é a taxa específica de crescimento e X a concentração de biomassa presente.

A fase estacionária é atingida quando algum nutriente essencial é esgotado (por exemplo, fonte de carbono ou nitrogênio) ou algum metabólito tóxico se acumula a níveis acima do tolerado pelo micro-organismo (por exemplo, ácido acético para *E.coli*) (BLANCH; CLARK, 1996).

O modelo mais simples que descreve a dependência entre a fonte de carbono e a propagação da biomassa foi sugerido por Jacques Monod em 1950, sua forma é similar a cinética enzimática de Michaelis-Menten pois considera que o transporte de substrato é limitado por permeases, sendo assim, uma dependência da ação enzimática. Sua forma é dada pela Equação 3 considerando o crescimento em fase exponencial.

 $\frac{dX}{dt} = \frac{\mu_{max} * S * X}{K_S + S}$ Eq. 3

Sendo μ_{max} a taxa específica de crescimento máxima atingida e K_s a concentração limitante de substrato que resulta em metade da taxa de crescimento. Indicando que, quando S é muito maior que K_s a taxa específica de crescimento pela qual a célula cresce é a máxima.

Outros aspectos que influenciam no crescimento são a temperatura e o pH. Estes parâmetros devem estar dentro do aceitável para cada micro-organismo. No caso de leveduras, o pH varia entre 4 a 7 e a temperatura de cultivo pode variar entre 20 e 40°C, no entanto, existem cepas extremófilas que conseguem crescer a temperaturas até 70°C (KONGJAN et al., 2009).

Há ainda mais um fator a ser considerado durante a propagação celular, nem toda a energia gerada da metabolização do substrato é direcionada para a divisão celular, na verdade, ela é também direcionada para biossíntese, reparo de DNA e a manutenção de diversos potenciais químicos necessários a sobrevivência da célula. A porção de substrato destinada a estes processos é determinada pelo coeficiente de manutenção celular (m) e pode ser calculada de acordo com a Equação 4.

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{X/S}} + m * X + \sum_j \frac{r_{Pj}}{Y_{Pj/Si}} \qquad \text{Eq. 4}$$

Onde rs é a taxa de consumo de substrato, rx é a taxa de crescimento de biomassa, r_{Pj} é a taxa de formação do produto j, Yx/s é o rendimento de biomassa por substrato e Y_{P/S} é o rendimento de produto j por substrato (BLANCH; CLARK, 1996).

Também podem ser calculados coeficiente de manutenção tanto para o consumo de substrato como para a produção de determinada substância. Dois modelos normalmente utilizados para este fim são: para o cálculo do coeficiente de manutenção de energia para consumo de substrato é o modelo proposto por PIRT (1982); para o cálculo do coeficiente de manutenção para cinética de produção é o modelo proposto por LUEDEKING e PIRET (1959). De acordo com estes modelos é esperado que, a uma alta taxa específica de crescimento o rendimento de substrato por biomassa ($q_S \times \mu$) seja menor que o global calculado para um cultivo. De maneira similar, quando a taxa específica de crescimento aumenta, o rendimento produto por biomassa global ($q_P \times \mu$) diminui. Em particular, para valores baixos de ms uma queda do rendimento de μ . Os equacionamentos de ambos os modelos serão mostrados mais à frente neste trabalho em materiais e métodos.

Atualmente as leveduras mais utilizadas como sistema de expressão são *Sacharomyces cerevisiae* e *Pichia past*oris, no entanto, algumas espécies nãoconvencionais também têm ganhado espaço como por exemplo *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha* e *Yarrowia lipolytica* (YIN et al., 2007). Neste trabalho a plataforma de expressão escolhida foi a *P.pastoris* principalmente por sua capacidade de crescer até altas densidades celulares, motivo que será melhor abordado ao longo desta tese.

1.6 Pichia pastoris

A levedura metilotrófica *Pichia pastoris*, ou *Komagataella phaffii* como foi recentemente reclassificada (KURTZMAN, 2009), é uma plataforma de expressão eucariótica bastante utilizada, como mencionado anteriormente, tanto em processos em pequena escala (laboratoriais) quanto na indústria. Além de todas as vantagens inerentes a utilização de uma levedura a *P. pastoris* ainda tem como característica a capacidade de metabolizar metanol como fonte de carbono, ter preferência pelo metabolismo aeróbio e, se modificada para a expressão de uma proteína secretada, esta será mais facilmente purificada, já que o nível de proteínas secretadas naturalmente no meio é baixo (CEREGHINO et al., 2002; CREGG et al., 2000).

As linhagens de *P. pastoris* utilizadas para manipulação genética são divididas em quatro grupos: as selvagens, os mutantes auxotróficos (deficientes na enzima histidinol desidrogenase), mutantes deficientes na metabolização do metanol e mutantes deficientes em proteases. As principais diferenças entre elas é a velocidade de crescimento e necessidade da adição de substâncias durante o cultivo ou ainda a necessidade de correção da deficiência no vetor utilizado para transformação (JAHIC et al., 2006). A linhagem utilizada nesta tese foi a selvagem X-33 e os detalhes de sua modificação estão descritas na seção de matérias e métodos.

Qualquer que seja a linhagem escolhida para a inserção de um vetor com gene recombinante este deve conter um promotor, que é a região do DNA onde se inicia transcrição. Esta sequência geralmente é regulada pela presença de um componente no meio ou ainda por um estado metabólico. Existem dois principais tipos de promotores, o indutivo e o constitutivo. Neste primeiro, a transcrição do gene será acionada na presença de uma molécula específica que pode, ou não, estar relacionada ao metabolismo de geração de energia e a produção da molécula de interesse não é associada ao crescimento de biomassa. Já no segundo, a molécula necessária para a ativação da transcrição é parte do metabolismo de geração de energia e a produção do composto recombinante será associado a propagação celular (POTVIN et al., 2012). A *P.pastoris* possui fortes promotores de ambos os tipos que serão melhor descritos a seguir.

1.6.1 Promotores indutivos

Os promotores indutivos são os que requerem uma substância indutor para produzir a proteína recombinante de interesse. No caso da *P.pastoris*, os utilizados estão ligados à via metabólica de assimilação do metanol como fonte de carbono. Esta via parece ser consistente entre todos os micro-organismo metilotróficos e envolve a ativação de um grupo específico de enzimas que atuam no interior dos peroxissomos (CEREGHINO et al., 2002). A Figura 8 mostra o esquema metabólico de consumo do metanol e as enzimas necessárias para a mesma.



Figura 8: Rota metabólica de consumo de metanol. Adaptado de GELLISSEN (2000).

A primeira etapa desta via envolve a oxidação do metanol a formaldeído pela enzima álcool desidrogenase (AOX) gerando peróxido de hidrogênio, que é convertido em água e oxigênio por catalases devido a sua alta toxicidade. A parte do formaldeído formado que volta ao citosol é desidrogenado resultando em gás carbônico, enquanto o que permanece no peroxissomos é assimilado para construção de componentes celulares por meio da via cíclica iniciada por sua condensação com a Xilulose 5-monofosfato, reação essa catalisada pela di-hidroxicetona sintase (DHAS).

Além de visualizar o metabolismo de metanol, na Figura 8 também podemos identificar as enzimas que dão origem aos principais promotores indutivos utilizados, são elas: álcool desidrogenase (AOX); formaldeído desidrogenase (FLD); di-hidroxicetona sintase (DHAS). Além desses, outros dois promotores deste tipo também são utilizados, mas não estão ligados diretamente a esta via, são eles: o P_{ICL}, referente a isocitrato liase, que é induzido pela presença de etanol no meio de cultivo; e o P_{ER3}, referente a uma proteína de membrana do peroxissomo que é induzida tanto pelo metanol como pelo ácido oleico.

A Tabela 3 abaixo resume as moléculas produzidas na literatura e os tipos de promotores usado para cada uma delas.

Promotor	Indutor	Molécula produzida	Referência
P _{AOX1}	Metanol	GFP	(KIM et al., 2013)
P _{AOX1}	Metanol	CalB	(YANG et al., 2013)
P _{AOX1}	Metanol	Interleucina humana 10	(ZHONG et al., 2014)
P _{AOX} e P _{DHAS}	Metanol	Operon lac	(TSCHOPP et al., 1987)
P _{AOX1}	Metanol	Módulo de ligação a celulose fusionado com CalB	(JAHIC et al., 2003)
P _{AOX1}	Metanol	Lipase de Rhizopus oryzae	(COS et al., 2006)
P _{DHAS}	Metanol	Crescimento de biomassa	(ELLIS et al., 1985)
P _{FLD1}	Metanol	GFP	(DUAN et al., 2009)
P _{FLD1}	Metilamina	Lipase de Rhizopus oryzae	(RESINA et al., 2005)
P _{ICL}	Etanol	Dextranase de Penicillium minioluteum	(MENENDEZ et al., 2003)
P _{ER3}	Ácido oleico	Luciferase e catalase	(LIU et al., 1995)

Tabela 3: Promotores indutivos utilizados na transformação de P. pastoris e os indutores utilizados para

producão	do	diferentes	moléculas	recombinantes
proauçao	ue	ujerenies	moleculus	recombinanies.

1.6.2 Promotores constitutivos

O uso do metanol como indutor representa um grande risco, principalmente se considerando ampliar a escala de produção, devido a sua toxicidade e capacidade de combustão. Visando suplantar os inconvenientes dos processos que se utilizam desta molécula, promotores de expressão constitutiva vêm sendo bastante explorados como uma boa alternativa. Este tipo de promotor geralmente está associado à via glicolítica e, portanto, ao crescimento celular.

A Figura 9 mostra o esquema metabólico do consumo de glicose e glicerol e as enzimas necessárias para a mesma.



Figura 9: Rota metabólica de consumo de glicose e glicerol. Em destaque verde as enzimas referentes aos promotores constitutivos GAP e PGK, em laranja o glieraldeido-3-fosfato que é a integração com o

metabolismo de consumo do metanol. Adaptado de ÇALIK e colaboradores (2015).

Como pode ser visto, o gliceraldeido 3-fosfato é um componente central da via glicolítica que integra o consumo de açúcares e metanol para o metabolismo aeróbio logo, pode-se esperar que o promotor ligado à sua conversão em 1,3-bisfosfoglicerato seja fortemente regulado. Este promotor é o P_{GAP}, relativo a enzima gliceraldeido-3-fosfato desidrogenase (ZHANG et al., 2009), o mais

utilizado em *P. pastoris*. Há também outros estudados, como o que será abordado nesta tese, o PGK, que é relativo a fosfoglicerato kinase e se encontra na etapa subsequente ao GAP na glicólise. Outros promotores constitutivos não ligados a glicólise são também explorados como o TEF1, que é relativo ao fator 1- α de elongamento da tradução, e o YPT1, relativo a uma GTPase envolvida no sistema de secreção.

É importante salientar que o metanol também poderia ser utilizado como fonte de carbono para crescimento de biomassa e consequente produção de proteína recombinante sob estes promotores. No entanto, a taxa específica de crescimento com metanol é muito baixa, o que deixaria o processo muito longo e ineficiente, portanto não é utilizado.

A Tabela 4 agrupa alguns exemplos de produções recombinantes utilizando promotores constitutivos.

Tabela 4: Promotores constitutivos utilizados na transformação de P. pastoris para produção de diferentes moléculas recombinantes.

Promotor	Molécula produzida	Referência
P _{GAP}	Lipase de Rhizomucor miehei	(HE et al. <i>,</i> 2015)
P_{GAP}	Lipase de Yarrowia lipolytica	(WANG et al., 2012)
P _{GAP}	Antígeno de superfície da hepatite B	(VASSILEVA et al., 2001)
P _{GAP}	Lipase de <i>Candida</i> rugosa	(ZHAO et al., 2008)
P _{GAP}	Fragmento de antígeno de ligação humano	(GARCIA- ORTEGA et al., 2013)
P _{TEF1}	Fator 1-α de elongamento da tradução	(AHN et al. <i>,</i> 2007)
P _{YPT1}	GFP	(SEGEV et al., 1988)
P _{PGK}	CalB	(ROBERT et al., 2016)

P _{YPT1}	β- glucuronidase bacteriana	(SEARS et al., 1998)
Diverses	Albumina	(STADLMAYR
Diversos	humana	et al., 2010)

O tipo de promotor mais indicado a ser utilizado depende então da escala projetada para a produção, do micro-organismo escolhido e, principalmente, do tipo de produção que seja deseja (associado ou não ao crescimento). As vantagens e desvantagem de cada um estão sumarizadas na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5: Vantagens e desvantagens do uso de promotores constitutivos e indutivos para produção de proteínas recombinantes.

	Constitutivo	Indutivo	
	Não utilização de molécula	Maior nível de expressão	
	perigosas (metanol)	reportado	
Vantagens	Produção desde o início do	Controle do momento	
	cultivo	produtivo	
	Cultivo simplificado		
	Menor nível de expressão	Utilização de molécula	
Desvantagens	reportado	perigosas (metanol)	
		Exige técnicas de cultivo	
		mais complexas	

1.7 Estratégias de produção

A melhor estratégia de cultivo precisa ser estudada caso-a-caso, uma vez que a cinética de produção da substância de interesse pode ser influenciada por diversos fatores, como: 1) necessidade e disponibilidade de co-fatores; 2) existência de regulação tanto para início como para nível de expressão da molécula; 3) inibição pela concentração de componentes no mosto. No entanto, conhecer o fundamento dos principais modos de operação é essencial para o design eficiente dos experimentos que serão estudados. A fim de aproximar as considerações que serão feitas a seguir sobre estratégias de produção à escala de bancada, só será abordado o reator do tipo tanque agitado (STR), onde se considera uma mistura ideal dos componentes do meio, ou seja, em qualquer ponto do reator as concentrações serão as mesmas.

1.7.1 Batelada

O primeiro modo de operação, e mais simples, é a batelada. Neste caso, o sistema é fechado e não é considerada nenhuma entrada de nutrientes ao longo do processo, com exceção da aeração, que é permitida em todos os sistemas. O esquema desta estratégia é mostrado na Figura 10.



Figura 10: Esquema de correntes em batelada.

O balanço de massa neste caso pode ser escrito para somente um componente de interesse, sendo a Equação 5 a forma geral desta consideração:

$$\frac{dc_i V}{dt} = V * r(c_i, c_j) \quad \text{Eq. 5}$$

Onde V é o volume do reator, c_i é a concentração do componente i, c_j é a concentração de outro componente j que pode influenciar na taxa de formação ou consumo de i, r(c_i,c_j) é a taxa de formação volumétrica de c_i no cultivo. Desta equação generalista obtêm-se principalmente as taxas específicas de crescimento de biomassa, µ, de consumo de substrato, q_s, e de produção, q_p (BLANCH; CLARK, 1996). Estas equações estão descritas mais especificamente na parte de cálculos na seção materiais e métodos desta tese.

1.7.2 Batelada alimentada

A batelada alimentada surge como uma alternativa para se prolongar o cultivo de uma batelada e assim obter-se uma maior produtividade. Esta estratégia consiste em, após o fim da batelada inicial, adicionar-se ao meio de cultivo mais fonte de carbono, nitrogênio e nutrientes para possibilitar a continuidade do crescimento e produção. A etapa de alimentação é chamada também de estado semi-contínuo, pois há uma corrente de entrada, mas não há saídas do sistema. Geralmente, o indicador de parada desta estratégia é quando a densidade celular máxima é atingida, os requerimentos máximos de algum parâmetro, como o fornecimento de O₂, são atingidos ou o volume máximo do reator é atingido, o que ocorrer primeiro. O esquema desta estratégia é mostrado na Figura 11.



Figura 11: Esquema de correntes em batelada alimentada.

Esta é a estratégia mais empregada em produções industriais pois aumenta a produtividade em relação a batelada consideravelmente e não sofre os efeitos de possíveis contaminações, como será discutido mais a diante no caso de produções contínuas. Ela é empregada também quando há inibição da produção pelo substrato ou a alta concentração do mesmo ocasiona mudanças no metabolismo celular, como é o caso de leveduras, por exemplo. Na presença de altas concentrações de açúcares a levedura tem preferência pelo metabolismo fermentativo (anaeróbio) e, caso sua molécula de interesse seja produzida pelo metabolismo aeróbio, a concentração de fonte de carbono no meio de cultivo deve ser baixa. Para tanto, a batelada alimentada é ideal pois pode-se iniciar o cultivo com a baixa concentração requerida e, somando-se todo o substrato fornecido ao longo da alimentação, atingir uma concentração de açúcar superior à que seria tolerada se fosse ministrada de uma só vez.

O balanço de massa no reator pode ser descrito para o componente de interesse segundo a Equação 6. Caso o volume seja variável, este deve ser considerado incluindo-se uma alteração, tal como a Equação 7.

$$\frac{dc_i V}{dt} = F_{in} * c_{ifeed} + V * r(c_i, c_j)$$
 Eq. 6
$$\frac{dV}{dt} = F_{in}$$
 Eq. 7

Onde c_{ifeed} é a concentração do componente i na corrente de alimentação e F_{in} é a vazão de entrada da corrente que contém o componente i no reator. Estas equações estão descritas mais especificamente na parte de cálculos na seção materiais e métodos desta tese.

É importante ressaltar que, como este modo de operação trabalha em concentrações limitantes de carbono, ou seja, toda a de fonte de carbono fornecida é imediatamente consumida, é possível controlar a taxa específica de crescimento durante esta fase dependendo da técnica de adição escolhida.

1.7.2.1 Adição contínua

A adição de substrato continuamente ao mosto é uma boa opção quando se deseja conhecer o comportamento celular quanto a variação da concentração de fonte de carbono no meio de cultivo. A evolução temporal desta estratégia é diretamente dependente da biomassa contida no biorreator e pode nos dar informações sobre: o limite de substrato no meio antes de ocorrer inibição; além de possibilitar o cálculo rápido e eficiente da taxa de consumo de substrato. Inicialmente, o substrato acumula no meio, neste momento, caso o limite para o fenômeno de inibição por substrato seja ultrapassado será verificado no cultivo uma parada do crescimento associado a uma mudança na inclinação do acúmulo como esboçado na Figura 12.



Figura 12: Perfil de biomassa e substrato quando há inibição, em cinza etapa inicial de batelada para crescimento da biomassa.

Caso este limite não seja atingido, o acúmulo é seguido por uma estabilização da concentração de substrato no mosto, indicando que a taxa de consumo entra em equilíbrio com a geração de biomassa, indicando que a vazão de entrada da alimentação é equivalente a taxa de consumo de substrato (Qs). E finalmente a concentração de substrato começa a decair, atingindo zero caso não atinja a densidade máxima de biomassa possível no cultivo. A Figura 13 mostra as três fases.



Figura 13: Perfil de biomassa e substrato quando não há inibição, em cinza etapa inicial de batelada para crescimento da biomassa.

É importante salientar que, durante toda a etapa de alimentação com este tipo de adição, a biomassa cresce em sua taxa específica de crescimento máxima (µ_{max}) se não houverem efeitos de inibição observados. Este tipo de adição também é útil quando se trata da produção de uma molécula por indução,

neste caso, seria adicionado o substrato indutor da produção e sua variável de resposta passa a ser o produto gerado.

1.7.2.2 Adição por Pulsos

A alimentação por pulsos é uma boa estratégia para garantir que não haja efeitos de inibição por substrato de uma maneira simples e fácil que não requer equipamentos e conhecimentos específicos. Sua concepção consiste em adicionar determinada quantidade de substrato em tempos específicos ou quando alguma condição é atingida, por exemplo, esgotamento da fonte de carbono, ou ainda quando certa biomassa é atingida para o caso de uma produção induzida. A Figura 14 mostra o esquema de uma alimentação utilizando essa estratégia.



Figura 14: Perfil de biomassa e substrato em uma alimentação por pulsos, em cinza etapa inicial de batelada para crescimento da biomassa.

Observe que, para este tipo de adição, a biomassa também cresce em sua taxa específica de crescimento máxima (μ_{max}) como no caso anterior.

1.7.2.3 Adição exponencial

A estratégia de alimentação exponencial é a mais elegante das três aqui apresentadas e pode prover uma série de informações interessantes para o estudo de produção tanto de biomassa quanto de uma molécula de interesse. Esta é a estratégia mais comumente utilizada e bem conhecida para cultivos limitados pelo substrato. Com ela é possível escolher uma taxa específica de crescimento fixa para se estudar graças ao estado pseudo estacionário que é alcançado durante a alimentação. Para este fim é necessária uma bomba de alimentação programável, o perfil de alimentação de substrato é derivado das equações de balanço de massa que foram discutidas anteriormente e a equação utilizada neste trabalho em específico será mostrada na seção de cálculos em materiais e métodos desta tese. A Figura 15 mostra o perfil esperado para este tipo de alimentação.



Figura 15: Perfil de biomassa e substrato em uma alimentação exponencial, em cinza etapa inicial de batelada para crescimento da biomassa

1.7.3 Continuo

O sistema continuo, ou CSTR, é a estratégia mais elegante aqui apresentada. Neste caso são consideradas tanto a entrada quanto saída de nutrientes contínua ao longo do processo, o que significa dizer que nova biomassa será formada a todo momento e parte dela é carregada na corrente de saída. É válido lembrar que, em se tratando de reações microbiológicas, é necessária uma pré-batelada para crescimento de biomassa, ao final desta são acoplados os acessórios necessários ao biorreator e o modo contínuo de operação tem seu início. Por meio desta técnica é possível manter o crescimento em um estado estacionário metabólico em qualquer taxa específica de crescimento, até µmax, o que possibilita estudos de fisiologia celular, regulação metabólica e formação de produtos (BLANCH; CLARK, 1996). É válido lembrar que µmax é o limitante desta estratégia pois acima dela a formação de biomassa é inferior a vazão de saída do reator, o que leva a toda biomassa a ser arrastada do reator por essa corrente, em um fenômeno denominado *wash out*. O esquema desta estratégia é mostrado na Figura 16.



Figura 16: Esquema de correntes em sistema contínuo.

O balanço de massa para cada componente do meio pode ser escrito segundo Equação 8 abaixo.

$$\frac{dc_i V}{dt} = F_{in} * c_{i0} - F_{out} * c_i + V * r(c_i, c_j) \quad \text{Eq. 8}$$

Onde ci é a concentração do componente i, cio é a concentração do componente i de entrada, F_{out} é a vazão de saída da corrente que contem ci do reator, ci é a concentração de outro componente j que pode influenciar na taxa de formação ou consumo de i e r(ci,cj) é a taxa de formação volumétrica de ci no cultivo. Estas equações estão descritas mais especificamente na parte de cálculos na seção materiais e métodos desta tese. O ideal é que Fin e F_{out} sejam mantidas constantes e iguais a fim de não haver acúmulo de volume, esta é a hipótese principal desta estratégia. Quando esta hipótese é alcançada pode-se ajustar a equação acima e obtêm-se um importante parâmetro chamado de taxa de dilução (D) mostrado na Equação 9.

$$\frac{dc_i}{dt} = \frac{F}{V}(c_{i0} - c_i) + r(c_i, c_j)$$
$$D = \frac{F}{V} \quad \text{Eq. 9}$$

Este parâmetro é definido também como o inverso do tempo de residência (\u03cc), que é o número de vezes que todo o volume do reator é trocado. Além disso, D também é equivalente a taxa específica de crescimento em que se deseja conduzir o crescimento. Este tipo de estratégia também pode ser chamado de quimiostato, uma vez que o substrato fornecido é consumido proporcionalmente a taxa específica de crescimento da biomassa e este também terá um estado estacionário independente de D e constante, ou seja, o ambiente químico do reator será constante. Em geral, para que o sistema alcance o estado estacionário são recomendados à espera de 5 tempos de residência, com verificação da estabilidade de produção. As concentrações de biomassa (X_{ss}) e substrato (S_{ss}) no estado estacionário podem ser calculadas quando D<µ_{max} através das Equações 10 e 11 abaixo.

$$S_{ss} = \frac{D * K_s}{\mu_{max} - D} \text{ Eq. 10}$$
$$X_{ss} = Y_{x/s} \left(S_0 - \frac{D * K_s}{\mu_{max} - D} \right) \text{ Eq. 11}$$

Onde K_s é a concentração do nutriente limitante que resulta uma taxa de crescimento na metade do valor máximo. Este modelo monodiano é válido somente para culturas de bactérias e leveduras, quando se tratando de células animais ou filamentos outras considerações precisam ser feitas e o comportamento obtido é diferente do mostrado aqui (BLANCH; CLARK, 1996).

Apesar deste modo de operação ser interessante industrialmente pois, em teoria, após atingido o estado estacionário, a produção poderia seguir continuamente por tempo indefinido, na prática esta estratégia possui maior probabilidade de contaminação, pois as correntes de entrada e saída tem eventual contato com o ambiente e, quando não detectada em estado inicial, podem prejudicar toda a produção, forçando uma parada na planta, gerando prejuízo.

2 Materiais e métodos

2.1 Micro-organismo

A plataforma de expressão usada foi a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* X-33 transformada com o vetor pPGKΔ3_PRO_LIPB para uma construção dirigida pelo promotor constitutivo PGK a fim de expressar a lipase B de *Candida antarctica* (CalB) recombinante. Uma versão com 954 pares de base do gene de CalB correspondente a proteína madura teve seus códons otimizados para expressão em *P. pastoris* e sintetizada de novo pela Epoch Biosciences (USA). O vetor com a sequência que codifica a CalB sob regulação do P_{PGK} foi integrado no genoma por recombinação homóloga. Os detalhes desta construção estão descritos por CASTRO e colaboradores (2011).

2.2 Estoque e pré-inóculo

O clone produtor de CalB de *P. pastoris* foi estocado em glicerol 20% e mantido em ultrafreezer a -80°C. Para o preparo do inóculo, primeiramente, as células foram propagadas em placa de petri com meio YPD 2% (1% p/v extrato de levedura, 2% p/v peptona e 2% p/v D-dextrose com pH inicial 7,4) com 2% p/v de ágar-ágar e 100 µg/ml de zeocina.

Após 72h de incubação a 30°C desta placa, colônias únicas foram transferidas para erlenmeyers aletados de 1L com meio YPD 2% que foram cultivados a 30°C e 200 rpm durante 24h em shaker HT Multitron incubator from Infors AG (Bottmingen, Switzerland). Uma vez que os frascos agitados atinjam um OD₆₀₀ equivalente a 12, foi utilizado como inóculo volume de meio suficiente para representar 10% do volume de trabalho do biorreator (100ml quando se trabalhou com 1L e 150ml quando com 1,5L), obtendo-se, portanto, uma OD₆₀₀ equivalente a 1,2 no início do bioprocesso.

2.3 Meios de cultivo

O meio de cultivo utilizado nas bateladas foram preparados segundo descrito por MAURER e colaboradores (2006) contendo, por litro: 2.0 g ácido cítrico, 12.4 g (NH₄)₂HPO₄, 0.022 g CaCl₂·2H₂O, 0.9 g KCl, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 40 g glicerol, 2 mL biotina (0.02% p/v) e 4.6 mL PTM₁ da solução de traço de sais (6.0 g CuSO₄·5H₂O, 0.08 g NaI, 3.0 g MnSO₄·H₂O, 0.2 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0.02 g H₃BO₃, 0.5 g CoCl₂, 20.0 g ZnCl₂, 65.0 g FeSO₄·7H₂O e 5.0 mL H₂SO₄ (95%-98%) com pH final 1,2). As soluções tanto de biotina quanto o PTM₁ foram esterilizadas separadamente por filtração estéril em membrana 0,22 µm e adicionadas ao reator após autoclavação.

Para a alimentação também foi utilizado o meio descrito no mesmo trabalho acima trocando-se apenas a glicose por glicerol. O conteúdo por litro foi: 550 g

glicerol, 10 g KCl, 6.45 g MgSO₄·7H₂O, 0.35 g CaCl₂·2H₂O e 12 mL PTM₁ da solução de traço de sais.

Por outro lado, o meio de alimentação para o cultivo em quimiostato continha por litro: 0.92 g ácido cítrico, 50 g glicerol, 4.35 g (NH₄)₂HPO₄, 0.65 g MgSO₄·7H₂O, 1.7 g KCl, 0.01 g CaCl₂·2H₂O, 1.6 mL solução de traço de sais e 0.2 mL antiespumante Glanapon 2000kz (Bussetti and Co GmbH Wien, Áustria).

2.4 Modo de Condução do Bioprocesso

2.4.1 Cultivo em batelada alimentada

Os cultivos em batelada alimentada foram realizados em biorreator de 3L Applikon Biobundle da Applikon Biotechnology B.V. (Delft, The Netherlands) com volume inicial de trabalho de 1,5L. O oxigênio dissolvido (DO) foi mantido a 30% utilizando um controle em cascata alterando a velocidade de agitação entre 500 e 1000 rpm e o fluxo de aeração entre 0 e 1 vvm. Uma mistura de ar comprimido com oxigênio puro foi utilizada de acordo com a necessidade do cultivo e o antiespumante Glanapon 2000kz foi adicionado conforme necessidade durante o processo.

O pH do reator foi mantido em 7,0 com solução NH₄OH 15% e temperatura a 30°C. Uma estratégia de controle em *open loop* foi implementada para usar como perfil de alimentação durante a batelada alimentada afim de definir uma taxa específica de crescimento sob limitação de fonte de carbono para um pseudo estado estacionário.

2.4.2 Cultivo em sistema contínuo

Os cultivos em sistema contínuo foram conduzidos em biorreator Biostat B plus de Braun Biotech (Elsungen, Alemanha) com volume de trabalho de 1L. O oxigênio dissolvido foi mantido em 20% com mescla de ar comprimido e oxigênio puro quando necessário e um total de aeração a 0,8 vvm. O biorreator foi mantido a uma pressão manométrica de 0,2 bar a fim de prevenir possíveis contaminações. A agitação foi mantida a 1000 rpm, pH 7,0 com solução NH₄OH 15% e temperatura de 30°C.

A taxa específica máxima de crescimento obtida em bateladas foi o mesmo meio utilizado neste trabalho foi de 0,20 h⁻¹, portanto, três µ foram selecionados a serem estudados (0,05, 0,10 e 0,15 h⁻¹). A fim de começar a operação em sistema contínuo uma pré-batelada foi realizada. Durante o início da fase de desaceleração do crescimento uma vazão constante de meio para o quimiostato foi ligada de acordo com a taxa específica de crescimento desejada. As vazões de entrada e saída eram checadas periodicamente a fim de que a taxa de diluição fosse mantida. A cada diferente D testado, a cultura contínua foi mantida por pelo menos 5 tempos de residência. Após esta definição a fim de garantir que o estado estacionário foi atingido, amostradas foram tiradas e analisadas, caso os resultados fossem consistentes durante três tempos de residência consecutivos a estabilidade dos parâmetros estudados era confirmada.

2.5 Métodos analíticos

2.5.1 Biomassa

A concentração de biomassa foi estimada por medidas de absorbância a 600 nm feito no espectrofotômetro Hach DR3900 VIS da Hach Lange GmbH (Düsseldorf, Germany). Uma relação linear com peso de massa seca [DCW (g/L) = 0,3068 abs] foi utilizada. Medidas foram feitas em triplicata com desvio padrão aproximadamente 5%.

2.5.2 Nitrogênio em forma de NH4⁺

O amoniacal foi determinado pela reação do íon amônio com salicilato, nitroprussiato de sódio e hipoclorito em meio alcalino que forma coloração azul esverdeada sob adição dos reagentes. O procedimento foi adaptado de (FAWCETT; SCOTT, 1960; TABACCO et al., 1979). A absorbância foi medida a 595 nm usando sulfato de amônio como padrão. Medidas foram feitas em triplicata com desvio padrão aproximadamente 5%.

2.5.3 Atividade lipolítica titulométrica

A atividade enzimática foi determinada por hidrolise usando tributirina como substrato. Os ácidos graxos liberados foram neutralizados com NaOH 0,06 M.

A reação foi conduzida a 250 rpm e 40°C por 15 min (FREIRE et al., 1997). Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a produção de 1 µmol de ácido butírico por minuto sob as condições de ensaio. Medidas foram feitas em triplicata com desvio padrão aproximadamente 5%.

2.5.4 Glicerol

O glicerol foi determinado por HPLC, HP 1050 liquid chromatograph da Dionex Corporation (Sunnyvale, CA, USA), usando a coluna ICSep ICE COREGEL 87H3da Transgenimic, Inc. (Omaha, NE, USA). A temperatura foi mantida a 40°C, a fase móvel foi ácido sulfúrico 0,0032 M a uma vazão de 0.5 ml/min. O volume de injeção foi 20 µL. Medidas foram feitas em triplicata com desvio padrão menor que 1%.

2.6 Equações utilizadas

2.6.1 Taxas específicas

Métodos baseados em médias aritméticas ou taxas médias com tempo fixo precisam de valores discretos para serem calculados para cada valor off-line considerando a primeira derivada das variáveis globais para biomassa (X), volume (V), substrato (S) e produto (P): (XV), (SV) e (PV). O cálculo dessas derivadas aumenta o erro estimado e, portanto, neste trabalho foi evitado o uso dessas aproximações, quando possível, principalmente para a batelada alimentada. Neste modo de operação as taxa específicas foram calculadas por regressão linear como descrito por GARCIA-ORTEGA e colaboradores (2013). As variáveis globais (XV), (SV) e (PV) foram estimadas ao longo da fase de alimentação aplicando a ferramenta suavizar disponível no Matlab R2016a Curvefit Toolbox (The Mathworks Inc., Natik, USA) a partir dos dados off-line. A equação de regressão linear para obtenção de cada taxa específica foi derivada do balanço de massa durante a alimentação e estão descritas abaixo:

$$S_{feed} \int_{t_0}^t F dt - \int_{SV_0}^{SV} d(SV) \qquad \text{Eq. 12}$$

 $\int_{X_0V_0}^{XV} d(XV)$ Eq. 13

$$\int_{P_0V_0}^{PV} d(PV) \qquad \text{Eq. 14}$$

$$\int_{t_0}^{t} XV dt \qquad \text{Eq. 15}$$

Elas são apresentadas em forma de integral uma vez que as variáveis X, S, P, V e F são variáveis em função do tempo. Cada inclinação da regressão linear corresponde a taxa específica média para biomassa (µ - Eq 15 contra 13), consumo de substrato (qs- Eq 15 contra 12), geração de produto (qp- Eq 15 contra 14). O erro padrão utilizado também advém desta regressão linear.

Quando não era possível o cálculo de acordo com a metodologia acima, que foi o caso do contínuo, uma vez que os valores *off-line* não eram variáveis com o tempo, foram utilizadas as correlações aritméticas descritas abaixo:

$$q_P = \left(\frac{P*F - P_0 * F_0}{V}\right) * \frac{1}{X} \quad \text{Eq. 16}$$
$$q_S = \left(\frac{S*F - S_0 * F_0}{V}\right) * \frac{1}{X} \quad \text{Eq. 17}$$

2.6.2 Rendimentos

Quando possível, os rendimentos preferencialmente foram calculados utilizando as equações de 12 a 15, sendo Y_{X/S} a regressão linear da correção entre a Equação 12 contra 13 e Y_{P/X} a regressão entre 13 contra 14. Já o Y_{P/S} foi obtido pela divisão dos dois anteriormente calculados.

Para o contínuo as relações aritméticas foram utilizadas e estão mostradas abaixo:

$$Y_{X/S} = \frac{(X*F) - (X_0*F_0)}{(S_0*F_0) - (S*F)}$$
 Eq. 18

$$Y_{P/S} = \frac{(P*F) - (P_0*F_0)}{(S_0*F_0) - (S*F)}$$
 Eq. 19

$$Y_{P/X} = \frac{(P*F) - (P_0*F_0)}{(X*F) - (X_0*F_0)}$$
 Eq. 20

2.6.3 Coeficientes de manutenção

O coeficiente de manutenção de substrato (m_s) e o rendimento intrínseco substrato por biomassa (Y_{s/x}) para ambas as estratégias foram calculados pela

linearização de qs contra μ (ou D, dependendo do caso). Este cálculo é baseado no modelo de manutenção de energia de Pirt, já explicado anteriormente, e a equação está descrita abaixo:

 $q_S = Y_{S/X} * \mu + m_S$ Eq. 21

Uma lógica similar foi feita para obtenção do coeficiente de manutenção de produto (m_P) e rendimento produto por biomassa (Y_{P/X}), de acordo com o modelo Luedeking-Piret, linearizando q_P contra µ (ou D), de acordo com a equação abaixo:

 $q_P = Y_{P/X} * \mu + m_P$ Eq. 22

2.6.4 Controle open loop

A fase de alimentação na batelada alimentada foi controlada em *open loop* a fim de alcançar o estado pseudo estacionário com a taxa específica de crescimento desejada. Ele foi programado baseado nas equações de balanço de massa para produto e atualizadas em intervalos de 1 minuto para todas as variáveis medidas (COS et al., 2005). O valor inicial da vazão de alimentação foi calculado de acordo com a Equação 23 e as alimentações subsequentes com a Equação 24.

$$F_0 = \frac{(X*V)_0*\mu_{SP}}{Y_{X/S}*(S_{feed}-S_0)}$$
 Eq. 23

$$V_a = F_i * e^{\mu * t}$$
 Eq. 24

Onde V₀ é o volume total do reator no início da alimentação, µsp é a taxa específica de crescimento que se deseja estudar V_a é a vazão desejada no tempo t; F_i é a vazão no tempo t imediatamente anterior e t é o intervalo de tempo entre duas vazões calculadas. Note que somente no primeiro momento o volume do reator é levado em consideração, após o início da mesma o volume passa a ser variável, então é mais interessante utilizar uma equação que não seja dependente deste parâmetro.

3 Resultados e Discussão

3.1 Cultivo em sistema contínuo

Uma das principais vantagens em utilizar a levedura *P. pastoris* como plataforma de expressão para produção de CalB é sua habilidade em crescer até altas densidades celulares. Como o gene da CalB neste trabalho foi expresso usando o promotor constitutivo PGK, a produção do mesmo é associada ao crescimento. Devido a isso, a estratégia de produção mais indicada a fim de obter-se informações sobre o estado fisiológico das células é o sistema contínuo, já que deste modo a cultura atinge um estado estacionário que facilita a determinação de taxas específicas de crescimento, produtividades e rendimentos. Baseado no valor de μ_{max} determinado em trabalhos anteriores – 0,20 h⁻¹ (ROBERT et al., 2016) – três valores de taxa específica de crescimento foram selecionados para serem estudados, um próximo ao máximo 0,16 h⁻¹, um intermediário 0,09 h⁻¹, e o menor de todos, 0,05 h⁻¹. A utilização de um valor próximo ao μ_{max} foi evitado de forma a evitar *wash out* no bioreator, como foi explicado na seção 1.7.3. A Figura 17 mostra os resultados para a produção de CalB (em atividade), taxas específicas e rendimentos.



Figura 17: Principais parâmetros obtidos em sistema contínuo para crescimento de <u>P.pastoris</u> produzindo CalB sob promotor PGK a μ =0,05, 0,09 e 0,16 h⁻¹. (A) Rendimento produto por biomassa (Y_{P/X}) e atividade de CalB (B) Rendimentos produto por substrato (Y_{P/S}) e biomassa por produto (Y_{X/S}) (C) Taxa específica de consumo (q_S) e taxa específica de produção (q_P).

Como esperado, a concentração de biomassa permaneceu praticamente constante nas três condições estudadas. A atividade de CalB teve um pequeno 44

decaimento com o aumento de μ (Figura 17A), o que é contraditório quando comparado a produção de fragmentos de anticorpos Fab sob condições similares (GARCIA-ORTEGA et al., 2016) e também a produção de hGM-CSF (KHASA et al., 2007). Certamente, como discutido anteriormente, cada proteína recombinante de interesse pode apresentar diferentes padrões de produção. Embora ambas as produções citadas terem utilizado glicose e não glicerol como fonte de carbono, é improvável que esta seja uma razão para a diferença de resultados. Inclusive, como pode ser visto nas Figuras 17A e 17B, Yx/s ficou em torno de 0,48 gx/gs em todas as taxas de diluição, similar aos valores encontrados quando se tratando de bateladas (ROBERT et al., 2016). No entanto, os rendimentos YP/s e YP/x tiveram uma queda constante com o aumento da taxa de diluição. Este comportamento está de acordo com o modelo de manutenção de energia de Pirt para consumo de substrato com baixo coeficiente de manutenção e o modelo de Luedeking-Piret para cinética de produção, como explicado anteriormente. A Figura 17C mostra a correlação linear entre a taxa específica de consumo de glicerol e a taxa de diluição.

Na Tabela 6 estão calculadas as taxas específicas e cinéticas além dos rendimentos intrínsecos para cada µ estudado.

μ (h ⁻¹)	<i>qs</i> (gs/gx.h)	Y _{S/X} (g _{Gly} /gx)	ms (g _s /g _x .h)	<i>qp</i> (U/g _x .h)	Υ _{Ρ/Χ} (U/g _X)	<i>mp</i> (U/g _x .h)
0.045 ± 0.0043	0.10 ± 0.009			20.4 ± 2.27		
0.091 ± 0.0011	0.19 ± 0.001	1.9647	0.0115	38.4 ± 0.24	343	5.7689
0.157 ± 0.0021	0.32 ± 0.001			59.1 ± 1.00		

T 1 1 (TT / (*			1 1	1~		
Tabela b.	Laxas especiti	cas e cineticas	para consumo	de substrato e	nroducao em	sistema	continuo
1 000000 0.	I canno copeciji	cub e emericub	para consumo	ac substituto e	prounçuo em	bibientei	continuo

O coeficiente de manutenção resultante (m_s) foi de 0,01 g_s/g_x.h e o rendimento intrínseco de substrato por biomassa (Y_{s/x}) foi 2,04 g_s/g_x. Como resultado, o Y_{x/s} global manteve-se constante a 0,5 g_x/g_s ao longo de todos os testados. A correlação entre taxa específica de produção de CalB e a taxa de diluição foi baixa e a atividade diminuiu conforme o aumento de D.

O rendimento intrínseco produto por biomassa (YP/X) foi de 343 U/gx e o coeficiente de manutenção (m_P) 5,8 U/gx.h. A produção de hGM-CSF mostrou uma tendência distinta, uma curva côncava indicando q_P aumentava mais rápido que a taxa de diluição. No entanto, a produção de CalB apresentou valores de atividade que decresciam com D, sugerindo que produção extracelular foi desacelerada. Como observado anteriormente com outros sistemas de proteínas recombinantes, este resultado pode ser consequência de um problema associado ao mal enovelamento de proteínas em altas taxas específicas de crescimento, por exemplo, Zhong e colaboradores (2014) examinaram a produção de interleucina-10 humana e encontraram que maiores taxas específicas de crescimento associadas ao aumento de temperatura causava a retenção prolongada de moléculas imaturas no reticulo endoplasmático e eventualmente levava ao stress celular e diminuição da produção das mesmas.

A Figura 18 ilustra a influência da taxa de diluição nas produtividades volumétrica e específica (Q_P e Q_e), respectivamente.



Figura 18: Influência da taxa de diluição nas produtividades volumétrica e específica em sistema contínuo para crescimento de <u>P. pastoris</u> produzindo CalB sob promotor PGK.

A produtividade volumétrica de obtenção de CalB aumentou 3 vezes com o aumento da taxa de diluição (de 449 U/L.h em D=0,05 para 1331 em D=0,16 h⁻¹). Esta tendência também foi verificada quando levado em consideração a produtividade específica.

Na Tabela 7 estão compilados os resultados obtidos para as três taxas específicas de crescimento testadas (0,05, 0,09, 0,16 h⁻¹) em sistema contínuo de produção.

μ (h ⁻¹)	Biomassa Atividade		$Y_{P/X}$		0. (II/I.b)	O(u/a.b)	
	(X _{MAX})	CalB (U/L)	, %/2 (By) Beik)	(U/g _x)	QF (0) 1)	Qe (O/gx·II)	
0.045 ± 0.0043	20,2 ± 0,32	9881 ± 187	0.46 ± 0.008	449 ± 25	449 ± 57	20.4 ± 2.27	
0.091 ± 0.0011	20,4 ± 0,15	9508 ± 38	0.48 ± 0.002	423 ± 21	864 ± 24	38.4 ± 0.24	
0.157 ± 0.0021	22,4 ± 0,20	8483 ± 259	0.48 ± 0.004	377 ± 7	1331 ± 100	59.1 ± 1.00	

Tabela 7: Sumário dos principais parâmetros do bioprocesso obtidos em sistema contínuo

3.2 Cultivo em batelada alimentada limitada por glicerol

O modo batelada alimentada é um método eficiente para o fornecimento de grandes quantidades de fonte de carbono para obtenção de altas densidades celulares sem os efeitos da repressão catabólica. Neste trabalho, o substrato foi adicionado durante a fase de alimentação utilizando uma taxa de alimentação exponencial pré-programada, o que possibilita a manutenção de um pseudo estado estacionário em determinada taxa específica de crescimento sob condições limitantes de glicerol (ou seja, concentração de glicerol no meio de cultivo virtualmente zero ao longo de toda alimentação). Este sistema de controle em *open loop* foi programado baseado nas equações de balanço de massa para produto e atualizadas em intervalos de 1 minuto para todas as variáveis medidas.

Taxa específicas de crescimento similares as empregadas para o estudo do sistema contínuo foram consideradas para verificar o efeito na produção de CalB (especificamente, 0,06, 0,11 e 0,14 h⁻¹). O maior μ estudado foi mais

baixo que o μ_{max} real encontrado em bateladas (0,14 vs 0,20 h⁻¹) para evitar que houvesse acúmulo de glicerol durante a fase de alimentação. A título de exemplo, o acompanhamento das variáveis ao longo do tempo sob condições ótimas para produção de CalB para μ =0,14h⁻¹ é mostrado na Figura 19. A Figura 19A mostra concentração de glicerol, biomassa e produção de CalB enquanto a Figura 19B ilustra as taxas específicas médias calculadas pela inclinação das curvas de regressão linear, como mostrado na seção materiais e métodos.



Figura 19: Variáveis de processo e taxa específicas medias durante a fase de alimentação para crescimento de <u>P</u>. pastoris produzindo CalB sob promotor PGK a μ =0,14h⁻¹ em glicerol. (A) concentrações de biomassa, glicerol e

atividade de CalB, (B) Determinação das taxas específicas médias: e crescimento (μ), de consumo de glicerol (q_s) e de produção de CalB (q_P).

Como esperado, o glicerol foi completamente consumido e as taxas específicas de crescimento calculadas ficaram próximas ao *set-point* durante toda a fase de alimentação do bioprocesso. Esses resultados confirmam a robustez da estratégia baseada na alimentação exponencial derivada do balanço de massa. Tendo em vista o uso do promotor constitutivo na clonagem do gene, a produção de biomassa e a atividade enzimática crescem concomitantemente confirmando a produção associada ao crescimento. Análises de nitrogênio mostraram que a concentração atingida ao final da alimentação não foi, em nenhum caso, menor que 4g/L, ou seja, o único fator limitante ao crescimento ao longo do processo foi a fonte de carbono.

Como observado em produções por batelada alimentada sob o controle de um promotor constitutivo (GARCIA-ORTEGA et al., 2013), q_s e q_P também se mantêm constantes durante a alimentação. As Figuras 20A-C mostram a atividade enzimática, rendimentos e taxa específicas médias obtidas nas diferentes taxas específicas de crescimento estudadas.



Figura 20: Principais parâmetros do bioprocesso durante a fase de alimentação para crescimento de <u>P. pastoris</u> produzindo CalB sob promotor PGK em glicerol. (A) Rendimento produto por biomassa (Y_{PX}) e atividade de CalB.

(B) Rendimento produto por substrato ($Y_{P/S}$) e biomassa por substrato ($Y_{X/S}$). (C) Taxa específica de consumo (q_S) e

produção (q_P) .

Como pode ser observado, a atividade final foi linearmente correlacionada com a taxa específica de crescimento chegando ao valor máximo de 31,2.10³ U/L na maior μ . Contudo, Y_{P/X} e Y_{P/S} alcançaram um valor máximo na μ intermediária testada (Figuras 20A e 20B), enquanto o Y_{X/S} foi constante e independente de μ . A Figura 20C deixa evidente a variação das taxas específicas de produção e consumo com a de crescimento, onde q_S é independente e linear e para q_P uma tendência de platô para μ maior que 0,10 h⁻¹ é observada, indicando que esta seria a condição de produção com melhor custo/benefício.

Na Tabela 8 estão calculadas as taxas específicas e cinéticas além dos rendimentos intrínsecos para cada µ estudado.

Tabela 8: Taxas específicas e cinéticas para consumo de substrato e produção em batelada alimentada

u (b ⁻¹)	ac(a, a, b)	$Y_{S/X}$ ms (a. (a. b)		qp	$Y_{P/X}$	тр
μ(Π)	42 (Beia/ 8x.11)	(g _{Gly} /g _x)	ms (ys/ yx-m)	(U/g _x .h)	(U/g _x)	(U/g _x .h)
0.060 ± 0.0011	0.12 ± 0.002			19.4 ± 1.3	Não-	Não-
0.112 ± 0.0016	0.22 ± 0.005	2.0116	negligenciável	47.5 ± 1.8	linear	linear
0.139 ± 0.0047	0.28 ± 0.008			52.3 ± 1.0		

Como esperado, q_s teve uma relação linear com o parâmetro principal e bastante similar ao já reportado na literatura para produção de Fab com glicose sob promotor GAP (GARCIA-ORTEGA et al., 2013). O coeficiente de manutenção (m_s) foi negligenciável e o rendimento biomassa por substrato foi de 0,50 g_x/g_s.

A relação taxa específica de produção de CalB com a de crescimento foi diferente descrito acima para qs. Embora a produção tenha tido seu pico na μ mais alto, o crescimento não foi linearmente relacionado. Assim como
encontrado para a produção de Fab (GARCIA-ORTEGA et al., 2013), a curva qP versus µ é uma curva de saturação.

A Figura 21 ilustra o efeito da taxa específica de crescimento nas produtividades volumétrica e específica.



Figura 21: Influência da taxa específica de crescimento nas produtividades volumétrica e específica para crescimento de <u>P.pastoris</u> produzindo CalB sob promotor PGK em glicerol.

As produtividades foram calculadas levando em consideração todo o tempo de processo, o que inclui os tempos de batelada e alimentação, a fim de poder compará-los corretamente com outros modos de operação e estratégias de cultivo. O que se nota é a diferente evolução de Q_P e Q_e. Enquanto Q_e aumenta quase linearmente com μ , o Q_P apresenta um padrão de saturação quando μ chega próximo ao máximo.

Na Tabela 9 estão compilados os resultados obtidos para as três taxas específicas de crescimento testadas (0,06; 0,11; 0,14 h⁻¹) em sistema contínuo de produção.

μ (h ⁻¹)	Biomassa (X _{MAX})	Atividade CalB (U/L)	Y _{x/s} (gx/g _{Gly})	<i>Ү_{Р/Х} (U/g_x)</i>	Q₂ (U/L∙h)	Qe (U∕gx∙h)
0.060 ± 0.0011	93,4 ± 0,35	20499 ± 55	0.51 ± 0.006	323 ± 19,2	402 ± 11	4.3 ± 0.38
0.112 ± 0.0016	87,4 ± 4,50	27864 ± 318	0.51 ± 0.010	423 ± 16,3	796 ± 62	9.1 ± 0.91
0.139 ± 0.0047	70,7 ± 2,50	31242 ± 228	0.5 ± 0.005	377 ± 17,7	868 ± 45	12.3 ± 0.35

Tabela 9: Sumário dos principais parâmetros do bioprocesso obtidos em batelada alimentada

3.3 Comparação entre as estratégias adotadas

Nas Tabelas 6 a 9 é possível realizar uma comparação entre estratégias de cultivo utilizadas neste trabalho. O Y_{X/S} no geral é constante e similar em todas as taxas específicas de crescimento e ligeiramente maior nas bateladas alimentadas (0,50 contra 0,48 g_X/g_S). Neste caso, a atividade atinge o máximo de 31,2.10³ U/L no μ máximo (0,14 h⁻¹), enquanto em cultivo contínuo o aumento de μ leva a uma pequena diminuição da atividade enzimática.

O rendimento $Y_{P/X}$ também foi constante (cerca de 400 U/gx) independentemente do modo operacional, no entanto, exibiu uma pequena diminuição com o aumento da taxa específica de crescimento no modo contínuo e apresentou pico em μ intermediária quando utilizou-se o modo em batelada alimentada.

A Figura 22A e 22B mostram a diferença entre qs e qP entre os dois modos operacionais. A taxa específica de consumo é praticamente igual em ambos os casos, o que sugere que o metabolismo de crescimento celular é independente da estratégia de cultivo adotada. Além disso, o rendimento $Y_{X/S}$ é virtualmente independente de μ tendo em vista o coeficiente de manutenção negligenciável em modo batelada alimentada e muito pequeno em modo contínuo.



Figura 22: Comparação da cinética para crescimento de <u>P. pastoris</u> produzindo CalB sob promotor PGK em glicerol em ambos modos operacionais. (A) Taxa específica de consume de glicerol (qs) em Sistema contínuo e batelada alimentada. (B) Taxa específica de produção de CalB (q_P) em sistema contínuo e batelada alimentada.

De acordo com a literatura, o rendimento biomassa por substrato para produção de proteínas recombinantes utilizando glicerol sob controle de P_{GAP} é geralmente de 0,43 a 0,61 gx/gs e o coeficiente de manutenção (m_s) entre 0,009 e 0,032 gs/gx.h (KHASA et al., 2007; LOOSER et al., 2014). Os valores

aqui obtidos sob P_{PGK} encontram-se entre esses intervalos: 0,49 gx/gs e 0,01 gs/gx.h em modo contínuo; 0,50 gx/gs e um valor negligenciável para ms em batelada alimentada. Baseado nestes resultados é possível afirmar que não há diferenças consideráveis entre usar os dois tipos de promotor constitutivo aqui citados (P_{GAP} e P_{PGK}) em termo de consumo de substrato para esta fonte de carbono escolhida.

A variação de q_P é um pouco diferente entre os dois modos de operação. Embora os valores de q_P sejam similares, eles foram linearmente dependentes de μ em modo contínuo, mas não na batelada alimentada, onde houve saturação a partir da taxa específica de crescimento intermediária.

O maior Y_{P/X} global calculado a partir dos gráficos de q_P contra μ (em torno de 423 U/g_X) foi obtido em μ =0,11h⁻¹ em batelada alimentada. Em contraste, Y_{P/X} global foi linearmente correlacionado a μ e teve um valor intrínseco de 343 U/g_X, em modo contínuo, onde m_P foi de 5,8 U/g_X.h. Estas diferenças podem advir da concepção da estratégia de cultivo, pois em um sistema de batelada alimentada a população de células é heterogênea, apresentando várias idades e estados metabólicos, enquanto no contínuo temos uma população homogênea.

A produtividade volumétrica foi bastante similar em ambos os modos de condução do bioprocesso quando operados em μ baixo e intermediário. Em modo contínuo o pico de produção foi no maior μ atingindo 1331 U/L.h. A melhor performance do contínuo pode ser observada nos valores de produtividade específica, 3 vezes mais elevadas na maior μ (0,16 h⁻¹). A biomassa final obtida sob este modo foi 4 vezes menor que a alcançada em batelada alimentada. Por conseguinte, para os mesmos rendimentos de produto, a produtividade no modo contínuo pode ser substancialmente aumentada pelo aumento da biomassa (ou seja, aumentar a concentração de fonte de carbono na corrente de alimentação do modo de operação contínuo).

A produção de lipase B em escala industrial depende fortemente da produtividade volumétrica e específica. O tempo máximo de operação do modo contínuo utilizado deste trabalho foi de 6 semanas na maior taxa específica de

crescimento em estado estacionário. Esta estratégia foi feita com objetivo de obter lipase B para utilizações em biocatálise (PEREIRA CIPOLATTI et al., 2018; QUADROS BARSÉ et al., 2019) e escolher o modo de operação mais interessante para a obtenção de uma máxima produção (U) de lipase B. O melhor modo de operação foi estabelecido com uso da produtividade volumétrica, vazões de entrada/saída e volume do biorreator (2,33 ml/min de vazão para o modo contínuo e volume final de 2,5L em batelada alimentada). Foi assumido também que 17h em cada 53h de ciclo de produção em batelada alimentada eram usadas para preparo, drenagem, limpeza e remontagem do biorreator e, portanto, são consideradas improdutivas. Em contraste, somente um tempo inicial de montagem e batelada foram assumidos improdutivos sob operação contínua. Utilizando estas premissas, a produção de lipase calculada para o modo batelada alimentada foi de 3,24.10⁷ U enquanto no modo continuo este valor foi 5,8 vezes maior (1,89.10⁸ U) ao final de 6 semanas de cultivo.

A análise destes resultados mostra que a produção contínua, apesar de não ser a mais utilizada industrialmente, é uma opção real e mais vantajosa para o cultivo de proteínas recombinantes mesmo operando o cultivo com menor biomassa e volume útil. Valores de produtividades volumétrica e específica muito maiores são esperadas com menor requerimento de espaço físico e menos problemas e transferência de massa (o que ocorre quanto maior é a densidade celular).

Os custos operacionais para as duas estratégias ainda precisam ser calculados, no entanto, dificilmente a seleção final deve ser mudada pois a menor densidade celular na corrente de saída do modo contínuo é vantajosa também na etapa de *downstream* do processo, onde o custo é, em geral, bem elevado em especial no caso de proteínas recombinantes.

Capítulo 2

Influência da concentração salina na produção de lipase

Artigo em redação

1 Fundamentação teórica

O crescimento do micro-organismo e a produção de proteína recombinante são influenciados tanto pelas características físico-químicas do ambiente (temperatura, pH, disponibilidade bioquímica de O₂), nos quais as variáveis de controle atuam, quanto pela composição do meio de cultivo no qual estão inseridos. Conhecer, acompanhar e controlar estas variáveis é necessário para se obter o maio rendimento possível.

1.1 Temperatura e pH

A temperatura e o pH de crescimento padrão são bem estabelecidas para cada espécie de micro-organismos e, quando não definido, estudos iniciais para definir as condições padrão são necessárias. O controle destas variáveis durante todo o bioprocesso é imprescindível, visto que oscilações nestes parâmetros podem causar danos tanto a biomolécula produzida (se extracelular) quanto ao micro-organismo (MINJIE; ZHONGPING, 2013). Com o uso dos sensores, já disponíveis atualmente, controlar estes parâmetros é simples e totalmente automatizado, o que evita a possibilidade de erros por interferência humana.

1.2 Oxigênio dissolvido

Em processos aeróbios, a concentração de oxigênio dissolvido (DO) no meio de cultivo é outra variável que não deve ser negligenciada. Para assegurar uma alta disponibilidade de oxigênio, o coeficiente de transferência de massa precisa ser maximizado e este, por sua vez é influenciado por diversos fatores, como: diâmetro das bolhas, quantidade de gás, geometria e posicionamento dos impelidores, agitação e concentração de oxigênio no gás de aeração e pressão (MINJIE; ZHONGPING, 2013).

Para a produção de proteína heteróloga em *P. pastoris*, o usual é que a DO seja mantida entre 10 e 30% (ÇELIK; ÇALIK, 2012), mas outras estratégias como bateladas limitadas por oxigênio também são estudadas (BAUMANN et al., 2010; CHAROENRAT et al., 2005). Os sensores de oxigênio já estão muito bem estabelecidos e o sucesso do cultivo está intimamente ligada a taxa de consumo de oxigênio, parâmetro conhecido como OUR (JAHIC et al., 2002).

Entretanto, manter uma DO maior que a recomendada pode levar à problemas de estresse oxidativo devido ao aumento da permeabilidade da membrana celular pelos radicais livres formados (BAUMANN et al., 2010). A fim de manter esta variável controlada é indicado o uso de controles em cascata que modificam a velocidade de agitação e a vazão de aeração. O aumento da agitação proporciona uma melhor mistura do oxigênio disponível no *headspace* e ainda a diminuição no tamanho das bolhas geradas pelo borbulhamento do O_2 no meio de cultivo, aumentando assim a área superficial de contato e, portanto, melhorando a distribuição o O_2 . Já a vazão de aeração aumenta ou diminui a velocidade com a qual o O_2 é disponibilizado. Vale lembrar que a corrente de gás disponibilizado pode conter a composição necessária para suprir as necessidades celulares, como por exemplo mesclar-se correntes de ar comprimido e O_2 puro.

1.3 Meio de cultivo

O meio de cultivo afeta diretamente o crescimento microbiano e a produção de moléculas recombinantes. Segundo sua composição, o meio pode ser considerado um meio rico ou mínimo. Chama-se meio rico quando todos os nutrientes necessários ao crescimento estão em excesso e, geralmente, provem de fonte complexas como extrato de levedura e peptona, os quais não se tem a composição fixa e determinada. Já o segundo caso, é quando a composição são basicamente sais e fontes inorgânicas de obtenção dos elementos necessários, são também chamados de meios definidos pois se conhecem completamente sua composição elementar.

Os principais componentes necessários em um meio de cultivo são discutidos abaixo.

1.3.1 Fonte de carbono

A definição da fonte de carbono a ser fornecido para a célula é uma das variáveis de maior impacto no processo fermentativo, já que as vias metabólicas podem ser desviadas pela presença ou ausência de certo substrato e é justamente a via metabólica ativa no momento da produção que favorece ou não da transcrição da molécula de interesse.

No caso da *P.pastoris*, a principal fonte de carbono utilizada é o glicerol, pois o metabolismo aeróbio é a opção preferida pela célula. Outros açúcares como glicose, frutose, sorbitol, manitol e trealose também podem ser consumidos no metabolismo de carbono, no entanto, não são substratos usuais (ÇALIK et al., 2015). A concentração deste componente no meio reacional é um indicador utilizado para definir o momento de alimentação, em uma estratégia de batelada alimentada (DONG et al., 2015; ZHANG et al., 2007) ou o início da fase de indução (ARNAU et al., 2010).

1.3.2 Fonte de nitrogênio

A seleção da fonte de nitrogênio também afeta o sucesso do cultivo, alterando o crescimento e a obtenção do produto de interesse. As fontes de nitrogênio de natureza orgânica mais utilizadas são: extrato de levedura, peptona, ácidos casamino (proveniente da hidrólise de caseína), extrato de carne e polipeptona. Enquanto que as fontes inorgânicas são basicamente sais de amônio ou ureia (CHOI; PARK, 2006). Foram reportados na literatura casos onde a fonte de nitrogênio pode atuar tanto como repressora da expressão (CHAUHAN et al., 1999) quanto como auxiliá-la (KOBAYASHI et al., 2000). No entanto, o uso das fontes orgânicas normalmente gera melhores resultados, pois carregam em sua composição aminoácidos como ácido glutâmico, alanina, valina, leucina e tirosina que, para P. pastoris, funcionam como complemento metabólico e, portanto, auxiliam na produção (CHOI; PARK, 2006). Existe ainda a metilamina que, apesar de não muito utilizada, pode servir como fonte de nitrogênio e indutor da produção proteína recombinante caso ela esteja ligada ao PFLD, promotor associado a enzima formaldeído desidrogenase, como já descrito na seção 1.6.1 do capitulo 1 desta tese (RESINA et al., 2005).

As fontes de nitrogênio inorgânicas são preferidas por seu custo inferior e quando se utiliza um meio mínimo definido para a produção. Estas costumam provocar alterações no pH do meio e, portanto, uma estratégia interessante é adicioná-las ao bioprocesso ao longo do tempo de forma a manter o pH do cultivo, sem a necessidade de adição de outras substâncias.

1.3.3 Vitaminas

As vitaminas são essenciais para o crescimento microbiano, e são consideradas fatores orgânicos de crescimento. Muitas vitaminas têm função de coenzimas, sendo necessárias para a correta atividade catalítica da mesma. Os fungos, especialmente, têm a capacidade de sintetiza-las, mas existem algumas que precisam ser retiradas do meio ambiente. No caso do crescimento de *Pichia pastoris* a biotina (também conhecida como vitamina B7 ou H) é componente essencial do meio de cultivo, pois age como cofator para carboxilases envolvidas em importantes rotas metabólicas.

Em meios mínimos definidos a biotina é o único componente não salino necessário, e também o mais caro. A fim de otimizar a concentração de biotina utilizada JUNGO e colaboradores (2007) fizeram experimentos a fim de identificar a menor concentração necessária para o crescimento e produção corretos. Os autores chegaram ao valor de 20 µg/L e relataram que o uso de moléculas estruturalmente correlatas a biotina não foram eficientes.

A fim de evitar o impacto econômico da adição de biotina GASSER e colaboradores (2010) construíram uma cepa capaz de produzir a própria biotina e assim não ser mais dependente deste componente no meio.

1.3.4 Sais específicos

Os sais minerais não são limitantes ao desenvolvimento microbiano, mas fazem parte diretamente da biossíntese de compostos essenciais. São divididos em duas classes pela concentração necessária no meio, essenciais e traço. Os primeiros são: enxofre, que participa na biossíntese de aminoácidos; fósforo utilizado para síntese de ATP e ácidos nucleicos; sódio que participa da ação de transportadores da membrana plasmática; e ferro essencial pelo funcionamento de enzimas citocromo, catalase e succinil desidrogenase. Já os sais traço são: zinco; cobre; manganês; molibdênio e cobalto (MADIGAN et al., 2006).

A otimização da quantidade dos sais utilizados em um meio mínimo definido é de suma importância pois, o esgotamento de algum deles pode modificar a taxa de obtenção do produto de interesse, enquanto que o excesso pode causar estresse osmótico ou algum tipo de inibição que possa vir a prejudicar o

metabolismo celular. A presença de até 1% de NaCl é tolerada por *E. coli*, no entanto, acima disso já é inibitório ao crescimento. Existem organismos que são halófilos e suportam concentrações maiores, como *Halobacterium salinarum* que suporta até 15%, mas a faixa normal tolerada de varia de 1 a 6 % (MADIGAN et al., 2006).

ISIDRO e colaboradores (2016) fizeram uma análise por método computacional chamado projeção para rotas latentes (PLP, do inglês, projection to latent pathways) onde foram consideradas as necessidades nutricionais para 3 rotas metabólicas principais (crescimento, manutenção e formação de subprodutos) utilizando a cepa selvagem *P. pastoris* X-33 como modelo. Este estudo identificou que as concentrações de ferro e manganês na faixa de 5,7-56,8 e 0,4-4,2 mg/L, respectivamente, inibem a atividade metabólica como um todo. Além disso, a concentração dos componentes do traço de sais tem maior influência no metabolismo que a diluição dos sais essenciais no meio de cultivo.

Este resultado é corroborado também por ANANE e colaboradores (2016) que verificaram que diluir a metade o meio mínimo padrão utilizado para *P. pastoris* não influenciou o crescimento. A troca do traço de sal, o PTM₁ normalmente utilizado para este micro-organismo, por extrato de levedura não tem efeito quando a produção de substancias recombinantes está atrelada ao P_{GAP}, mas é totalmente influenciada quando atrelada ao P_{AOX}.

Visando otimizar a composição de meios mínimos definidos GHOSALKAR e colaboradores (2008) utilizaram métodos estatísticos para otimizar a composição salina a ser utilizada para *P. pastoris*. A superfície de resposta mostrou que o meio ótimo apresentaria a seguinte composição: 20 g/L glicerol, 7,5 g/L (NH₄)₂SO₄, 1 g/L MgSO₄·7H₂O, 8,5 g/L KH₂PO₄, 1,5 mL/L de biotina e 20 mL/L de uma solução de sais traço.

1.4 Secreção de proteínas recombinantes

A quantidade de proteínas secretadas em um bioprocesso é o resultado da contribuição de vários eventos biológicos, que podem ser descritos por suas taxas correspondentes: 1) taxa de transcrição; 2) de tradução; 3) de

enovelamento no ER; 4) endereçamento ao golgi; e 5) de secreção para o meio extracelular por vesículas. Em geral, essas taxas são alteradas a depender do micro-organismo, condições de processo e os promotores utilizados na clonagem do gene recombinante. Este último influencia diretamente nos endereçamentos e em sua passagem pela membrana (MASSAHI; ÇALIK, 2016). A Figura 23 mostra as etapas envolvidas no direcionamento de proteínas em leveduras.



Figura 23:Etapas envolvidas no endereçamento proteico ao meio extracelular. 1) transcrição; 2) tradução; 3) enovelamento no ER; 4) endereçamento ao golgi; 5) secreção.

Existem diferentes sinais de secreção nativos de *P. pastoris* como o IFN- α 2b, SP23, SP24, SP34, SP13 e SP26 (GHOSALKAR et al., 2008b; MASSAHI; ÇALIK, 2016), no entanto, mais utilizado é a sequência α -mating fator prepro (α -MF) de *S. cerevisiae*. O caminho secretório em *P. pastoris* ainda não é totalmente compreendido, há casos em que a proteína recombinante possui o peptídeo sinal e mesmo assim não é secretada. Algumas proteínas fusionadas com o α -MF ficam retidas no ER ou no complexo de golgi, o que diminui consideravelmente sua exportação ao meio extracelular. A deleção de parte da sequência pode ajudar na melhora da secreção, já foi mostrado, por exemplo,

que a deleção dos aminoácidos 57-70 do α-MF aumentam significativamente a eficiência deste processo (LIN-CEREGHINO et al., 2013).

2 Materiais e métodos

2.1 Meios de cultivo

2.1.1 Batelada

O meio utilizado foi o mesmo apresentando em materiais e métodos do capítulo 1 desta tese.

2.1.2 Meio para quimiostato

O cultivo em sistema contínuo utilizou cinco meios de cultivo distintos que foram trocados quando indicado. O nome pelo qual serão identificados e suas composições são, por litro:

- <u>Meio batelada</u> igual ao descrito na seção materiais e métodos do capítulo 1 desta tese;
- Meio quimiostato igual ao descrito para contínuo na seção materiais e métodos do capítulo 1 desta tese;
- <u>Mínimo estequiométrico</u> ácido cítrico 0.92 g; glicerol 40 g; (NH₄)₂HPO₄
 0.98 g; MgSO₄.7 H₂O 1.65 g; KCI 0.9 g; CaCl₂.2 H₂O 0.01 g; traço de sais 1.6 mL;
- 4) <u>Máximo estequiométrico</u> ácido cítrico 2 g; glicerol 40 g; (NH₄)₂HPO₄
 0.98 g; MgSO₄.7 H₂O 1.65 g; KCI 1.7 g; CaCl₂.2 H₂O 0.022 g; traço de sais 1.6 mL;
- 5) <u>Meio extremo</u> ácido cítrico 4 g; glicerol 40 g; (NH₄)₂HPO₄ 1.96 g; MgSO₄.7 H₂O 3.3 g; KCI 3.4 g; CaCl₂.2 H₂O 0.044 g; traço de sal 1.6 mL.

Em todos os meios 0.2 m/L de antiespumante foi adicionado à composição final.

Os meios chamados 'estequiométrico' foram calculados focado em ajustar a necessidade de sulfato e fosfato, considerando $Y_{X/S}=0,5$ g_X/g_S, 20 g/L de biomassa no reator ao final da batelada e a composição elemental de

CH_{1.88}O_{0.56}N_{0.187}S_{0.009}P_{0.01} obtida previamente para *P. pastori*s crescendo em glicose (CARNICER et al., 2009).

2.1.3 Batelada alimentada

A alimentação foi feita utilizando três meios, cada um em um experimento distinto, suas composições, por litro, e o nome pelo qual serão identificados estão descritos abaixo.

- Meio com sais igual ao descrito para alimentação na seção materiais e métodos do capítulo 1 desta tese;
- <u>Mínimo estequiométrico</u> ácido cítrico 9.2 g; glicerol 400 g; (NH₄)₂HPO₄
 9.8 g; MgSO₄.7 H₂O 16.5 g; KCl 9.0 g; CaCl₂.2 H₂O 0.1 g; traço de sais 16 mL;
- 3) <u>Meio sem sais</u> glicerol 400 g e traço de sais 12 ml.

2.2 Métodos de cultivo

2.2.1 Sistema contínuo

As condições de controle foram as mesmas descritas na seção materiais e métodos do capítulo 1 desta tese. As vazões de entrada e saída do biorreator foram reguladas para obter-se uma taxa específica de crescimento de 0,10 h⁻¹.

2.2.2 Batelada alimentada

As condições de controle foram as mesmas descritas na seção materiais e métodos do capítulo 1 desta tese. Durante a fase de alimentação a estratégia de controle em *open loop* para alimentação foi utilizada visando obter-se uma taxa específica de crescimento de 0,05⁻¹.

2.3 Métodos analíticos

2.3.1 Biomassa, NH4+, glicerol e atividade lipolítica

A metodologia das medidas de concentração de biomassa, NH4⁺, glicerol e atividade lipolítica foi igual à apresentada em materiais e métodos do capítulo 1 desta tese.

2.3.2 Proteínas totais

A concentração de proteína total foi obtida de acordo com método de BRADFORD (1976). As absorbâncias foram lidas em placa de 96 poços em espectrofotômetro a 595 nm.

2.3.3 Sulfatos e fosfatos

A concentração de sulfatos e fosfatos foi determinada utilizando cromatografia iônica, Dionex ICS-2000, equipado com amostrados automático Ultimate 3000 e detecção por condutividade. A coluna e pré-coluna utilizadas foram, respectivamente, IonPac AS18 4x250mm e IonPac AG18 4x50mm (Dionex). A temperatura foi mantida a 30°C e a fase móvel passada em rampa de 25-50 mM de KOH com fluxo de 1ml/min. O volume de amostra injetada foi de 25 μL.

2.3.4 Contagem de células

As células foram contadas em câmara de Neubauer com profundida de 0,1 mm e área de 0,0025 mm² utilizando microscópio Axioskop 40, da Zeiss, com lente de aumento Zeiss A-Plan 40x/0,65. Foi considerado N a quantidade de células obtida pela média contada nos quatro quadrantes da câmara.

2.3.5 Lise celular

A lise celular foi realizada por rompimento mecânico da membrana plasmática com metodologia adaptada de DRAGOSITS e colaboradores (2011). A amostra foi padronizada para uma DO de 100 e centrifugado a 10000 rpm e 4°C por 10 minutos. O pellet obtido a cada 2mL de mosto centrifugado foi ressuspenso com 500 µL de tampão de rompimento composto de: tampão fosfato-salino com 0,1 mM de inibidor de protease (fluoreto de fenilmetilsulfonil – PMSF) e 1% de triton X-100. Pérolas de vidro de 0,2 mm de diâmetro foram adicionadas até metade do volume. A mistura foi agitada em homogeneizador de microtubos, Beadbug modelo D1030-E, em três ciclos de 20 segundos a velocidade 3000 rpm, entre cada ciclo a amostra foi conservada em gelo durante 1 minuto.

Uma alíquota com debris celulares foi separada para utilização posterior e o restante foi centrifugado a 10000 rpm e 4°C por 10 minutos, sobrenadante foi utilizado para medida de atividade lipolítica. Com a alíquota reservada a

eficiência de lise foi inferida contando-se as células integras após o rompimento, de acordo com Equação 25.

$$E(\%) = \frac{N_0 - N_f}{N_0} * 100$$
 Eq. 25

Onde N₀ é a quantidade de células integras antes do procedimento de lise e N_f é a quantidade de células integras depois da lise.

3 Resultados e Discussão

A exposição da célula a algum tipo de estresse costuma acarretar mudanças na produção que podem ser benéficas ou não dependendo do caso. Como é conhecido da literatura, o meio mínimo padrão utilizado para *P. pastoris* apresenta excesso de sais e, portanto, pode influenciar a produção (GHOSALKAR et al., 2008a). Desta forma, os meios de cultivo empregados neste trabalho foram calculados com base na estequiometria de consumo do glicerol, utilizando a composição elemental CH1.88O0.56N0.187S0.009P0.01, obtida previamente para *P. pastoris* crescendo em glicose (CARNICER et al., 2009). Esse ajuste foi feito sem considerar as necessidades de nutrientes traço, logo a concentração da solução de traça de sais e biotina não foi modificada.

A principal diferença entre os meios (padrão e estequiométrico) foram as concentrações de MgSO₄.7 H₂O e (NH₄)₂HPO₄. O primeiro estava subestimado (0,5 para 1,65 g/L) e o segundo estava sobrestimado (12,4 para 0,98 g/L). Os meios padrões, para batelada e contínuo, apresentaram divergências entre as concentrações dos outros sais não especificados na estequiometria. Assim, foram testados dois meios estequiométricos, um mínimo, com as menores concentrações utilizadas, e outro máximo, com as maiores concentrações. O meio com elevadas concentrações salinas foi estudado com o objetivo de verificar a influência da pressão osmótica elevada na produção de lipase B. Para isto, foi utilizada uma concentraçõe salina duas vezes o valor do máximo estequiométrico. Idealmente, para fins comparativos, deveríamos ter um meio com menos sais que o mínimo estequiométrico, no entanto, esta condição levou o biorreator ao *wash out* e por isso não pode ser empregada.

Diferente do objetivo no capítulo 1, que era verificar a melhor taxa específica de crescimento para produção, o continuo aqui foi feito com esta taxa fixa a fim de verificar a influência da troca de meio na produção da lipase. A µ escolhida foi de 0,10h⁻¹ pois é a condição que apresentou melhores resultados nos experimentos anteriores. A Figura 24 mostra as taxas específicas de consumo e produção obtidas em sistema contínuo para cada meio de cultivo testado.



Figura 24: Taxas específicas de consumo e produção obtidas em sistema contínuo para cada um dos cinco meios de cultivo testado a μ =0,10h⁻¹.

A taxa específica de consumo não variou muito entre os meios, ficando em torno de 0,3 gs/gx.h. O meio quimiostato apresentou o resultado mais baixo, perto de 0,2 gs/gx.h , que era o já esperado pelos experimentos anteriores apresentados no capítulo 1, onde o qs calculado no sistema continuo foi de 0,19 gs/gx.h. A estabilidade de qs nos novos meios formulados mostrou que, mesmo sob alta pressão osmótica o consumo de glicerol não foi afetado diretamente, o que contradiz os resultados obtidos por GHOSALKAR e colaboradores (2008b). No entanto, é válido lembrar também que a maior influência encontrada por eles foi na concentração de traços de sais, parâmetro que não foi alterado neste experimento.

Por outro lado, o desbalanceamento entre sulfatos e fosfatos presentes no meio afetou a metabolização do glicerol pois, entre os meios utilizados no modo batelada e em operação contínua (quimiostato), houve uma diferença de 40% em qs.

Por outro lado, a taxa específica de produção de lipase foi fortemente afetada pela alteração da força iônica. Os dois primeiros meios não seguem um padrão de comportamento, no entanto, a comparação entre eles é dificultada, uma vez que as concentrações usadas de cada sal não seguem uma correlação direta. Já entre os três meios estequiométricos é possível correlacionar a influência da concentração salina ao resultado obtido. O aumento desta entre os meios estequiométricos máximo e mínimo levou a uma diminuição em torno de 30% na atividade enzimática. Este resultado, levou a formulação de três hipóteses: 1) a força iônica estaria influenciando a produção da lipase em si; 2) a atividade da lipase excretada no meio de cultura estaria sendo afetada e; 3) a secreção da lipase para o meio poderia ter sido afetada. A princípio, a hipótese de o meio de cultivo estar afetando a atividade da lipase foi descartada, já que a diminuição da concentração de proteínas totais seguiu o mesmo padrão de decaimento que a atividade em si (161,7, 132,3 e 94,7 mg/L, respectivamente, para proteínas totais, e 16251, 12947, 10822 U/L, respectivamente, para atividade). As outras duas hipóteses serão exploradas mais à frente.

A concentração de sulfatos e fosfatos foi medida a fim de verificar se, em algum dos casos estava ocorrendo o esgotamento desses íons. Juntamente a isto foi medida também a condutividade do meio de cultivo. A Tabela 10 resume estes resultados.

Tabela 10: Concentração de sulfatos e fosfatos e condutividade obtidas do sobrenadante do cultivo em

Meio de cultivo	SO₄²⁻ (g/L)	PO₄ ³⁻ (g/L)	Condutividade (mS/cm)
Meio batelada	0,31	5,67	13,39
Meio quimiostato	0,22	2,18	12,82
Mínimo estequiométrico	0,63	1,05	4,26

sistema contínuo de <u>P. pastoris</u> a μ =0,10 h⁻¹ com os cinco meios de cultivo testado.

Máximo estequiométrico	0,57	0,97	5,41
Meio extremo	1,10	0,85	8,78

Analisado as concentrações, em nenhum caso houve total depleção de algum íon, o mais próximo deste cenário foi o sulfato no meio quimiostato. No entanto, não se pode tirar nenhuma conclusão acerca da influência das concentrações desses íons na produção, mas a condutividade mostra uma importante relação. O meio mínimo estequiométrico foi o que apresentou menor condutividade e a maior atividade no sobrenadante e esta relação foi seguida também nos outros casos. O quimiostato apresenta uma condutividade 3,1 vezes maior que a mínimo estequiométrico e a menor atividade, reforçando a ideia que a menor força iônica no meio beneficiou a produção de CalB.

A Tabela 11 mostra as atividades, rendimentos e produtividades obtidas em cultivo contínuo de *P. pastoris* crescendo a μ =0,10h⁻¹ nos cinco meios estados.

Meio de cultivo	Atividade (U/L)	Qp (U/L.h)	Y _{x/s} (g _x /g _s)	Y _{P/X} (U/g _X)	Y _{P/S} (U/g _S)
Meio batelada	10452 ± 138	1149,72 ± 5,75	0,3014 ± 0,0011	582,63 ± 11,50	175,60 ± 12,54
Meio quimiostato	11639 ± 75	1280,29 ± 3,13	0,4705 ± 0,0004	468,68 ± 18,75	220,50 ± 6,82
Mínimo estequiométrico	16251 ± 355	1787,61 ± 14,79	0,3657 ± 0,0024	887,25 ± 13,65	324,45 ± 32,27
Máximo estequiométrico	12947 ± 31	1424,17 ± 1,29	0,3604 ± 0,0014	711,65 ± 2,07	256,45 ± 2,82
Meio extremo	10822 ± 124	1190,42 ± 5,17	0,3430 ± 0,0004	618,07 ± 31,00	211,98 ± 11,27

Tabela 11: Produtividade, rendimentos e atividade obtidos em sistema contínuo com os cinco meios de cultivo testados a μ =0,11h⁻¹.

É importante relembrar que o meio quimiostato tem maior concentração de fonte de carbono em sua composição, logo é esperado que seus parâmetros que não levam em conta a biomassa presente sejam maiores que os obtidos para o modo batelada. Mesmo com essa vantagem os valores de atividade, produtividade, Y_{P/X} e Y_{P/S} foram os maiores no caso do meio mínimo estequiométrico, o aumento obtido entre o meio quimiostato e este foi de 1,4;

1,4; 1,9; 1,5 vezes, respectivamente, indicando que este seria o meio de cultivo melhor para a produção de CalB.

É interessante notar que, com exceção do meio quimiostato, todos apresentaram o rendimento biomassa por substrato inferior ao esperado segundo a literatura e os experimentos anteriores (ROBERT et al., 2016).

A variação da concentração de sais também foi testada em um sistema de batelada alimentada, onde o estado metabólico das células não é uniforme. Para este fim, três meios de alimentação, com força iônica distintas, foram estudados. A batelada inicial para propagação de células foi realizada com meio padrão. A taxa específica de crescimento escolhida para a etapa de alimentação foi a de 0,05h⁻¹ pois, apesar de não ser a melhor velocidade em termos de produtividade, devido ao seu maior tempo de processo, seria mais fácil identificar pontos de mudança na produção entre um meio e outro.

Diferente do sistema contínuo, nesta estratégia é possível testar uma alimentação completamente livre da adição de sais. As alimentações foram feitas utilizando o meio padrão, o mínimo estequiométrico (melhor condição segundo o sistema contínuo) e um meio completamente livre da adição de sais, somente glicerol e traço de sais. Na Figura 25 estão apresentadas as concentrações de biomassa, glicerol (A) e atividade (B) ao longo do cultivo.



Figura 25: Concentrações de biomassa, glicerol (A) e atividade (B) obtidos com alimentação exponencial para $\mu=0.05h^{-1}$.

A concentração de glicerol foi limitante nos três casos, mas a biomassa formada é diferente, principalmente quando a alimentação foi realizada sem adição de sal (Figura 25A). O rendimento biomassa por substrato deste caso

foi de 0,34 gx/gs enquanto nos outros casos ficou em torno de 0,5, o que está dentro do valor esperado para *P. pastoris* crescendo em glicerol. Isto mostra a influência no metabolismo de manutenção como também reportado por GHOSALKAR e colaboradores (2008a). Neste trabalho foi visto que a falta de algum nutriente é percebida pela célula e o metabolismo é desviado para manutenção, porém não foi possível identificar especificamente qual é o componente que foi esgotado. O indício mais forte é que seja alguns dos seguintes íons: Cl⁻, Ca²⁺, K⁺ ou Mg²⁺.

O nitrogênio não foi esgotado em nenhum dos casos e, portanto, excluiu-se a possibilidade de limitação do crescimento por falta do mesmo.

A diferença na atividade presente no sobrenadante é visível logo no início da alimentação (Figura 25B, 20h). O meio sem a presença de sais tem um salto de diferença com relação aos outros dois meios e a distância entre eles se intensifica ao longo do processo. A taxa específica de produção do meio sem sais é maior mesmo com menor biomassa presente no meio (20 contra 13 e 6 U/gx.h). Outro ponto interessante é que a atividade do meio mínimo estequiométrico e o com sais cresce de modo similar até 45h de cultivo. A partir deste tempo um aumento brusco na produção de lipase é observado de maneira similar ao obtido no começo da alimentação sem sais. Este fato reforça a ideia de que o esgotamento de algum componente não medido esteja causando essa mudança de tendência na atividade lipásica identificada no sobrenadante. Ao final do bioprocesso, a alimentação sem sal levou a uma atividade final 42% mais elevada comparativamente ao meio de alimentação padrão.

A Figura 26 mostra o q_S e o q_P médios obtidos em cada meio de alimentação a μ =0,05h⁻¹ para *P. pastoris* crescendo em glicerol.

73



Figura 26:Taxas específicas de produção e consumo obtidos com batelada alimentada a μ =0,05h⁻¹ com os três meios de alimentação testados.

A taxa específica de consumo calculada ficou em torno de 0,15 gs/gx.h para todos os cultivos o que é condizente com resultados obtidos anteriormente no capítulo 1 desta tese, onde o qs para 0,05 h⁻¹ foi de 0,12 gs/gx.h, indicando que não houve alteração no metabolismo de consumo de glicerol como substrato.

Já a taxa específica de produção aumenta conforme a diminuição da pressão osmótica do meio, conforme já comentado acima, tendo um salto de 330% entre a alimentação com sais e a sem sal.

A Tabela 12 resume os rendimentos e a produtividade calculados nos três casos estudados.

Tabela 12: Rendimentos e taxas específicas de produção e crescimento obtidos com batelada alimentada a μ =0,05 h^{-1} com os três meios de alimentação testados.

Meio de cultivo	Qp (U/L.h)	Y _{x/s} (g _x /g _s)	Y _{P/S} (U/g _s)	Y _{P/X} (U/g _x)
Sem sais	820,78 ± 35,24	0,34 ± 0,01	503,55 ± 37,60	1007,09 ± 48,50

Mínimo	760 17 ± 10 12			E91 60 ± 1 24	
estequiométrico 769,17 ± 19,13		$0,50 \pm 0,01$	119,98 ± 2,35	581,09 ± 1,34	
Com sais	566,41 ± 13,31	0,52 ± 0,01	101,11 ± 2,02	309,38 ± 1,92	

O rendimento biomassa por substrato como já mencionado é menor durante a alimentação sem sais, provavelmente devido a limitação de algum nutriente no meio de cultivo. Com relação a produtividade e os outros rendimentos fica evidente o impacto negativo que o aumento da pressão osmótica causa ao cultivo. O primeiro ficou 30% inferior e os rendimentos de produção por biomassa (Y_{P/X}) e por substrato (Y_{P/S}) foram inferiores em 70% e 80%, respectivamente.

Nesta estratégia de cultivo a condutividade e as concentrações de sulfato e fosfato foram acompanhadas em pontos chave do crescimento para a alimentação com e sem sal. O ponto inicial da batelada, o final da batelada e o final da alimentação foram medidos. A Tabela 13 mostra os resultados obtidos.

Meio de cultivo	Tempo (h)	SO4 ²⁻ (g/L)	PO₄ ³⁻ (g/L)	Condutividade (mS/cm)
	0	4,69	8,70	12,92
Sem sais	19	0,38	5,90	13,26
	50	0,61	2,36	0,02
	0	4,74	8,47	11,67
Com sais	20	0,31	5,44	14,91
	51	0,01	2,83	12,28

Tabela 13: Concentração de sulfatos e fosfatos e condutividade obtidas do sobrenadante do cultivo em batelada alimentada de P. pastoris a μ =0,05 h⁻¹ com alimentação com e sem sal.

As concentrações de fosfato não chegam a zero ao final do cultivo e, curiosamente, chegam ao final da alimentação com quantidades muito parecidas nos dois casos. Já o sulfato também segue tendência muito parecida em ambos os cultivos chegando a ser totalmente consumido na alimentação com sal. Apesar disso, nenhuma mudança no comportamento de produção foi percebida, entre esses dois, nos momentos finais do cultivo, o que nos leva a

crer que, caso haja alguma influência do esgotamento de sulfato no meio, não deve estar relacionada a produção ou o cultivo não foi acompanhado tempo suficiente nesta condição.

Para a condutividade, em ambos os meios, até 19 h de cultivo os valores são similares. Entretanto, ao final do cultivo, em torno de 50h, o meio com sais manteve o valor de condutividade (12 mS/cm) enquanto o meio com alimentação sem sais chegou a valores próximos de zero. Este fato leva a crer que a baixa força iônica propicia um aumento na atividade enzimática do sobrenadante. O questionamento que resta ser respondido é se essa maior atividade advém de uma maior produção ou a maior secreção da enzima.

Com o objetivo de verificar a hipótese que a lipase produzida estivesse ficando retida no interior da célula foi realizada a lise da mesma de forma a liberar o conteúdo intracelular no final do cultivo. Neste experimento adicionou-se um inibidor de proteases ao tampão de lise. Este cuidado foi tomado pois pode ocorrer o rompimento das vesículas onde ficam armazenadas as proteases celulares. A liberação destas influenciaria na resposta de atividade medida e poderia gerar resultados alterados e inconclusivos.

O extrato gerado livre de *debris* celulares foi submetido ao mesmo teste de atividade feito para o sobrenadante livre de células do cultivo. Para o caso da alimentação sem sais nenhuma atividade foi detectada no extrato pós-lise, garantindo que toda a lipase produzida foi endereçada corretamente ao meio extracelular. No entanto, no caso da alimentação com sais, uma quantidade considerável de atividade lipásica foi detectada (sem nenhum ajuste, 7169 U/L) de CalB foram medidos no lisado livre de debris celulares.

Com o objetivo de estimar o quanto da produção total ficou em ambiente intracelular alguns ajustes precisam ser feitos na atividade medida. O primeiro deles foi a padronização da OD. Para o procedimento de lise, uma OD de 100 foi usada, pois acima disto o extrato obtido é muito viscoso e difícil de se trabalhar. A fim de igualar com a OD do ponto final do bioprocesso (309), o valor obtido foi multiplicado por 3,09.

Em seguida, um ajuste considerando a eficiência da lise celular realizado. Neste caso, a eficiência do procedimento calculada ficou em torno de 77%. Sendo assim, o resultado foi multiplicado por 1,3 para obter-se a atividade produzida que ficou retida. Após estes dois ajustes, o valor de atividade intracelular calculado foi de 28769 U/L para a alimentação com sais. Somandose este dado ao valor obtido no sobrenadante, temos 56640 U/L ao total. Este resultado é superior ao medido na alimentação sem sais, conforme esperado, uma vez que se trata de uma produção associada ao crescimento. Sendo assim, obtém-se menor biomassa quando os sais não são adicionados à alimentação.

Com base neste resultado, ficou comprovada a hipótese de que elevadas pressões osmóticas no meio de cultivo não afetam a produção da lipase, e sim sua secreção para o meio extracelular. A sinalização de endereçamento ao meio extracelular utilizado na cepa deste trabalho deste foi o α-MF de *S. cerevisiae*, como dito anteriormente, e o caminho secretório utilizando-o ainda não é completamente compreendido. Logo, mais estudos são necessários para completa compreensão do momento crítico de alteração da velocidade de endereçamento ao meio extracelular. Alterações no α-MF como as realizadas por LIN-CEREGHINO e colaboradores (2013) também poderiam ser realizadas nesta cepa a fim de melhorar a secreção em meios com elevada pressão osmótica, ou ainda a utilização de peptídeos sinais nativos de *P. pastoris* como feito por MASSAHI e ÇALIK (2016) a fim de verificar se estes também seriam afetados pela elevada concentração de sais no meio.

Capítulo 3

Reaproveitamento de biomassa

1 Fundamentação teórica

A popularização do uso de micro-organismo para produção de biomoléculas é muito interessante, no entanto, ela traz a preocupação de como descartar, ou melhor ainda, como reaproveitar a biomassa gerada nestes cultivos. Tipicamente, a quantidade de biomassa de *Saccharomyces* produzida em uma cervejaria é cerca de 2 kg/m³ (HELLBORG; PIŠKUR, 2009; HUIGE, 2006) e em uma batelada de *Pichia*, a produção é de 50 kg/m³ (ROBERT et al., 2016), o que justifica a necessidade de reaproveitamento deste coproduto gerado.

A biomassa é constituída basicamente de proteínas de alta qualidade e aminoácidos essenciais, mas além destes componentes principais também apresentam vitaminas do complexo B como B1, B2, B6, niacina, ácido fólico, ácido pantatênico e biotina, que são interessantes para utilização (DAWOOD et al., 2013). No entanto, estes nutrientes não podem ser acessados em leveduras integras, uma vez que, todos se encontram em ambiente intracelular, protegidos do meio pela membrana plasmática.

O material que é inicialmente considerado um resíduo, em geral, é levado para a queima com a finalidade de geração de energia. No entanto, a levedura residual é um material muito rico nutricionalmente e que traz mais benefícios se direcionada a um destino mais nobre. Para este fim, a célula é geralmente rompida para uso posterior e seus principais destinos serão mostrados a seguir.

1.1 Utilizações da levedura residual

A levedura que teve sua parede rompida liberando o conteúdo intracelular, com a presença ou não dos *debris* celulares de membrana, é chamado de extrato de levedura. Este material, que contém todo o conteúdo nutricional deste micro-organismo, é a principal forma de comercialização deste coproduto. Nesta forma, três principais destinos foram identificados: agente flavorizante na indústria de alimentos (CHAE et al., 2001; HALASZ; LASZTITY, 1990); como aditivo na ração animal (HUIGE, 2006; SUN et al., 2015); e para cultivo de diversos micro-organismos (GU et al., 2015; PAPAGORA et al., 2013). Uma preocupação importante é que, para as duas principais utilizações, o extrato produzido deve vir de organismos selvagens e de natureza GRAS, não podendo conter modificação genéticas de nenhum tipo. Portanto, OGMs ficam restritos a serem queimados ou servirem como fonte de nitrogênio para crescimento de micro-organismos, como foi o caso neste trabalho.

Apesar de já ser utilizado para o consumo humano, como fonte de proteínas, desde a segunda guerra mundial (na forma de creme de leveduras como o "Mirmite"), atualmente o uso do extrato de levedura vem ganhando espaço na alimentação humana sendo adicionado em pequenas quantidades, como um tempero, graças ao seu intenso sabor. Este vem dos aminoácidos contidos naturalmente na levedura, porém, devido a pequena quantidade utilizada não contribui no enriquecimento de vitaminas e minerais na alimentação.

Além disso, alguns estudos mostraram estratégias alternativas de utilização como: o aumento do crescimento de pepinos (SHEHATA et al., 2012); aumento da concentração de pigmentos fotossintéticos em soja (DAWOOD et al., 2013) e indução da biossíntese de componentes fenólicos em parreiras (PORTU et al., 2016). A Tabela 14 mostra outras aplicações mais recentes do extrato de levedura.

Uso	Referência
Suplementação alimentar em caranguejos	(ZHANG et al.,
chineses	2019)
Inibição da biossíntese de micotoxinas	(TANAKA et al.,
(tricotecenos)	2019)
Substituto do plasma de porco para	(PAN et al.,
alimentação de porcos desmamados	2019)
Mudanca na composição dos valátois om	(GUTIÉRREZ-
	GAMBOA et al.,
parteiras	2019)
Aumento na produção de vimblastina e	(MAQSOOD;
vincristina em tecidos e plântulas	ABDUL, 2017)
Aditivo om procupto porido	(PANCRAZIO et
Aditivo em presunto cozido	al. <i>,</i> 2016)
Produção de etanol	(LI et al., 2017)
Droducão do fitoquímicos	(SAAD-ALLAH et
Produção de litoquímicos	al., 2017)

Tabela 14:Trabalhos recentes com usos alternativos do extrato de levedura.

Controle do stress salino em leucenas	(NASSAR et al., 2016)	
Decréscimo da condutividade hidráulica	(ERYÜRÜK et al., 2015)	
de meios porosos para precipitação de		
CaCO3		

É interessante salientar que o emprego do extrato de levedura como fonte de nitrogênio traz interesses econômicos por trás, pois barateia o custo do meio de cultivo e reduz o do tratamento de efluentes da planta de produção.

1.2 Mercado

A comercialização do extrato de levedura pode trazer um retorno significativo, se tornando muito atraente quando integrado a produção de lipase proposta nos capítulos anteriores desta tese. Segundo o Trademap.org o produto 210220, que engloba leveduras inativas e outros micro-organismos unicelulares (excluindo embalados como medicamentos), apresenta a balança comercial mundial como mostrada na Figura 27.



Figura 27: Valores de exportações e importações mundiais do produto 210220 segundo Trademap.org.

A partir de 2016, tanto exportações como importações mostram uma tendência de crescimento em torno de 10% ao ano e pode-se esperar que este crescimento prossiga se levarmos em conta o volume de publicações que já aconteceram este ano de 2019. Outro interessante aspecto a se considerar é

que este é um mercado bastante fragmentado em termos de exportações sendo liderado pelo Brasil com 12% do *marketshare*, seguido de Estados unidos (9%), França (8%), China (7%), Bélgica (7%) e Reino unido (6%). Juntos, estes 6 países, somam quase 50% das exportações. A Figura 28 mostra o cenário completo.



Figura 28: Principais países exportadores do produto 210220, em 2018, segundo Trademap.org.

O iminente crescimento deste mercado nos últimos anos faz com que este seja um excelente momento para explorar processos de fabricação do extrato de levedura ainda mais simples e novas utilizações do mesmo, visando aproveitar a oportunidade de crescimento, manter o Brasil como principal exportador e, de fato, aumentar a fatia de mercado referente ao nosso país.

1.3 Processo de obtenção do extrato de levedura

O processo de obtenção do extrato de levedura é bastante antigo e foi melhorado ao longo do tempo. Primeiramente era feito por hidrólise ácida, um procedimento severo com uso de altas temperaturas e ácidos concentrados que precisavam ser recuperados. Este método hidrolisa as ligações peptídicas das proteínas presentes, quebrando-a até aminoácidos individuais e, às vezes, levando a completa ou parcial degradação de alguns aminoácidos. O triptofano, por exemplo, costuma ser completamente degradado na hidrólise ácida; cisteína, serina e treonina são parcialmente degradadas; e asparagina e

glutamina são transformadas em suas formas ácidas. Neste processo, as vitaminas também são completamente perdidas e há a necessidade de se neutralizar o extrato antes de sua utilização, o que gera formação de sais e pode resultar em estresse salino, caso seja utilizado para crescimento microbiano (GAO et al., 2006).

Atualmente, para a indústria alimentícia, todos os processos de extração evitam condições extremas para a máxima conservação dos nutrientes disponíveis no meio intracelular. A autólise é, então, o principal passo para sua obtenção. A autólise é o processo onde a célula degrada a si própria usando enzimas, principalmente proteases, contidas em seu interior (vacúolos e lisossomos). Ela envolve a liberação das enzimas intracelulares para catalisar a hidrólise da membrana, liberar o conteúdo intracelular, e hidrolisar as proteínas presentes em aminoácidos individuais.

O uso de alguns aditivos, como por exemplo, a adição de quitosana que se liga a gorduras (ORIGANE; SATO, 1993) e enzimas exógenas (SOMBUTYANUCHIT et al., 2001) já foram utilizados para melhorar o processo de autólise.

A incorporação da autólise no processo de obtenção do extrato de levedura substituiu o uso de ácidos e altas temperaturas por processos mais brandos seguindo indicações na Associação europeia de produtos de levedura (EURASYP). Já é disponibilizado comercialmente pela Biospringer, lesaffre culinary solution, extrato de levedura para consumo humano que segue este procedimento. As etapas de produção são: 1) bioprocesso aeróbico para multiplicação celular; 2) quebra da membrana celular para liberação do conteúdo intracelular por autólise a 55°C; 3) centrifugação para remoção de debris celulares e insolúveis; 4) concentração lenta por evaporação a 60°C sob vácuo; 5) concentrado é seco e pulverizado com ar quente utilizando a técnica de *spray-dry*.

Existem ainda outras novas técnicas que vêm sendo estudadas para aumentar a eficiência de autólise, como o uso de campos elétricos pulsados (DIMOPOULOS et al., 2018) e a técnica de sonicação (ultrassom) (MIRZAEI et al., 2015), no entanto, o aumento gerado pela introdução destas ainda não foi significativo para justificar a adição deste custo ao processo.

A levedura mais utilizada neste processo é a *Saccharomyces sp* por ser a mais utilizada industrialmente. Todavia, levando em consideração a alta densidade celular a que se chega em um cultivo com *P. pastoris*, torna-se uma estratégia interessante aproveitar a biomassa gerada para a obtenção de extrato de levedura. Portanto, as condições de autólise ideais para *P. pastoris* serão estudadas neste capítulo.

1.4 Planejamento experimental

A melhor produtividade do processo com o menor custo possível são os objetivos principais de qualquer produção que visa ser comercializada. Neste custo deve estar embutido também o tempo e os recursos que se dedicam a obter a resposta. A fim de atingir uma otimização do processo, técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (DOE) são cada vez mais exploradas.

A metodologia de planejamento fatorial foi primeiro descrita na década de 50, mas somente a partir dos anos 80 (BOX et al., 1978), com a evolução dos microcomputadores, esta técnica passou a ser empregada. Ela está associada à análise de superfície de respostas, o que minimiza o empirismo e as técnicas de tentativa e erro. Desde então este método vem sendo aprimorado e hoje é possível obter muita informação sobre seu processo, analisando a interatividade dos parâmetros estudados, com um número mínimo de experimentos.

Além de minimizar o número de experimentos necessários, o uso do DOE também melhora a qualidade da informação obtida através dos resultados. A análise de uma variável por vez, apesar de dar uma sensação de maior controle sobre as alterações no meio, desconsidera um fator que pode ser decisivo para atingir o melhor resultado: a interação e sinergia entre as variáveis. Por exemplo, se analisado o binômio tempo/temperatura não é possível atingir um resultado ótimo sem considerar a influência que um parâmetro promove na resposta do outro (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Outras vantagens de se utilizar esta técnica são: 1) todas as variáveis serão otimizadas ao mesmo tempo e dentre elas, o custo pode ser considerado encontrando a melhor relação custo/benefício; 2) é possível calcular o erro experimental graças a utilização da repetição de pontos centrais ao experimento e isto define uma margem de variação robusta para seus parâmetros ótimos; 3) a competência profissional no planejamento é mais importante do que o conhecimento estatístico, uma vez que o método já está prontamente desenvolvido (RODRIGUES; IEMMA, 2014).

Dois métodos de DOE são mais utilizados; o Plackett & Bumran (PB) e o delineamento composto central rotacional (DCCR). Em geral, é indicado que eles sejam utilizados em conjunto e em sequência. O PB possibilita uma resposta com menos experimentos, uma vez que não considera os pontos axiais, no entanto, este modelo não é passível de gerar uma superfície de resposta. O resultado que este método entrega ao pesquisador, é a importância de cada variável estudada no seu processo, ou seja, o quanto a mudança dela impacta no resultado final. Esta resposta se dá através de um diagrama de Pareto. Já o DCCR é uma metodologia mais completa, pois gera um modelo matemático que, se validado estatisticamente, pode ser usado para a construção de uma superfície de resposta que, idealmente, mostrará os pontos de máximo e mínimo do processo considerando as interações entre as variáveis estudadas. Portanto, o caminho ideal para alcançar uma condição otimizada seria realizar um PB com todas as variáveis possíveis que possam afetar o processo, a fim de determinar quais tem influência sobre a resposta final e, com estas variáveis determinadas, realizar um DCCR que permitirá a geração da superfície de resposta e, por conseguinte, a definição da condição otimizada.

2 Materiais e métodos

2.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a cepa da levedura metilotrófica *P. pastoris* com as mesmas modificações genéticas apresentadas em materiais e métodos do capítulo 1 desta tese. O mosto obtido dos bioprocessos em batelada

alimentada, realizados nos experimentos anteriores, foi centrifugado sendo o sobrenadante e a biomassa recuperados separadamente. A porção sólida recuperada foi então utilizada nas metodologias a seguir.

2.2 Autólise 1

A primeira metodologia de autólise utilizou as células ressuspensas em tampão dietanolamina, pH 6,4, na proporção de 1:1 (p/v). Após, foi adicionado 5% (v/v) de acetato de etila. Incubar a 35°C por 24 horas e posteriormente centrifugar por cinco minutos a 10000 rpm e liofilizar.

2.3 Autólise 2

A autólise foi feita utilizando uma solução com 15% de biomassa ressuspensa em água destilada (1:1 p/v), 7% de etanol e 2% de NaCl. O pH desta solução foi ajustado para 5,5 com NaOH 1M. A seguir, foi encubada a 55°C sob agitação (250 rpm). Após esse procedimento, a solução é pasteurizada a 85°C por 15 minutos. O resultante foi centrifugado por 5 minutos a 10000 rpm e liofilizado para obtenção do pó.

2.4 Concentrações de biomassa, proteína total e atividade

Ambas metodologias iguais as citadas em materiais e métodos do capítulo 1 desta tese.

2.5 Porcentagem de nitrogênio total

O nitrogênio total foi medido utilizando o método de Kjeldahl descrito em VOGEL (1992). Este é uma determinação direta, resultado da soma da amônia livre e do nitrogênio orgânico, e consiste em três etapas: 1) digestão – decomposição da matéria orgânica a 400°C com ácido sulfúrico concentrado em presença de sulfato de cobre como catalisador (também tem a função de reter o amônio presente em forma de sal); 2) destilação – após resfriada, a amostra é alcalinizada com hidróxido de sódio em destilador do tipo Kjeldahl e o nitrogênio é recuperado por arraste a vapor (fixado com uma solução de ácido bórico); 3) titulação – a amostra obtida é titulada com ácido clorídrico e o volume usado de titulante é usado para a determinação da porcentagem de nitrogênio total segundo a Equação 26 abaixo.

 $N = \frac{V * F * N * 14,008 * 100}{P}$ Eq. 26

Onde V é o volume do titulante utilizado, F é o fator do titulante, N é a normalidade do titulante e P é o peso da amostra inicial.

2.6 Concentração de nitrogênio de aminoácidos livres (FAN)

A concentração de aminoácidos livres foi determinada pelo método descrito por LIE (1973). O pó de extrato de levedura foi solubilizado na concentração de 10g/L, a mesma utilizada na confecção do meio padrão YPD. A 1 mL de amostra autolisada é adicionado 500 μ L da solução de coloração (0,28 M Na₂HPO₄.2H₂O; 0,028 M Ninidrina; 0,17M frutose, pH 6,7 ajustado com KH₂PO₄) e é levado a banho-maria a 100°C por 16 minutos. Em seguida, os tubos são resfriados e 5 mL da solução de diluição (2 g de KI e 384 mL de etanol absoluto avolumado para 1L com água destilada) é adicionado. O resultante é lido em espectrofotômetro a 570 nm. A curva padrão foi feita utilizando glicina e o fator de conversão obtido foi de OD = 0,2228 mg N/L.

2.7 Validação do crescimento celular com extrato produzido

O extrato produzido foi testado como substituinte do extrato de levedura comercial para crescimento da própria *P. pastoris*. O teste realizou-se utilizando meio YPD 2% em frascos aletados a 30°C e 250 rpm em shaker, sendo os extratos produzidos (YE_{Labim}) comparados com o comercial da Isofar.

2.8 Planejamento de experimentos (DOE)

A ferramenta de planejamento de experimentos foi utilizada para a avaliação das variáveis mais importantes do processo e para a determinação da condição ótima de extração. No primeiro caso, a estratégia escolhida foi uma matriz Plackett & Bruman (PB) de até 12 experimentos, com 3 pontos centrais, utilizando como variáveis o pH, a concentração de etanol, NaCl, biomassa, temperatura de autólise e rotação. A Tabela 15 mostra a matriz com as condições utilizados em cada experimento.
Tabela 15: Matriz de PB12 utilizada para primeiro planejamento experimental visando otimização da

	рН	[Etanol] (%v/v)	[NaCl] (%p/v)	[Biomassa] (%p/v)	Temperatura autólise (°C)	Rotação (rpm)
Ensaio	X1	X2	X3	X4	X5	X6
1	8	0	15	5	30	0
2	8	30	0	50	30	0
3	3	30	15	5	70	0
4	8	0	15	50	30	250
5	8	30	0	50	70	0
6	8	30	15	5	70	250
7	3	30	15	50	30	250
8	3	0	15	50	70	0
9	3	0	0	50	70	250
10	8	0	0	5	70	250
11	3	30	0	5	30	250
12	3	0	0	5	30	0
13	5,5	15	7,5	27,5	50	125
14	5,5	15	7,5	27,5	50	125
15	5,5	15	7,5	27,5	50	125

metodologia de autólise para produção de extrato de levedura de Pichia pastoris.

A concentração de biomassa foi considerada em peso úmido para evitar interferência no resultado observado, tanto neste, como no próximo DOE. A variável de resposta escolhida foi a concentração de FAN em dois momentos distintos, após 24 e 48h.

Para o segundo caso, foi definido um fatorial completo DCCR (delineamento composto central rotacional) 2³, composto por 8 experimentos, 3 pontos centrais e 6 pontos axiais. As variáveis levadas em consideração foram: concentração de biomassa, NaCl e rotação. A matriz utilizada, com as condições de cada experimento, é mostrada na Tabela 16.

Tabela 16: Matriz de DCCR 2³ utilizada para segundo planejamento experimental visando otimização da

Ensaio	Biomassa (% p/v)	NaCl (% p/v)	Rotação (rpm)
1	25	10	80
2	80	10	80
3	25	36	80
4	80	36	80
5	25	10	250
6	80	10	250
7	25	36	250
8	80	36	250
9	6,48370	23	165
10	98,51630	23	165
11	52,5	1,24684	165
12	52,5	44,75316	165
13	52,5	23	22,7678
14	52,5	23	307,2322
15	52,5	23	165
16	52,5	23	165
17	52,5	23	165

metodologia de autólise para produção de extrato de levedura de Pichia pastoris.

Os ensaios de ambos os DOE foram feitos em erlenmeyers aletado com a mistura indicada em cada ensaio. A temperatura e a rotação foram mantidas utilizando banho termostatizado com agitação, Innova 3100 da New brunswick.

Os resultados de cada um dos DOE foram analisados utilizando o software Statistica 10.0 (StatSoft).

3 Resultados e Discussão

As duas metodologias escolhidas para o início deste estudo resultaram do estudo de algumas das patentes que fazem referência a produção de extrato de levedura ao longo dos anos (KADO et al., 2000; KALUM, 2015; KANEGAE et al., 1989; ORIGANE; SATO, 1993). A liofilização foi escolhida, em ambos os casos, como método para a obtenção do material na forma de pó por ser o equipamento de mais fácil acesso durante este estudo. No entanto, o *spray-dryer* é a opção mais indicada em processos de maior escala. Os extratos obtidos da levedura *P.pastoris* foram comparados em relação aos aspectos

visuais, morfológicos e nutricionais com o extrato comercial fornecido pela Isofar. A Figura 29 mostra o aspecto visual dos extratos.



Figura 29:Aspecto do extrato de levedura comercial (A) e dos produzidos com a autólise 1 (B) e a 2 (C).

Quanto ao aspecto, o extrato produzido na metodologia 1 de autólise ficou com a aparência pegajosa, bastante higroscópico e de difícil manipulação. O extrato de levedura comercial, ao entrar em contato com o ambiente por algum tempo também adquire esta característica pegajosa, no entanto, é possível que haja adição de algum estabilizante durante seu processo de retirada de água que minimiza este efeito. A cor de ambos é um amarelo intenso e são bastante similares. Já o extrato obtido na metodologia 2 de autólise tem uma cor diferente, mais esbranquiçado, bem semelhante a levedura integra. Porém, o pó obtido é bem estável, não higroscópico e pode ser macerado e peneirado para chegar a mesma granulometria que o extrato de levedura comercial.

A Tabela 17 mostra a concentração de FAN e nitrogênio total obtidos para os 3 extratos.

Tabela 17: Concentração de FAN presente no extrato de levedura comercial e nos obtidos em cada metodologia de autólise de Pichia pastoris testada.

Concentração	Concentração de
FAN (mg N/mL)	Nitrogênio total (%)

Extrato comercial (Isofar)	1,11 ± 0,01	10,84 ± 0,08
Autólise 1	0,89 ± 0,02	8,12 ± 0,03
Autólise 2	1,31 ± 0,02	9,53 ± 0,03

Quanto a composição, em questão de nitrogênio total, os valores medidos para o extrato comercial estão dentro do informado pelo rótulo e o os encontrados para os extratos produzidos foram 25 e 12% inferiores aos obtidos pelas metodologias de autólise 1 e 2, respetivamente. No caso concentração de FAN, esta fica 20% inferior para a metodologia de autólise 1 e 18% superior para a segunda. Este resultado foi um indicativo que o extrato obtido, a partir do resíduo sólido de biomassa gerado da produção de CalB em *Pichia pastoris*, poderia ser promissor para utilização como meio de cultivo nas etapas de pré-inóculos do próprio processo.

Ambas as metodologias empregadas resultaram no rompimento celular por autólise e na disponibilização do nitrogênio de aminoácidos presentes nas células. Entretanto, o pó obtido na primeira não ficou muito estável, dificultando o trabalho com o mesmo e, portanto, foi escolhida a segundo metodologia para seguir com os experimentos de otimização. A partir deste ponto o autolisado obtido utilizando a metodologia 2 será referido como extrato LaBiM.

A fim de validar se seria possível a substituição do extrato de levedura comercial pelo extrato LaBiM. Os dois extratos foram testados para o crescimento da própria *Pichia pasto*ris, utilizando meio YPD 2%. A Tabela 18 mostra a biomassa final, concentração de proteínas totais e atividade enzimática obtidas nos cultivos, após 30h, nas condições experimentais descritas na parte de pré-inóculo em materiais e métodos do capítulo 1 desta tese.

Tabela 18: Biomassa, concentração de proteínas totais e atividade obtidos, após 30h, pela fermentação de Pichia pastoris utilizando o meio YPD 2% onde o extrato de levedura foi substituído conforme indicado.

Bi	omassa	Proteínas	Atividade
	(g/L)	totais	(U/L)

		(mg/L)	
Extrato			
Comercial	9,9	94	12957
(Isofar)			
Extrato	0.8	112	10802
Labim	9,0	112	10002

Os resultados acima mostram que a levedura é capaz de crescer, utilizando o extrato LaBiM como fonte de nitrogênio, tão bem quanto no comercial. Há uma diferença entre a concentração de proteínas totais e a atividade produzida que deve estar associada a menor porcentagem de nitrogênio total obtido. No entanto, o extrato produzido ainda é passível de otimização.

Com o objetivo de melhorar ainda mais o processo de obtenção do extrato LaBiM foi realizado a combinação de dois planejamentos experimentais sequenciais. O primeiro determinou as principais variáveis que afetam o teor de FAN liberado e o segundo definiu o ponto ótimo de produção por meio de uma superfície de resposta. O teor de FAN foi escolhido como variável de resposta em ambos no DOE porque segundo NAGODAWITHANA (1992), este é o componente de maior concentração no extrato de levedura, e o que mais influencia o crescimento celular de microrganismos.

O primeiro planejamento experimental foi um PB12 considerando as seis variáveis descritas em materiais e métodos deste capítulo. A Tabela 19 apresenta os valores obtidos de FAN como variável de resposta, em dois tempos de autólise distintos, para cada ensaio realizado.

	Após 24h	Após 48h
Ensaios	Y ₁ (mg N/L)	Y ₂ (mg N/L)
1	50	56

Tabela 19: Variáveis de resposta medidas em cada ensaio do PB12 realizado.

2	440	484
3	235	201
4	1412	1311
5	454	607
6	227	218
7	730	623
8	559	696
9	548	580
10	84	41
11	279	248
12	114	176
13	621	757
14	295	288
15	779	854

Segundo RODRIGUES e IEMMA (2014) o tempo nunca deve ser considerado uma variável independente pois gera resultados tendenciosos. Para evitar esta situação e mesmo assim definir um ponto onde a extração fosse completa, os ensaios foram analisados em dois tempos distintos, após 24 e 48h de autólise. Observando os valores na Tabela 19 ficou claro que prolongar o processo por mais um dia não trouxe aumento significativo na extração e consequente aumento na concentração de FAN e, por isso, somente os resultados em 24h foram utilizados na análise posterior.

Outro ponto importante a ser comentado é que os três últimos ensaios são os pontos centrais, responsáveis por determinar o erro do modelo, e destes o ensaio 14 foi excluído da análise por estar muito discrepante dos demais. A Figura 30 apresenta o gráfico de Pareto obtido.



Figura 30: Gráfico de Pareto obtido como resultado do PB12 realizado considerando o intervalo de

confiança de 85%.

O gráfico de Pareto mostra os efeitos estimados para cada variável independente considerada. A partir dele é possível definir um intervalo de confiança que se julgue adequado para definição das variáveis que realmente impactam no procedimento que se deseja otimizar. Neste caso, foi considerado um intervalo de confiança de 85% (p>0,15) (uma margem maior que o normalmente utilizado - 95%) pois, em se tratando de bioprocessos, é prudente aceitar um erro maior, dado que, a variação em duplicatas biológica é geralmente grande.

A influência do Etanol, pH e a temperatura de autólise não apresentaram influência significativa para este processo e, portanto, não foram considerados para a otimização posterior. O etanol foi retirado da metodologia, o pH passou a não ser ajustado e os ensaios posteriores foram feitos a temperatura ambiente. As variáveis maiores que o limite estabelecido, % de Biomassa, rotação e % de NaCl foram então definidas para prosseguir com a otimização.

O segundo DOE foi definido como sendo um DCCR 2³, com três pontos centrais e 6 axiais, a fim de se construir superfícies de resposta para determinar os valores ótimos das variáveis em questão. O limite superior para o

NaCl foi baseado na solubilidade deste sal em água a 20°C (LIDE, 2005) e para biomassa foi determinado de modo que o ponto axial não ultrapassasse 100%. O limite inferior para ambos foi escolhido de modo a não obter valores negativos nos pontos axiais. Neste caso, o FAN de cada ensaio foi medido somente após 24h de extração. A Tabela 20 mostra os resultados obtidos.

Após 24h Y_1 Ensaios (mg N/L) 599,46 1 2 1575,38 626,99 3 4 1640,08 543,02 5 6 1434,98 600,83 7 8 1695,14 108,74 9 1966,99 10 812,81 11 12 1298,71 1118,39 13 14 1112,20 15 1500,98 599,46 16 1575,38 17

Tabela 20: Variável de resposta medida em cada ensaio do DCCR 2³ realizado.

Os três últimos ensaios são os pontos centrais e, para a análise, o experimento 16 foi retirado por estar discrepante dos demais. O gráfico de Pareto gerado nesta abordagem indicou que a porcentagem de biomassa e NaCl continuam sendo fatores que influenciam a extração. O modelo gerado deste DCCR 2³ considerou o intervalo de confiança de 95%, e segue a Equação 27 abaixo.

 $[FAN] = 1157,37 * X_1 - 41,83 * X_1^2 + 90,03 * X_2 - 36,49 * X_2^2 - 21 * X_3 + 9,95 * X_3^2 + 30,25 * X_1 * X_2 - 0,50 * X_1 * X_3 + 28,25 * X_2 * X_3$ Eq. 27 Sendo X₁ a % m/v de biomassa, X₂ a %m/v de NaCl e X₃ a rotação utilizada. Na Figura 31 está representada a relação entre os resultados observados experimentalmente (pontos azuis) e os preditos utilizando o modelo acima (linha vermelha).



Figura 31: Gráfico gerado entre os valores da variável de resposta observados experimentalmente e os valores preditos pelo modelo obtido no DCCR 2³.

A correlação encontrada garante bastante confiabilidade no resultado, como visto acima, os valores experimentais seguem o padrão esperado pelo modelo, o R² gerado foi de 98,74% e este alto valor nos permite gerar superfícies de resposta com confiança nos valores obtidos. Nas Figuras 32 e 33 estão construídas as superfícies de resposta para o binômio rotação/NaCl e NaCl/Biomassa, respectivamente.



Figura 32: Superfície de resposta obtida entre rotação e NaCl.



Figura 33: Superfície de resposta obtida entre NaCl e Biomassa.

As áreas de vermelho mais intenso mostram a situação onde os valores de extração seriam os maiores possíveis, com valores de FAN ainda maiores que 97

os obtidos durante os ensaios. No entanto, apesar de ser possível calcular o ponto de produtividade máxima, este valor é limitado pela solubilidade do sal e a porcentagem de biomassa na mistura.

Assim a melhor condição desta extração foi determinada como: adição de 36% m/v de NaCl ao pellet obtido após centrifugação do mosto; homogeneização a máxima velocidade do equipamento utilizado (neste caso foi 350 rpm); e temperatura ambiente durante 24h.

Nestas condições, o FAN encontrado foi de 2218 mg N/L, valor este 69% maior de nitrogênio liberado antes desta etapa de otimização. Se o produto gerado for centrifugado para a retirada de debris é possível recuperar 12g de extrato liofilizado para cada 100g de biomassa extraída.

Uma parte do volume da extração otimizada foi liofilizada sem a retirada dos debris para verificar se haveria alguma alteração no preparo do meio e no crescimento de micro-organismos. Este extrato foi revalidado em cultivos de *Pichia pastoris* e *Pseudomonas aeruginosas* e os resultados são mostrados na Tabela 21.

	Tipo de	Biomassa
	extrato	(g/L)
Pichia	Otimizado	0.0
pastoris	sem debris	5,0
Pichia	Otimizado	0.4
pastoris	com debris	5,4
Pseudomonas	Otimizado	25
aeruginosas	sem debris	2,5

Tabela 21: Biomassa final obtida para crescimento de Pichia pastoris e Pseudomonas aeruginosas com extrato de levedura otimizado.

O crescimento normalmente encontrado na literatura para *P. aeruginosas* é de 2,2 g/L (DE ARAUJO KRONEMBERGER et al., 2008), valor que está de acordo com o obtido aqui. O crescimento obtido para *P. pastoris* também está dentro

do padrão, validando assim o uso do extrato LaBiM para uso em cultivos de outros micro-organismos. É importante salientar que, apesar de não ter havido diferença significativa na propagação da biomassa entre o extrato liofilizado com e sem debris celulares, no primeiro caso o meio preparado não fica completamente solúvel, sendo necessário utilizar o meio de cultivo como branco para leitura da biomassa no espectrofotômetro. Devido a esta dificuldade técnica, se o objetivo for a comercialização do extrato produzido, é indicado que os debris sejam retirados antes da liofilização.

A re-extração dos debris também foi testada a fim de se retirar o máximo possível da biomassa gerada, contudo, não houve resultados positivos de liberação de nitrogênio, invalidando o reaproveitamento dos mesmo para esta finalidade.

Capítulo 4

Uso de oxigenação não-dispersiva para produção de CalB recombinante

1 Fundamentação teórica

O grande objetivo do estudo de estratégias operacionais ideais para o cultivo de *P. pastoris* é ter um processo sólido para a produção de qualquer biomolécula. Uma alternativa para evitar um problema recorrente, que é a formação de espumas e a necessidade de adição de antiespumante no meio de cultivo, foi então estudada nesta tese.

1.1 Oxigenação não-dispersiva

O uso da aeração submersa convencional pode levar a formação de espuma devido às moléculas presentes no meio, como proteínas extracelulares, que podem causar problemas operacionais e, por consequência, aumentar os gastos com controle de processos tornando o mesmo economicamente inviável. A quebra mecânica da espuma não é eficiente e a adição de componentes químicos como antiespumante pode fazer com que a molécula produzida perca suas características ou ainda dificultar o downstream do processo, caso a molécula precise de alta pureza para ser utilizada. Por produção de biossurfactante (DE ARAUJO exemplo, caso da KRONEMBERGER et al., 2008).

Neste contexto, a oxigenação não-dispersiva por contactor de membranas surge como alternativa ao sistema de aeração clássico utilizado, que é por borbulhamento, tendo em vista que a oxigenação do mosto será feita por difusão da molécula de O₂ através da membrana, evitando assim a formação de bolhas e consequente formação de espuma.

O princípio da transferência de massa entre duas fases se dá, em geral, em um recipiente funcionando como uma coluna de simples estágio ou multiestágios com as fases circulando em contracorrente (WINSTON; SIRKAR, 1992). O foco neste trabalho será de transferência entre gás e líquido, e por isso, será o modelo utilizado para as explicações subsequentes. A escolha do equipamento que será utilizada para fazer este contato das fases é crucial, uma vez que este deve maximizar a área de contato entre as fases a fim de ter a maior transferência de massa possível. Uma tecnologia que permite evitar o contato entre as fases, evitando a formação de espumas e emulsões, e ainda

maximizar a área superficial de contato é utilizar membranas (GABELMAN; HWANG, 1999).

Um contactor de membrana é o equipamento que permite que o gás seja difundido na fase líquida sem a dispersão de uma na outra. A membrana pode ser feita de diferentes materiais e ter diferentes construções, estes aspectos serão abordados mais a frente deste trabalho. O uso de contactores gera coeficientes volumétricos de transferência de massa maiores (quando comparado a equipamento sem a interface membranar) e uma ampla faixa de fluxos com os quais se pode trabalhar. O uso dessa tecnologia é bastante relevante para diversos setores como gaseificação de líquidos, absorção de vapores etc. A Tabela 22 resume alguns dos trabalhos recentes usando contactores de membranas.

Tipo de membrana	Material da membrana	Processo	Referência
Fibra-oca microporosa	Polietersulfona	Produção de surfactina contínua	(COUTTE et al., 2013)
Fibra-oca microporosa	Polipropileno	Degaseificação para produção de sais	(KATTAN et al., 2018)
Fibra-oca microporosa	Cerâmica	Absorção de CO2	(LEE et al., 2019)
Fibra-oca composta	Poli(1-trimetilsilil-1- propino) (PTMSP) em polisulfona	Separação de etileno e etano em solução aquosa de AgNO3	(MALAKHOV et al., 2019)
Plana com cobertura eletro- catalítica	Difluoreto de polivinilideno (PVDF)	Ozonização da água para remoção de nitrobenzeno de águas residuais	(LI et al., 2019)
Plana	Celulose regenerada	Recuperação de polifenóis	(CONIDI et al., 2018)
Tubular	Propileno	Recuperação de amônia	(ZAREBSKA et al., 2012)
Fibra-oca microporosa	PVDF	Enriquecimento de CO2 para culturas de microalgas	(ZHENG et al., 2018)
Fibra-oca microporosa	Polipropileno	Recuperação e concentração de metano	(MCLEOD et al., 2016)
Fibra-oca microporosa e densa	Poli(óxido de fenileno) (PPO)	Absorção de CO2 de biogás	(BELAISSAOUI et al., 2016)
Fibra-oca	-//-	Produção de ramnolipídeo	(DE ARAUJO KRONEMBERGER et al.,

Tabela 22: Trabalhos recentes utilizando contactor de membranas.

Como pode ser visto, a maioria das utilizações é na área química e os dois que contemplam trabalhos microbiológicos visam a produção de biossurfactantes. O uso de contactores de membrana é visto então como uma oportunidade na área de crescimento de micro-organismos pois, além de permitir o controle fino da oxigenação podendo manter, por exemplo, situações de hipóxia, ele também evita a adição de componentes para evitar a formação de espuma, como já mencionado anteriormente.

Um fator importante que deve ser levado em consideração durante a operação de um contactor gás/líquido é a resistência à intrusão nos poros da membrana, mesmo com grande diferença de pressão entre as fases envolvidas, para que não haja dispersão de gás no líquido (KOVVALI; SIRKAR, 2003). Graças a essa característica, as correntes (tanto gasosa quanto líquida) podem variar de forma independente possibilitando mais liberdade nas definições dos parâmetros de processo. A Figura 34 mostra o esquema de um contactor gás-líquido.



Figura 34: Esquema de fluxos em um contactor gás/líquido. Adaptado de (KRONEMBERGER, 2007).

1.2 Tipos de membrana

As membranas que compõe o contactor podem ter, basicamente, três conformações quanto a morfologia de membrana, são elas: porosa, densa ou composta. A Figura 35 mostram elas.



Figura 35: Vista lateral de membranas com os três tipos de morfologia mais comuns.

As membranas porosas são as mais usadas e estudadas. Nelas é necessário o fino controle das pressões das fases fluidas para evitar ruptura da interface existente entre as mesmas. Quando há um descontrole nas pressões o sistema pode ter seus poros "molhados", ou seja, o líquido invade o poro e entra em contato direto com o lado gasoso. O contrário também pode acontecer, sendo o gás borbulhado no líquido, isso faz com se perca a principal característica da utilização do contactor de membrana que é a não formação de espumas e emulsões. A Figura 36 exemplifica ambos os casos desfavoráveis.

Vista em corte transversal



Figura 36: Vista transversal de um contactor de membrana porosa nos dois casos de desequilíbrio de

pressão das fases

Os sistemas formados por essa morfologia geralmente são mais estáveis por não haver interface entre os fluidos (MULDER, 1996). Dentre suas desvantagens está a propensão à formação de incrustações ou bloqueamento de poros pelo fenômeno de *fouling* (KOVVALI; SIRKAR, 2003). Ambos podem ser contornados com a deposição de uma fina camada na superfície, formando uma membrana composta, que será abordada mais à frente.

Os sistemas de membrana densa geralmente são utilizados em processos de osmose inversa onde a seleção é feita quimicamente, a molécula precisa ter a capacidade de se difundir no material da membrana a fim de atingir a corrente oposta e não por exclusão de tamanho. Este sistema tem a transferência de massa dificultada devido a essa força de difusão que precisa ser levada em consideração, além disso, o material da membrana precisa também ser bem escolhido para ter afinidade com o componente de interesse que se deseja a difusão (MULDER, 1996). Para minimizar esta desvantagem, são utilizados também sistemas onde as membranas porosas são cobertas por uma fina camada superficial, chamadas de compostas.

Esse último tipo de morfologia não necessita do controle da diferença de pressão entre as fases para garantir a imobilização da interface. A presença

dessa camada superficial representa uma resistência extra ao transporte, mas se o gás a ser transportado apresentar grande afinidade com o material da superfície e essa camada for realmente fina, o coeficiente global de transferência de massa pode não ser muito afetado (KRONEMBERGER, 2007).

Existem ainda outros tipos de membrana como as cerâmicas que tem menor flexibilidade e por isso são mais difíceis de se trabalhar sendo utilizadas em aplicações específicas como para absorção de CO₂ (LEE et al., 2019).

A disposição da membrana na casca também configura um ponto importante quando se trata de otimizar o processo. O uso da conformação de fibras ocas como contactores leva uma grande vantagem na diminuição do volume total dos equipamentos. A área de contato aumenta sensivelmente com a utilização de fibras ocas possibilitando uma maior troca entre a fase gasosa e a fase líquida.

A demanda por novos materiais para a confecção das membranas é crescente de acordo com a diversificação das utilizações. Por exemplo, sendo a membrana feita de material hidrofóbico, como geralmente o é, para evitar que os poros sejam "molhados", espera-se que moléculas hidrofóbicas possam ficar aderidas a membrana por ligações covalentes. Principalmente quando pensamos nas aplicações microbiológicas este deve ser um ponto de atenção pois, os micro-organismos produzem componentes extracelulares que podem ficar aderidos numa espécie de imobilização forçada.

Algumas aplicações exigem modificações em sua superfície para atender às condições químicas e hidrodinâmicas necessárias, como foi o caso de LI e colaboradores (2019) em que a superfície precisava ser eletro-catalítica para a reação do nitrobenzeno com o ozônio. Diante do panorama apresentado percebe-se que a escolha da combinação material da membrana e morfologia é essencial para o sucesso da implementação deste tipo de oxigenação.

1.3 Transferência de massa em contactores

A transferência de massa, no caso de contactores de membranas, pode ser calculada tanto pelo escoamento de líquido na parte externa da membrana,

quanto pelo interior das fibras. A abordagem mais simples matematicamente leva em consideração a definição dos coeficientes de transferência de massa e correlações para sua determinação. A Equação 28 apresenta a correlação obtida por VLADISAVLJEVIĆ (1999) que relaciona a área superficial ao coeficiente de transferência de massa na fase líquida.

 $A = \frac{Q}{K} * ln\left(\frac{c_{eq}-c}{c_{eq}-c_R}\right)$ Eq. 28

Onde A é a área total de troca necessária; Q é a vazão total da corrente líquida; K é o coeficiente global de transferência de massa; e c_{eq} , c e c_R são as concentrações de oxigênio na fase líquida no equilíbrio com o gás, na entrada do aerador e em sua saída, respectivamente. A primeira é consideradas constante, a segunda – caso seja uma membrana de fibra-oca, como será o caso nesta tese – é considerada a soma das resistências ao transporte na fase líquida e na pele densa (HINES; MADDOX, 1984), e a última depende do valor do coeficiente volumétrico de transferência de massa (KLa). Os detalhes destas considerações estão descritas em KRONEMBERGER (2007).

Essas considerações são importantes a fim de avaliar seis principais variáveis de processo que são decisivos para o sucesso da oxigenação não-dispersiva utilizando esta estratégia, são elas: 1) tipo de membrana; 2) pressão parcial de oxigênio na corrente gasosa; 3) vazão da corrente líquida; 4) área da membrana; 5) coeficientes de transferência de massa; e 6) capacidade de oxigenação do contactor utilizado (KRONEMBERGER, 2007).

2 Materiais e métodos

2.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi a cepa da levedura metilotrófica *P. pastoris* com as mesmas modificações genéticas apresentadas em materiais e métodos do capítulo 1 desta tese.

2.2 Método de cultivo

2.2.1 Meio de cultivo

O meio de cultivo foi o mesmo utilizado para bioprocessos em batelada descrito em materiais e métodos do capítulo 1 desta tese. A concentração de fonte de carbono foi alterada para 100 g/L de glicerol como a melhor condição encontrada em ROBERT e colaboradores (2016).

2.2.2 Batelada

A batelada para cultivo de *P. pastoris* utilizando oxigenação por contactor de membranas foi feita em biorreator New Brunswick, Bioflow 310, com vaso de 2L de volume útil. No total, 1,5L de meio de cultivo foram utilizados, porém, durante a recirculação pelo contactor, em torno de 400 mL ficam externos ao vaso durante o cultivo.

A cascata de oxigenação normalmente utilizada foi substituída por uma agitação fixa de 500 rpm e aeração 4 vvm. O set-point da DO foi definido em 30% e, caso o valor lido fosse inferior ao do set-point, uma mescla de ar comprimido e oxigênio puro era iniciado variando as concentrações de ambos entre 0 e 100%. A temperatura foi mantida em 30°C e o pH em 7,0 sendo ajustado com NH₄OH 15%.

2.2.3 Contactor de membrana

O contactor de membrana utilizado foi o modelo comercial, da Liqui-cel, SuperPhobic 2,5x8 com área superficial de 1,25m² feita de poliolefina com pele de polietileno (membrana composta) em conformação de fibras-ocas. A Figura 37 mostra a imagem do modelo utilizado.



Figura 37: Aparência externa e esquema da parte interna do contactor de membrana SuperPhobic.

Previamente ao início do cultivo, o contactor foi esterilizado quimicamente fazendo a circulação pelo sistema de uma solução de hipoclorito 0,5% durante 4h. Até a hora do inóculo, 1L de água destilada autoclavada era recirculada pelo contactor, sendo os 500 mL iniciais descartados para garantir que não haja hipoclorito na linha. Imediatamente antes do inóculo no biorreator, 500 mL de meio de cultivo eram passados pela linha do contactor e então iniciada a circulação nas condições de cultivo (Vazão de circulação 0,6L/min).

2.2.3.1 Limpeza

A limpeza durante as corridas iniciais de teste foi feita utilizando a sequência: 1) NaOH 0,1%; 2) H₂O destilada; 3) H₃PO₄ 1%; 4) H₂O destilada. Para cada etapa, 1L de solução fica em circulação durante 3h.

Para verificar a retenção de biomassa e de lipase na membrana foram feitas lavagens diferenciadas e sucessivas a fim de facilitar a dissociação das moléculas que, por ventura, estivessem presas a membrana e comprometer o

menos possível as moléculas recolhidas. A sequência de lavagens seguiu a ordem abaixo:

1ª lavagem: 700 mL de água destilada circulando por 1h;

2^a lavagem: 500 mL de água destilada com 0,25M NaCl circulando por 1h;

<u>3^a lavagem</u>: 500 mL de água destilada com 2% de Triton X-100 circulando por 1h;

4ª lavagem: 700 mL de água destilada circulando por 1h.

Após, a membrana foi limpa com a sequência inicial até que a pressão obtida em 2 vvm retornasse ao mesmo nível do início do cultivo.

2.3 Método de análise

2.3.1 Concentrações de biomassa, glicerol e atividade

As metodologias utilizadas foram iguais as citadas em materiais e métodos do capítulo 1 desta tese.

3 Resultados e Discussão

O uso do contactor de membranas foi identificado como uma oportunidade para o melhor controle de oxigenação em cultivos de *Pichia pastoris* uma vez que esta levedura é preferencialmente aeróbica e, portanto, bastante dependente do mesmo. A utilização desta nova tecnologia possibilitaria o estudo de condições em hipóxia, limitantes em oxigênio, a um KLa fixo, para verificar diferenças metabólicas em tais condições. Para testar a viabilidade de aplicação da estratégia foi estudada uma batelada, seguindo as condições ótimas encontradas em estudos anteriores com esta cepa (ROBERT et al., 2016). A Figura 38 apresenta os valores de biomassa, glicerol e atividade obtidos.



Figura 38: Acompanhamento das concentrações de biomassa, glicerol e atividade ao longo da batelada de P. pastoris utilizando contactor de membrana como método de oxigenação.

A biomassa e a atividade obtidas foram muito inferiores as esperadas (cerca de 25 g/L e 6000 U/L, respectivamente) quando comparado com a aeração por borbulhamento convencional (cerca de 50 g/L e 27000U/L, respectivamente) (ROBERT et al., 2016). Entretanto, a glicose fornecida foi totalmente consumida.

Durante o experimento, a vazão de circulação não foi alterada, mantendo-se em 0,6 L/min. A pressão de saída medida na corrente de ar variou de 0,2 bar nas primeiras 24h de cultivo, até 0,5 bar ao final. Justamente no início da fase exponencial de crescimento, quando a concentração de biomassa começa a aumentar e a exigência de oxigênio fica mais intensa, há necessidade de mescla de O₂ puro com o ar comprimido para a manutenção do nível de oxigênio dissolvido a 30%. A Figura 39 mostra a evolução da DO com a porcentagem de oxigênio puro mesclado na corrente de entrada de gás.



Figura 39: Porcentagem de oxigênio dissolvido e O2 no meio de cultivo ao longo da batelada de P. pastoris utilizando contactor de membrana como método de oxigenação

De acordo com a porcentagem de oxigênio puro fornecido, chegou-se a ter 36,8% de oxigênio na composição do gás de entrada. Pelo consumo de O₂ seria esperado que o cultivo tivesse mais biomassa consumindo oxigênio que o que foi medido no sobrenadante.

Os valores de rendimentos e taxas específicas calculados também ficaram a baixo do esperado quando comparado com os resultados obtidos no capítulo 1. A começar pela taxa específica de crescimento máxima que foi de 0,15 h⁻¹, 25% abaixo que o normal. O rendimento de biomassa por substrato caiu em 50%, o de produto por biomassa 28% e o produto por substrato 66%. Quanto as taxas específicas de consumo de substrato e produção ambos os resultados também foram inferiores 3 e 10 vezes, respectivamente. O resumo desses parâmetros se encontra na Tabela 23.

Tabela 23:Parâmetros calculados para batelada de Pichia pastoris crescendo em glicerol utilizando contactor de membrana como método de oxigenação.

μ (h⁻¹)	Y _{X/S}	Y _{P/X}	Y _{P/S}	qs	q₽
	(gx/gs)	(U/g _X)	(U/gs)	(gs/gx.h)	(U/g _x .h)
0,15	0,24	243,96	59,34	0,1002	5 <i>,</i> 9503

Desta forma, foi necessário identificar se a causa da diminuição dos parâmetros estaria relacionada a mudanças metabólicas no micro-organismo ou algum problema operacional. A princípio, era pouco provável que fosse uma questão metabólica, pois nenhum componente do meio foi modificado e o nível de oxigênio dissolvido foi mantido ao longo do processo com êxito. Portanto, a aparente perda de eficiência no bioprocesso, somada a menor concentração de biomassa no mosto e ao aumento de pressão na saída de gás, nos levou a crer que poderia estar havendo aderência de células à membrana dentro do contactor. Como a membrana é de material hidrofóbico, também existe a possibilidade de a enzima produzida ter ficado imobilizada nela, o que explicaria a baixa atividade detectada no sobrenadante.

A fim de investigar as duas hipóteses levantadas foi necessário verificar se, tanto a biomassa quanto a enzima estavam presentes no contactor após remoção do mosto. Para isso, uma limpeza diferenciada foi realizada com o objetivo de conservar a integridade celular e a atividade enzimática. Este procedimento iniciou-se com passagem de ar comprimido no lado de líquido para a completa expulsão do mosto e a cada fase de lavagem esta etapa foi repetida.

A partir daí a primeira lavagem foi feita exclusivamente com água destilada durante 1h. Nesta água de lavagem não foi identificada atividade lipolítica, porém 0,85 g/L de biomassa foi recuperado. Em massa, isto representa 0,60g de biomassa aderida a membrana.

A segunda lavagem também foi focada na recuperação da biomassa, feita com uma solução aquosa 0,25 M de NaCl para eluição da mesma. Uma queda na recuperação de biomassa foi percebida, mas ainda assim 0,58 g/L de células foi recuperada. Para a terceira lavagem o objetivo foi a retirada de enzima aderida a membrana. Nesta, 2% de Triton X-100 foi adicionado à água destilada e ocorreu formação excessiva de espuma durante esta limpeza. Visivelmente, a biomassa sofreu arraste pela espuma, portanto, ambas as fases, aquosa e espuma, foram analisadas. Os resultados confirmaram a presença de biomassa e atividade lipásica nas duas, somando-as foi recuperado 0,36 g/L de biomassa e 4941 U/L de atividade.

A quarta e última lavagem foi utilizando somente água destilada e não foi recuperado nem biomassa nem atividade neste caso. A Tabela 24 resume as atividades e concentrações de biomassa obtidas a cada lavagem do contactor.

Tabela 24: Atividades e concentração de biomassa obtidos na água de limpeza de cada lavagem sequencial feita no contactor de membrana após a batelada.

	Atividade (U/L)	Biomassa (g/L)
Sobrenadante	6001,17	24,60
1ª lavagem	0	0,85
2ª lavagem	0	0,58
3ª lavagem	4172,72	0,20
Espuma 3ª lavagem	768,67	0,16
4ª lavagem	0	0

Os dados gerados confirmam a hipótese da imobilização da CalB e da aderência da biomassa na membrana e, por isso, os resultados de produção são inferiores quando comparados a sistemas convencionais aerados por borbulhamento. No entanto, para usufruir dos benefícios desta técnica, podem ser feitas modificações no sistema para torná-la atrativa comparativamente ao processo já estabelecido, como: 1) troca de material da membrana; 2) tratamento da superfície da membrana com substâncias que evitem a aderência da biomassa; ou ainda, 3) troca da conformação da membrana.

Existe também a possibilidade de transformar este efeito em benéfico da produção, como por exemplo, em diferentes estratégias de cultivo já reportadas na literatura, a biomassa que fica aderida a membrana pode ser utilizada para

a produção contínua de biomoléculas como feito por COUTTE e colaboradores (2013). Outra alternativa interessante a ser explorada é, caso seja possível evitar a aderência da biomassa à membrana, pode-se estudar um melhor material para que toda a enzima fique imobilizada no contactor e poder ser utilizada diretamente em biocatálise num sistema do tipo *one-pot*. Entretanto, mais estudos são necessários para a viabilização da utilização desta tecnologia no cultivo de *Pichia pastoris* como plataforma de expressão para obtenção de CalB.

Conclusão geral

O objetivo desta tese foi mostrar o potencial de diferentes estratégias de processo para o cultivo de *Pichia pastoris* e como cada uma delas afeta a produção de lipase B de *Candida antarctica* (CalB) recombinante. Além disso, estudou-se o reaproveitamento da biomassa gerada no processo e a possibilidade de utilização de um contactor de membrana para oxigenação não-dispersiva do meio cultivo. Abaixo estão listadas as principais conclusões desta Tese.

- As taxas específicas de produção e consumo, no sistema contínuo, crescem linearmente com a taxa de diluição. O coeficiente de manutenção calculado (mS) foi de 0,01 gS/gX.h e o YX/S global manteve-se constante a 0,50 gX/gS ao longo de todos as taxas. A produtividade volumétrica de obtenção de CalB aumentou 200% com o aumento da taxa de diluição, ficando definido que a maior µ é a mais indicada para produção de CalB.
- Para a batelada alimentada os rendimentos Y_{P/X} e Y_{P/S} alcançaram um valor máximo na μ intermediária testada. Enquanto Q_e aumenta quase linearmente com μ, o Q_P apresenta um padrão de saturação quando μ chega próximo ao máximo. A curva de q_P versus μ também é uma curva de saturação, sendo μ de 0,11 h⁻¹ a mais indicada para produção de CalB.
- A opção mais vantajosa em escala industrial quando comparado as duas estratégias seria o modo contínuo, onde a produção total de lipase chegaria a 1,89.10⁸ U, atividade 5,8 vezes maior que a que seria obtida na batelada alimentada considerando 6 semanas de operação.
- O estudo em contínuo com diferentes meios formulados apresentou uma estabilidade de q_s demonstrando que, mesmo sob alta pressão osmótica, o metabolismo de consumo de glicerol não foi afetado diretamente. Já para atividade enzimática o aumento entre os meios estequiométricos máximo e mínimo leva a uma diminuição em torno de 30% na atividade enzimática.

- Em todos os parâmetros (atividade, produtividade, Y_{P/X} E Y_{P/S}) o meio estequiométricos mínimo obteve resultados superiores sendo indicado como o melhor para produção de CalB recombinante.
- Bateladas alimentadas com o meio considerado melhor (estequiométrico mínimo), sem sais e com excesso de sais confirmaram a influência da salinidade na atividade do sobrenadante.
- A taxa específica de produção do meio sem sais é maior mesmo com menos biomassa presente no meio (20 contra 13 e 6 U/gx.h). Ao final do bioprocesso, a alimentação sem sal levou a uma atividade final 42% mais elevada comparativamente ao meio de alimentação padrão. Já a taxa específica de produção aumenta conforme a diminuição da pressão osmótica do meio, com um aumento de 330% para a alimentação com e sem sal.
- Em relação a produtividade e os outros rendimentos o impacto negativo que o aumento da pressão osmótica causa ao cultivo ficou confirmado. O primeiro ficou 30% inferior e os rendimentos de produção por biomassa (Y_{P/X}) e por substrato (Y_{P/S}) foram inferiores em 70% e 80%, respectivamente.
- Ficou confirmado a dificuldade de secreção da lipase devido a presença de atividade lipolítica intracelular. Esta atividade foi de 28769 U/L para a alimentação com sal enquanto não foi detectada na alimentação sem sal.
- Em um planejamento DCCR 2³ o modelo gerado considerando um intervalo de confiança de 95% obteve R² de 98,74% e foi definida condição ideal para produção de extrato de levedura de *P. pastoris*, sendo ela: adição de 36% p/v de NaCl ao pellet formado da centrifugação do mosto; homogeneização a máxima velocidade do equipamento utilizado (neste caso foi 350 rpm); e temperatura ambiente durante 24h. Nestas condições, o FAN encontrado foi de 2218 mg N/L, valor este 69% maior de nitrogênio liberado do que se obtinha sem nenhuma otimização.
- Quando trocado o método de oxigenação para contactor de membranas a biomassa e atividade obtidas foram muito inferiores as esperadas. A taxa

específica de crescimento máxima foi de 0,15h⁻¹ (quando geralmente é na faixa de 0,20h⁻¹) e os rendimento biomassa por substrato, produto por biomassa e produto por substrato caíram 50, 28 e 60%, respectivamente.

 Foi identificado ao longo dos experimentos que tanto a biomassa quanto a enzima produzida estavam ficam retidas na membrana, numa espécie de imobilização forçada. Isto inviabiliza a troca do sistema nestas condições de operação.

O trabalho como um todo mostrou a possibilidade do uso de um sistema contínuo para estudo e produção da lipase B de *Candida antarctica* em *Pichia pastoris*, além de identificar dificuldades de secreção da lipase recombinante quando o meio de cultivo apresenta concentrações salinas elevadas. Um método para o reaproveitamento da biomassa gerada foi otimizado, agregando valor à produção em consonância com a química verde. Ademais, um sistema de oxigenação não-dispersiva foi proposto, todavia mais estudos precisam ser feitos a fim de que esta implementação possa ser uma realidade para a produção de CalB.

Trabalhos futuros

- Estudo de viabilidade técnico-econômica (EVTE) do processo contínuo de produção de CalB em escala industrial;
- Modificação da sinalização de secreção associado a CalB;
- Modificação da parede celular para facilitar a secreção da CalB em meio com excesso de sais;
- Teste de validação da obtenção de extrato de levedura para Saccharomyces sp. utilizando cepas da indústria cervejeira;
- Estudo de viabilidade técnico-econômica (EVTE) do processo otimizado de obtenção do extrato de levedura;
- Tratamento da membrana utilizada no contactor para evitar aderência da biomassa na mesma;
- Troca do material da membrana para evitar adsorção da lipase produzida.

Referências

AHN, J.; HONG, J.; LEE, H.; PARK, M.; LEE, E.; KIM, C.; CHOI, E.; JUNG, J.; LEE, H. Translation elongation factor 1-α gene from Pichia pastoris: molecular cloning, sequence, and use of its promoter. **Applied genetics and molecular biotechnology**, v. 74, p. 601–608, 2007.

ALMEIDA, I. F. M. DE. Caracterização Preliminar do Micobiota de Enchidos Tradicionais Portugueses Embalados em Atmosferas Protectoras Caracterização Preliminar do Micobiota de Enchidos Tradicionais Portugueses Embalados em Atmosferas Protectoras. [s.l.] Universidade técnica de lisboa, 2009.

ANANE, E.; VAN RENSBURG, E.; GÖRGENS, J. F. Comparison of constitutive and inducible β-fructofuranosidase production by recombinant Pichia pastoris in fed-batch culture using defined and semi-defined media. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 22, p. 17–22, 2016.

ANDERSON, E. M.; LARSSON, K. M.; KIRK, O. One Biocatalyst–Many Applications: The Use of Candida Antarctica B-Lipase in Organic Synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 16, n. 3, p. 181–204, 11 jul. 1998.

ARNAU, C.; RAMON, R.; CASAS, C.; VALERO, F. Optimization of the heterologous production of a Rhizopus oryzae lipase in Pichia pastoris system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 6, p. 494–500, 2010.

BAUMANN, K.; CARNICER, M.; DRAGOSITS, M.; GRAF, A. B.; STADLMANN, J.; JOUHTEN, P.; MAAHEIMO, H.; GASSER, B.; ALBIOL, J.; MATTANOVICH, D.; FERRER, P. A multi-level study of recombinant Pichia pastoris in different oxygen conditions. **BMC systems biology**, v. 4, n. 1, p. 141, 2010.

BCC RESEARCH. Global Markets for Enzymes in Industrial Applications. [s.l: s.n.].

BELAISSAOUI, B.; CLAVERIA-BARO, J.; LORENZO-HERNANDO, A.; ALBARRACIN ZAIDIZA, D.; CHABANON, E.; CASTEL, C.; RODE, S.; ROIZARD, D.; FAVRE, E. Potentialities of a dense skin hollow fiber membrane contactor for biogas purification by pressurized water absorption. **Journal of Membrane Science**, v. 513, p. 236–249, 2016.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Bioquímica**. 5^a edição ed. [s.l.] Guanabara koogan, 2002.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. **Biochemical Engineering**. 1^a edição ed. [s.l.] Marcel Dekker, 1996.

BOEKHOUT, T. Pseudozyma Bandoni emend . Boekhout (1985) and a comparison with the yeast state of Ustilago maydis (De Candolle). [s.l.] Elsevier B.V., 2011.

BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.; HUNTER, J. S. Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building. [s.l.] John Wiley & Sons, 1978.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–254, 1976.

ÇALIK, P.; ATA, Ö.; GÜNEŞ, H.; MASSAHI, A.; BOY, E.; KESKIN, A.; ÖZTÜRK, S.; ZERZE, G. H.; ÖZDAMAR, T. H. Recombinant protein production in Pichia pastoris under glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter: From carbon source metabolism to bioreactor operation parameters. **Biochemical Engineering Journal**, v. 95, p. 20–36, 2015.

CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; DE CASTRO-ALVAREZ, M. S.; SANCHEZ-MONTERO, J. M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S. W.; SINISTERRA, J. V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 14, n. 4–6, p. 111– 123, 2001.

CARNICER, M.; BAUMANN, K.; TÖPLITZ, I.; SÁNCHEZ-FERRANDO, F.; MATTANOVICH, D.; FERRER, P.; ALBIOL, J. Macromolecular and elemental composition analysis and extracellular metabolite balances of Pichia pastoris growing at different oxygen levels. **Microbial Cell Factories**, v. 8, n. December, 2009.

CASTRO, A. M. DE; BEVILAQUA, J. V.; FREIRE, D. M. G.; TORRES, F. A.; SANT'ANNA, L. M. M.; GUTARRA, M. L. E.; BARBOSA, C. A.; ALMEIDA, R. V.; MENEZES, R. R. DE; CUNHA, A. G. US 20110183400 A1 - Process for production of lipases by genetic modification of yeastUS, 2011.

CELIK, E.; CALIK, P. Production of recombinant proteins by yeast cells. Biotechnology Advances, v. 30, n. 5, p. 1108–1118, 2012.

CEREGHINO, G. P. L.; CEREGHINO, J. L.; ILGEN, C.; CREGG, J. M. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast Pichia pastoris. Curr Opin Biotech, v. 13, n. 4, p. 329–332, 2002.

CHAE, H. J.; JOO, H.; IN, M.-J. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: e€ects of di€erent enzymatic treatments on solid and protein recovery and avor characteristics. Bioresource Technology, v. 76, p. 253–258, 2001.

CHAPUT, L.; SANEJOUAND, Y. H.; BALLOUMI, A.; TRAN, V.; GRABER, M. Contribution of both catalytic constant and Michaelis constant to CALB enantioselectivity: Use of FEP calculations for prediction studies. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 76, p. 29–36, 2012.

CHAROENRAT, T .; KETUDAT-CAIRNS, M .; STENDAHL-ANDERSEN, H .; JAHIC, M.; ENFORS, S. O. Oxygen-limited fed-batch process: An alternative control for Pichia pastoris recombinant protein processes. Bioprocess and Biosystems Engineering, v. 27, n. 6, p. 399–406, 2005.

CHAUHAN, A. K.; ARORA, D.; KHANNA, N. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant Pichia pastoris. Process Biochemistry, v. 34, n. 2, p. 139–145, 1999.

CHOI, D. B.; PARK, E. Y. Enhanced production of mouse α -amylase by feeding combined nitrogen and carbon sources in fed-batch culture of recombinant Pichia pastoris. Process Biochemistry, v. 41, n. 2, p. 390–397, 2006.

CONIDI, C.; DRIOLI, E.; CASSANO, A. Membrane-based agro-food production processes for polyphenol separation, purification and concentration. Current **Opinion in Food Science**, v. 23, p. 149–164, 2018.

COS, O.; RESINA, D.; FERRER, P.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F. Heterologous production of Rhizopus oryzae lipase in Pichia pastoris using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fedbatch cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2–3, p. 86–94, 2005.

COS, O.; RAMON, R.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F. A Simple Model-Based Control for Pichia pastoris Allows a More Efficient Heterologous Protein Production Bioprocess. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 95, p. 503– 505, 2006.

COUTTE, F.; LECOUTURIER, D.; LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; JACQUES, P.; DHULSTER, P. New integrated bioprocess for the continuous production, extraction and purification of lipopeptides produced by Bacillus subtilis in membrane bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 25–32, 2013.

CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L.; SHI, J.; HIGGINS, D. R. Recombinant Protein Expression in Pichia pastoris. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23–52, 2000.

DAWOOD, M. G.; EL-LETHY, S. R.; SH SADAK, M. Role of Methanol and Yeast in Improving Growth, Yield, Nutritive Value and Antioxidants of Soybean. **World Applied Sciences Journal**, v. 26, n. 1, p. 6–14, 2013.

DE ARAUJO KRONEMBERGER, F.; MARIA MELO SANTA ANNA, L.; CAROLINA LOUREIRO BRITO FERNANDES, A.; RAMOS DE MENEZES, R.; PIACSEK BORGES, C.; MARIA GUIMARÃES FREIRE, D.; KRONEMBERGER, F. A.; BORGES, C. P.; M SANTA ANNA, L. M.; L B FERNANDES, A. C.; MENEZES, R. R.; G FREIRE, D. M. Oxygen-controlled Biosurfactant Production in a Bench Scale Bioreactor Introduction and Objectives. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 147, p. 33–45, 2008.

DIMOPOULOS, G.; STEFANOU, N.; ANDREOU, V.; TAOUKIS, P. Effect of pulsed electric fields on the production of yeast extract by autolysis. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 48, p. 287–295, 2018.

DONG, Y.; XU, R.; WANG, L.; ZHANG, J.; BAI, C.; SUN, A.; WEI, D. A combined feeding strategy for enhancing mycophenolic acid production by fedbatch fermentation in Penicillium brevicompactum. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 3, p. 336–340, 2015.

DRAGOSITS, M.; MATTANOVICH, D.; GASSER, B. Induction and measurement of UPR and osmotic stress in the yeast Pichia pastoris. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 489

DUAN, H.; UMAR, S.; HU, Y.; CHEN, J. Both the AOX1 promoter and the FLD1 promoter work together in a Pichia pastoris expression vector. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 10, p. 1779–1783, 2009.

DUTTA, R. Fundamentals of Biochemical Engineering. [s.l.] Springer, 2008.

EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. Enhanced synthesis of isoamyl acetate using an ionic liquid-alcohol biphasic system at high hydrostatic pressure. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 67, n. 1–2, p. 36–40, 2010.

ELLIS, S. B.; BRUST, P. F.; KOUTZ, P. J.; WATERS, A. F.; HARPOLD, M. M.; GINGERAS, T. R. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol regulatable genes from the yeast Pichia pastoris. **Molecular and Cellular Biology**, v. 5, n. 5, p. 1111–1121, 1985.

ERYÜRÜK, K.; YANG, S.; SUZUKI, D.; SAKAGUCHI, I.; KATAYAMA, A. Effects of bentonite and yeast extract as nutrient on decrease in hydraulic conductivity of porous media due to CaCO3 precipitation induced by Sporosarcina pasteurii. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 120, n. 4, p. 411–418, 2015.

FAWCETT, J. K.; SCOTT, J. E. A rapid and precise method for the determination of urea. **Journal of clinical pathology**, v. 13, p. 156–159, 1960.

FERNANDES, P. M. B. Levedura: do pão à biotecnologia. [s.l: s.n.].

FREEDONIA GROUP. World enzyme demand. [s.l: s.n.].

FREIRE, D. M.; TELES, E. M.; BON, E. P.; SANT' ANNA, G. L. Lipase
production by Penicillium restrictum in a bench-scale fermenter: effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 63–65, p. 409–421, 1997.

GABELMAN, A.; HWANG, S. T. Hollow fiber membrane contactors. **Journal of Membrane Science**, v. 159, n. 1–2, p. 61–106, 1999.

GAO, M.; HIRATA, M.; TOORISAKA, E.; HANO, T. Study on acid-hydrolysis of spent cells for lactic acid fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 28, n. June 2005, p. 87–91, 2006.

GARCIA-ORTEGA, X.; FERRER, P.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F. Fedbatch operational strategies for recombinant Fab production with Pichia pastoris using the constitutive GAP promoter. **Biochemical Engineering Journal**, v. 79, p. 172–181, 2013.

GARCIA-ORTEGA, X.; ADELANTADO, N.; FERRER, P.; MONTESINOS, J. L.; VALERO, F. A step forward to improve recombinant protein production in Pichia pastoris: From specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 6, p. 681–691, 2016.

GASSER, B.; DRAGOSITS, M.; MATTANOVICH, D. Engineering of biotinprototrophy in Pichia pastoris for robust production processes. **Metabolic Engineering**, v. 12, n. 6, p. 573–580, 2010.

GELLISSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 6, p. 741–750, 2000.

GHOSALKAR, A.; SAHAI, V.; SRIVASTAVA, A. Optimization of chemically defined medium for recombinant Pichia pastoris for biomass production. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 16, p. 7906–7910, 2008a.

GHOSALKAR, A.; SAHAI, V.; SRIVASTAVA, A. Secretory expression of interferon-alpha 2b in recombinant Pichia pastoris using three different secretion signals. **Protein Expression and Purification**, v. 60, n. 2, p. 103–109, 2008b.

GOEDDEL, D. V.; KLEID, D. G.; BOLIVAR, F.; HEYNEKER, H. L.; YANSURA, 124

D. G.; CREA, R.; HIROSEF, T.; KRASZEWSKIT, A.; ITAKURAF, K.; RIGGSTT, A. D. Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. v. 76, n. 1, p. 106–110, 1979.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BUSTO, E.; GOTOR, V. Candida antarctica Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, n. 7–8, p. 797–812, maio 2006.

GU, H.; NAGLE, N.; PIENKOS, P. T.; POSEWITZ, M. C. Nitrogen recycling from fuel-extracted algal biomass: Residuals as the sole nitrogen source for culturing Scenedesmus acutus. **Bioresource Technology**, v. 184, p. 153–160, 2015.

GUTIÉRREZ-GAMBOA, G.; PÉREZ-ÁLVAREZ, E. P.; RUBIO-BRETÓN, P.; GARDE-CERDÁN, T. Changes on grape volatile composition through elicitation with methyl jasmonate, chitosan, and a yeast extract in Tempranillo (Vitis vinifera L.) grapevines. **Scientia Horticulturae**, v. 244, n. September 2018, p. 257–262, 2019.

HALASZ, A.; LASZTITY, R. Use of Yeast Biomass in Food Production. [s.l.] CRC Press Book, 1990.

HE, D.; LUO, W.; WANG, Z.; LV, P.; YUAN, Z. Combined use of GAP and AOX1 promoters and optimization of culture conditions to enhance expression of Rhizomucor miehei lipase. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 8, p. 1175–1182, 27 ago. 2015.

HELLBORG, L.; PIŠKUR, J. **7 – Yeast Diversity in the Brewing Industry**. [s.l.] Elsevier, 2009.

HINES, A. L.; MADDOX, R. N. Mass Transfer: Fundamentals and Applications. [s.l.] Prentice Hall, 1984.

HUIGE, N. J. Brewery By-Products and Effluents. Second Edi ed. [s.l.] CRC Press Book, 2006.

HUNT, I. From gene to protein : a review of new and enabling technologies for multi-parallel protein expression. v. 40, n. March, p. 1–22, 2005.

IDIRIS, A.; TOHDA, H.; KUMAGAI, H. Engineering of protein secretion in yeast : strategies and impact on protein production. p. 403–417, 2010.

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized Candida antarctica lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 550–563, 2012.

ISIDRO, I. A.; FERREIRA, A. R.; CLEMENTE, J. J.; CUNHA, A. E.; OLIVEIRA, R. Analysis of culture media screening data by projection to latent pathways: The case of Pichia pastoris X-33. **Journal of Biotechnology**, v. 217, p. 82–89, 2016.

JAHIC, M.; ROTTICCI-MULDER, J.; MARTINELLE, M.; HULT, K.; ENFORS, S.-O. Modeling of growth and energy metabolism of Pichia pastoris producing a fusion protein. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 24, n. 6, p. 385–393, 2002.

JAHIC, M.; GUSTAVSSON, M.; JANSEN, A. K.; MARTINELLE, M.; ENFORS, S. O. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in Pichia pastoris fed-batch processes. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 45–53, 2003.

JAHIC, M.; VEIDE, A.; CHAROENRAT, T.; TEERI, T.; ENFORS, S.-O. Process Technology for Production and Recovery of Heterologous Proteins with Pichia pastoris. **Biotechnology Progress**, v. 22, n. 6, p. 1465–1473, 1 dez. 2006.

JIN, Z.; NTWALI, J.; HAN, S.-Y. Y.; ZHENG, S.-P. P.; LIN, Y. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying Pichia pastoris whole-cells in a batch reactor. **Journal of Biotechnology**, v. 159, n. 1–2, p. 108–114, 31 maio 2012.

JOSEPH, B.; RAMTEKE, P. W.; THOMAS, G. Cold active microbial lipases: Some hot issues and recent developments. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 5, p. 457–470, 2008.

JUNGO, C.; URFER, J.; ZOCCHI, A.; MARISON, I.; VON STOCKAR, U. Optimisation of culture conditions with respect to biotin requirement for the production of recombinant avidin in Pichia pastoris. **Journal of Biotechnology**, v. 127, n. 4, p. 703–715, 2007.

KADO, H.; SHIBATA, T.; KOBAYASHI, F.; KUBOTA, M. Process for producing yeast extract - US006051212A, 2000.

KALUM, L. Method for producing a yeast extract - US9169474B2, 2015.

KANEGAE, Y.; SUGIYAMA, Y.; MINAMI, K. Method for producing yeast - US4810509, 1989.

KATTAN, O.; EBBERS, K.; KOOLAARD, A.; VOS, H.; BARGEMAN, G. Membrane contactors: An alternative for de-aeration of salt solutions? **Separation and Purification Technology**, v. 205, n. April, p. 231–240, 2018.

KHASA, Y. P.; KHUSHOO, A.; SRIVASTAVA, L.; MUKHERJEE, K. J. Kinetic studies of constitutive human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) expression in continuous culture of Pichia pastoris. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 12, p. 1903–1908, 30 out. 2007.

KIM, S.; WARBURTON, S.; BOLDOGH, I.; SVENSSON, C.; PON, L.; D'ANJOU, M.; STADHEIM, T. A.; CHOI, B. K. Regulation of alcohol oxidase 1 (AOX1) promoter and peroxisome biogenesis in different fermentation processes in Pichia pastoris. **Journal of Biotechnology**, v. 166, n. 4, p. 174–181, 2013.

KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from Candida antarctica: Unique biocatalysts from a unique origin. **Organic Process Research and Development**, v. 6, n. 4, p. 446–451, 2002.

KOBAYASHI, K.; KUWAE, S.; OHYA, T.; OHDA, T.; OHYAMA, M.; OHI, H.; TOMOMITSU, K.; OHMURA, T. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast Pichia pastoris with minimal protease production and activation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 89, n. 1, p. 55–61, 2000.

KONGJAN, P.; MIN, B.; ANGELIDAKI, I. Biohydrogen production from xylose at extreme thermophilic temperatures (70 8 C) by mixed culture fermentation. **Water Research**, v. 43, n. 5, p. 1414–1424, 2009.

KOVVALI, A. S.; SIRKAR, K. K. Membrane contactors: recent developments. [s.l.] Elsevier Masson SAS, 2003. v. 8

127

KRONEMBERGER, F. DE ARAUJO. **PRODUÇÃO DE RAMNOLIPÍDEOS POR PSEUDOMONAS AERUGINOSA PA1 EM BIORREATOR COM OXIGENAÇÃO POR CONTACTOR DE MEMBRANAS**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.

KURTZMAN, C. P. Biotechnological strains of Komagataella (Pichia) pastoris are Komagataella phaffii as determined from multigene sequence analysis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 11, p. 1435–1438, 17 nov. 2009.

LEE, H. J.; PARK, Y. G.; KIM, M. K.; LEE, S. H.; PARK, J. H. Study on CO 2 absorption performance of lab-scale ceramic hollow fiber membrane contactor by gas/liquid flow direction and module design. **Separation and Purification Technology**, v. 220, p. 189–196, 2019.

LI, K.; XU, L.; ZHANG, Y.; CAO, A.; WANG, Y.; HUANG, H.; WANG, J. A novel electro-catalytic membrane contactor for improving the efficiency of ozone on wastewater treatment. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 249, p. 316–321, 2019.

LI, L.; JI, F.; WANG, J.; LI, Y.; BAO, Y. Esterification degree of fructose laurate exerted by Candida antarctica lipase B in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 69, p. 46–53, 2015.

LI, Z.; WANG, D.; SHI, Y. C. Effects of nitrogen source on ethanol production in very high gravity fermentation of corn starch. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 70, p. 229–235, 2017.

LIDE, D. R. (ED.). Handbook of Chemistry and Physics. Student ed ed. [s.l.] CRC Press Book, 2005.

LIE, S. THE EBC-NINHYDRIN METHOD FOR DETERMINATION OF FREE ALPHA AMINO NITROGEN. v. 79, 1973.

LIN-CEREGHINO, G. P.; STARK, C. M.; KIM, D.; CHANG, J.; SHAHEEN, N.; POERWANTO, H.; AGARI, K.; MOUA, P.; LOW, L. K.; TRAN, N.; HUANG, A. D.; NATTESTAD, M.; OSHIRO, K. T.; CHANG, J. W.; CHAVAN, A.; TSAI, J. W.; LIN-CEREGHINO, J. The effect of α-mating factor secretion signal mutations on recombinant protein expression in Pichia pastoris. **Gene**, v. 519, n. 2, p. 311–317, 2013.

LIU, H.; TAN, X.; RUSSELL, K. A.; VEENHUIS, M.; CREGG, J. M. PER3, a Gene Requiered for Peroxisome Biogeenesis in Pichoia pastoris, encodes a perixomal membrane protein involved in protein import.pdf. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 18, p. 10940–10951, 1995.

LOOSER, V.; BRUHLMANN, B.; BUMBAK, F.; STENGER, C.; COSTA, M.; CAMATTARI, A.; FOTIADIS, D.; KOVAR, K. Cultivation strategies to enhance productivity of Pichia pastoris: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 6, p. 1177–1193, 2014.

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A Kinetic Study of the Lactic Acid Fermentation. Batch Process at Controlled pH. Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering, v. 1, n. 4, p. 393–412, 1959.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14 edição ed. [s.l.] Artmed, 2006.

MALAKHOV, A. O.; BAZHENOV, S. D.; VASILEVSKY, V. P.; BORISOV, I. L.; OVCHAROVA, A. A.; BILDYUKEVICH, A. V.; VOLKOV, V. V.; GIORNO, L.; VOLKOV, A. V. Thin-film composite hollow fiber membranes for ethylene/ethane separation in gas-liquid membrane contactor. **Separation and Purification Technology**, v. 219, p. 64–73, 2019.

MANOEL, E. A.; ROBERT, J. M.; PINTO, M. C. C.; MACHADO, A. C. O.; BESTETI, M. D.; COELHO, M. A. Z.; SIMAS, A. B. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PINTO, J. C.; FREIRE, D. M. G. Evaluation of the performance of differently immobilized recombinant lipase B from Candida antarctica preparations for the synthesis of pharmacological derivatives in organic media. **RSC Advances**, v. 6, n. 5, 2016.

MAQSOOD, M.; ABDUL, M. Yeast extract elicitation increases vinblastine and vincristine yield in protoplast derived tissues and plantlets in catharanthus roseus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, n. 5, p. 549–556, 2017.

MARTINELLE, M.; HOLMQUIST, M.; HULT, K. On the interfacial activation of

Candida antarctica lipase A and B as compared with Humicola lanuginosa lipase. **Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1258, p. 272–276, 1995.

MASSAHI, A.; ÇALIK, P. Endogenous signal peptides in recombinant protein production by Pichia pastoris: From in-silico analysis to fermentation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 408, p. 22–33, 2016.

MAURER, M.; KÜHLEITNER, M.; GASSER, B.; MATTANOVICH, D. Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with Pichia pastoris. **Microbial cell factories**, v. 5, p. 37, 2006.

MCLEOD, A.; JEFFERSON, B.; MCADAM, E. J. Toward gas-phase controlled mass transfer in micro-porous membrane contactors for recovery and concentration of dissolved methane in the gas phase. **Journal of Membrane Science**, v. 510, p. 466–471, 2016.

MENENDEZ, J.; VALDES, I.; CABRERA, N. The ICLI gene of Pichia pastoris, transcriptional regulation and use of its promoter. **Yeast**, v. 20, n. 13, p. 1097–1108, 2003.

MESSIAS, J. M.; COSTA, B. Z. DA; LIMA, V. M. G. DE; GIESE, C.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. D. M. Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213–234, 2011.

MINJIE, G.; ZHONGPING, S. Process control and optimization for heterologous protein production by methylotrophic pichia pastoris. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 2, p. 216–226, 2013.

MIRZAEI, M.; MIRDAMADI, S.; EHSANI, M. R.; AMINLARI, M.; HOSEINI, S. E. Characterization of Yeast Protein Enzymatic Hydrolysis and Autolysis in Saccharomyces cerevisiae and Kluyveromyces marxianus. **Journal of Food Biosciences and Technology**, v. 5, n. 2, p. 19–30, 2015.

MULDER, M. Basic Principles of Membrane Technology. [s.l.] Kluwer academic publishers, 1996.

MUSTACCHI, R.; HOHMANN, S.; NIELSEN, J. Yeast systems biology to unravel the network of life. n. c, p. 227–238, 2006.

NAGODAWITHANA, T. Yeast-derived flavors and flavor enhancers and their probable mode of action. **Food Technology**, v. 46, p. 138–144, 1992.

NASSAR, R. M. A.; SHANAN, N. T.; REDA, F. M. Active yeast extract counteracts the harmful effects of salinity stress on the growth of leucaena plant. **Scientia Horticulturae**, v. 201, p. 61–67, 2016.

ORIGANE, A.; SATO, T. Process for producing yeast extract - USOO5188852A, 1993.

PAN, L.; TIAN, Q.; WU, Y.; LONG, S.; YIN, J.; PIAO, X. Yeast extract could be used as a partial substitute for spray-dried porcine plasma in diets for weaned pigs. **Livestock Science**, v. 224, n. March, p. 20–25, 2019.

PANCRAZIO, G.; CUNHA, S. C.; DE PINHO, P. G.; LOUREIRO, M.; MEIRELES, S.; FERREIRA, I. M. P. L. V. O.; PINHO, O. Spent brewer's yeast extract as an ingredient in cooked hams. **Meat Science**, v. 121, p. 382–389, 2016.

PAPAGORA, C.; ROUKAS, T.; KOTZEKIDOU, P. Optimization of extracellular lipase production by Debaryomyces hansenii isolates from dry-salted olives using response surface methodology. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 4, p. 413–420, 2013.

PEREIRA CIPOLATTI, E.; COSTA, M.; PINTO, C.; DE, J.; ROBERT, M.; PIZONI DA SILVA, T.; DA COSTA BERALTO, T.; SANTOS, J. G. F.; DE, R.; VIEIRA DE CASTRO, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; MANOEL, E. A.; PINTO, J. C.; MARIA, D.; FREIRE, G.; MANOEL, E. A. Pilot-scale development of core-shell polymer supports for the immobilization of recombinant lipase B from Candida antarctica and their application in the production of ethyl esters from residual fatty acids. 2018.

PIETRO, S. S.; PIETRO, R. C. L. R. Enzimas como Agentes Biotecnologicos. [s.l.] Legis Summa, 2004.

PIRT, S. J. Maintenance energy: a general model for energy-limited and 131

energy-sufficient growth. Archives of Microbiology, v. 133, n. 4, p. 300–302, 1982.

PORTU, J.; LÓPEZ, R.; BAROJA, E.; SANTAMARÍA, P.; GARDE-CERDÁN, T. Improvement of grape and wine phenolic content by foliar application to grapevine of three different elicitors: methyl jasmonate, chitosan, and yeast extract. **Food Chemistry**, 2016.

POTVIN, G.; AHMAD, A.; ZHANG, Z. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in Pichia pastoris: A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 64, p. 91–105, 2012.

QUADROS BARSÉ, L.; GRAEBIN, N. G.; CIPOLATTI, E. P.; ROBERT, J. M.; CERQUEIRA PINTO, M. C.; CARLOS COSTA, J.; PINTO, S.; MARIA, D.; FREIRE, G.; RODRIGUES, R. C. Production and Optimization of Isopropyl Palmitate via Biocatalytic Route using Home-Made Enzymatic Catalysts. **Journal of chemical technology and biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 389–397, 2019.

RESINA, D.; COS, O.; FERRER, P.; VALERO, F. Developing high cell density fed-batch cultivation strategies for heterologous protein production in Pichia pastoris using the nitrogen source-regulated FLD1 promoter. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 91, n. 6, p. 760–767, 2005.

RIOS, N. S.; PINHEIRO, M. P.; DOS SANTOS, J. C. S.; DE S. FONSECA, T.; LIMA, L. D.; DE MATTOS, M. C.; FREIRE, D. M. G.; DA SILVA, I. J.; RODRÍGUEZ-AGUADO, E.; GONÇALVES, L. R. B. Strategies of covalent immobilization of a recombinant Candida antarctica lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution of (R,S)-Phenylethyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 246–258, 2016.

ROBERT, J. M.; LATTARI, F. S.; MACHADO, A. C.; DE CASTRO, A. M.; ALMEIDA, R. V.; TORRES, F. A. G.; VALERO, F.; FREIRE, D. M. G. Production of recombinant lipase B from Candida antarctica in Pichia pastoris under control of the promoter PGK using crude glycerol from biodiesel production as carbon source. **Biochemical Engineering Journal**, v. 118, p. 123–131, 2016. ROBY, M. H.; ALLOUCHE, A.; DAHDOU, L.; DE CASTRO, V. C.; ALVES DA SILVA, P. H.; TARGINO, B. N.; HUGUET, M.; PARIS, C.; CHRÉTIEN, F.; GUÉANT, R.-M.; DESOBRY, S.; OSTER, T.; HUMEAU, C. Enzymatic production of bioactive docosahexaenoic acid phenolic ester. **Food Chemistry**, v. 171, p. 397–404, 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos & otimização de processos. 3 edição ed. [s.l.] Cárita editora, 2014.

SAAD-ALLAH, K. M.; FETOUH, M. I.; ELHAAK, M. A. Induction of milk thistle (Silybum marianum L. Gaertn) growth and phytochemicals production by natural stimulants. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 6, p. 101–110, 2017.

SALIS, A.; SVENSSON, I.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V.; ADLERCREUTZ, P. The atypical lipase B from Candida antarctica is better adapted for organic media than the typical lipase from Thermomyces lanuginosa. v. 1646, p. 145– 151, 2003.

SEARS, I. B.; O'CONNOR, J.; ROSSANESE, O. W.; GLICK, B. S. A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in Pichia pastoris. **Yeast**, v. 14, n. 8, p. 783–790, 1998.

SEGEV, N.; MULHOLLAND, J.; BOTSTEIN, D. The yeast GTP-binding YPT1 protein and a mammalian counterpart are associated with the secretion machinery. **Cell**, v. 52, n. 6, p. 915–924, 1988.

SÉVERAC, E.; GALY, O.; TURON, F.; PANTEL, C. A.; CONDORET, J. S.; MONSAN, P.; MARTY, A. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 61–70, 2011.

SHAPIRO, J. A. Letting Escherichia coli Teach Me About Genome Engineering. v. 1992, n. December, p. 1205–1214, 2009.

SHEHATA, S. A.; FAWZY, Z. F.; EL-RAMADY, H. R. Response of Cucumber Plants to Foliar Application of Chitosan and Yeast under Greenhouse Conditions. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, 2012. SIMAS, A. B. C.; SILVA, A. A. T. DA; CUNHA, A. G.; ASSUMPÇÃO, R. S.; HOELZ, L. V. B.; NEVES, B. C.; GALVÃO, T. C.; ALMEIDA, R. V.; ALBUQUERQUE, M. G.; FREIRE, D. M. G.; DE ALENCASTRO, R. B. Kinetic resolution of (±)-1,2-O-isopropylidene-3,6-di-O-benzyl-myo-inositol by lipases: An experimental and theoretical study on the reaction of a key precursor of chiral inositols. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 70, n. 1–2, p. 32–40, 2011.

SOMBUTYANUCHIT, P.; SUPHANTHARIKA, M.; VERDUYN, C. Preparation of 5'-GMP-rich yeast extracts from spent brewer's yeast P. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 163–168, 2001.

STADLMAYR, G.; MECKLENBRÄUKER, A.; ROTHMÜLLER, M.; MAURER, M.; SAUER, M.; MATTANOVICH, D.; GASSER, B. Identification and characterisation of novel Pichia pastoris promoters for heterologous protein production. **Journal of Biotechnology**, v. 150, n. 4, p. 519–529, 2010.

SUN, Y.; PARK, I.; GUO, J.; WEAVER, A. C.; KIM, S. W. Impacts of low level aflatoxin in feed and the use of yeast cell wall based feed additive on growth and health of nursery pigs1. **Animal Nutrition**, 2015.

TABACCO, A.; MEIATTINI, F.; MODA, E.; TARLI, P. Simplified Enzymic / Colorimetric Serum Urea Nitrogen Determination Thymol Is a Suitable Preservative for Uric Acid Standards in the Uricase Technique CHEMISTRY, in the CK-BB Least-Squares Evaluation of Linearity More on the Detection of Serum CK-BB Acti. **Clinical chemistry**, v. 25, n. 2, p. 4–5, 1979.

TAHER, H.; AL-ZUHAIR, S.; AL-MARZOUQI, A. H.; HAIK, Y.; FARID, M. Enzymatic biodiesel production of microalgae lipids under supercritical carbon dioxide: Process optimization and integration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 90, p. 103–113, 2014.

TAMÁS, L.; SHEWRY, P. R. Heterologous expression and protein engineering of wheat gluten proteins. v. 43, p. 259–274, 2006.

TANAKA, Y.; NAKAJIMA, Y.; MAEDA, K.; MATSUYAMA, M.; KANAMARU, K.; KOBAYASHI, T.; OHSATO, S.; KIMURA, M. Inhibition of Fusarium

trichothecene biosynthesis by yeast extract components extractable with ethyl acetate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 289, n. March 2018, p. 24–29, 2019.

TRUPPO, M. D.; POLLARD, D. J.; MOORE, J. C.; DEVINE, P. N. Production of (S)-game-fluoroleucine ethyl ester by enzyme mediated dynamic kinetic resolution: Comparison of batch and fed batch stirred tank processes to a packed bed column reactor. **Chemical Engineering Science**, 2008.

TSCHOPP, J. F.; BRUST, P. F.; CREGG, J. M.; STILLMAN, C. A.; GINGERAS, T. R. Expression of the lacZ gene from two methanol-regulated promoters in Pichia pastoris. **Nucleic Acids Research**, v. 15, n. 9, p. 3859–3876, 1987.

UPPENBERG, J.; OEHRNER, N.; NORIN, M.; HULT, K.; KLEYWEGT, G. J.; PATKAR, S.; WAAGEN, V.; ANTHONSEN, T.; JONES, T. A. Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from Candida antarctica reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. **Biochemistry**, v. 34, n. 51, p. 16838–16851, dez. 1995.

VASSILEVA, A.; ARORA CHUGH, D.; SWAMINATHAN, S.; KHANNA, N. Effect of Copy Number on the Expression Levels of Hepatitis B Surface Antigen in the Methylotrophic Yeast Pichia pastoris. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 1, p. 71–80, fev. 2001.

VLADISAVLJEVIĆ, G. T. Use of polysulfone hollow fibers for bubbleless membrane oxygenation/deoxygenation of water. **Separation and Purification Technology**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 1999.

VOGEL, A. I. Análise química quantitativa. [s.l: s.n.].

WANG, X.; SUN, Y.; KE, F.; ZHAO, H.; LIU, T.; XU, L.; LIU, Y.; YAN, Y. Constitutive expression of Yarrowia lipolytica lipase LIP2 in Pichia pastoris using GAP as promoter. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 5, p. 1355–1367, 2012.

WELCH, M.; VILLALOBOS, A.; GUSTAFSSON, C.; MINSHULL, J. You ' re one in a googol : optimizing genes for protein expression. n. March, 2009.

WINSTON, H.; SIRKAR, K. Membrane Handbook. New York: Van Nostrand 135

Reinhold, 1992.

YAN, J.; LI, A.; XU, Y.; NGO, T. P. N.; PHUA, S.; LI, Z. Efficient production of biodiesel from waste grease: One-pot esterification and transesterification with tandem lipases. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 332–337, 2012.

YANG, J.-K.; LIU, L.-Y.; DAI, J.-H.; LI, Q. de novo design and synthesis of Candida antarctica lipase B gene and α -factor leads to high-level expression in Pichia pastoris. **PIoS one**, v. 8, n. 1, p. e53939, 2013.

YIN, J.; LI, G.; REN, X.; HERRLER, G. Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. v. 127, p. 335–347, 2007.

ZAREBSKA, A.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. The Application of Membrane Contactors for Ammonia Recovery from Pig Slurry. **Procedia Engineering**, v. 44, p. 1642–1645, 2012.

ZHANG, A. L.; LUO, J. X.; ZHANG, T. Y.; PAN, Y. W.; TAN, Y. H.; FU, C. Y.; TU, F. Z. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of Pichia pastoris. **Molecular Biology Reports**, v. 36, n. 6, p. 1611–1619, 2009.

ZHANG, R.; JIANG, Y.; ZHOU, L.; CHEN, Y.; WEN, C.; LIU, W.; ZHOU, Y. Effects of dietary yeast extract supplementation on growth, body composition, non-specific immunity, and antioxidant status of Chinese mitten crab (Eriocheir sinensis). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 86, n. August 2018, p. 1019–1025, 2019.

ZHANG, W.; INAN, M.; MEAGHER, M. M. Rational design and optimization of fed-batch and continuous fermentations. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 389, n. 1, p. 43–64, 2007.

ZHAO, W.; WANG, J.; DENG, R.; WANG, X. Scale-up fermentation of recombinant Candida rugosa lipase expressed in Pichia pastoris using the GAP promoter. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, n. 3, p. 189–195, 2008.

ZHENG, Q.; XU, X.; MARTIN, G. J. O.; KENTISH, S. E. Critical review of strategies for CO2 delivery to large-scale microalgae cultures. **Chinese Journal** 136

of Chemical Engineering, v. 26, n. 11, p. 2219–2228, 2018.

ZHONG, Y.; YANG, L.; GUO, Y.; FANG, F.; WANG, D.; LI, R.; JIANG, M.; KANG, W.; MA, J.; SUN, J.; XIAO, W. High-temperature cultivation of recombinant Pichia pastoris increases endoplasmic reticulum stress and decreases production of human interleukin-10. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, p. 1–10, 2014.

Anexo I

Artigos publicados

RSC Advances



View Article Online

View Journal | View Issue

PAPER



Cite this: RSC Adv., 2016, 6, 4043

Received 27th October 2015 Accepted 16th December 2015

DOI: 10.1039/c5ra22508f

www.rsc.org/advances

Evaluation of the performance of differently immobilized recombinant lipase B from *Candida antarctica* preparations for the synthesis of pharmacological derivatives in organic media[†]

Evelin A. Manoel,^{*ab} Julia M. Robert,^b Martina C. C. Pinto,^f Antonio C. O. Machado,^b Marina D. Besteti,^f Maria Alice Z. Coelho,^d Alessandro B. C. Simas,^c Roberto Fernandez-Lafuente,^{*e} Jose Carlos Pinto^f and Denise M. G. Freire^b

This paper shows the production of lipase B from Candida antarctica (LIPB) after cloning the gene that encoded it in Pichia pastoris using PGK as a constitutive promoter. The production of the lipase is lower using this strategy but it avoids the use of inducers like methanol. The performance of this enzyme was compared with that of the commercial enzyme (CALB) after immobilization on different supports in different reactions. As supports, we used Accurel 1000, and three core-shell supports (poly(methyl methacrylate) on the core and on the shell - PMMA/PMMA; poly(methyl methacrylate-codivinylbenzene) on the core and on the shell - PMMA-co-DVB/PMMA-co-DVB; and poly(styrene-codivinylbenzene) on the core and on the shell - PS-co-DVB/PS-co-DVB). The popular Novozym 435 was also utilized to assess the features of the new biocatalysts. All these supports adsorbed lipases via interfacial activation of the open form of the lipase on the hydrophobic surface of the supports. The studied reactions were esterification of oleic acid and ethanol in a solvent-free medium, resolution of (\pm) -1,3,5-O-benzyl-myo-inositol via acylation using vinyl acetate in hexane and resolution of (\pm) -1,2-Oisopropylidene-3,6-di-O-benzyl-myo-inositol via acylation using vinyl acetate (solvent free system). The results varied depending on the employed supports and on the studied reactions, but some general trends may be observed, pointing to better behavior of LIPB compared to CALB. The use of 4 different supports gave more strength to these differences, as it did not depend on a specific difference between a single support/enzyme pair, but it is more general. Thus, LIPB seems to have some advantages compared to the commercial enzyme on all the reactions assayed in this paper. PS-co-DVB/PS-co-DVB-LIPB is in general the most active preparation (even 50% higher activity was observed). Further investigations are in development to determine the structural reasons for these differences.

"Laboratório Integrado de Pesquisas em Biotecnologia, Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: eamanoel@pharma.ufrj.br

^bLaboratório de Biotecnologia Microbiana, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^dBiological System Engineering Group Laboratory, Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ra22508f

1. Introduction

Lipases are often used in biotechnology, currently accounting for around 5% of the global enzyme market. Lipase B from *Candida antarctica* (CALB) is one of the most widely used lipases in biocatalysis.^{1,2} It is highly regio- and enantioselective, and has been used in the synthesis of esters and enantioselective resolution of a wide amount of compounds, like amines, acids, and mainly alcohols.³⁻¹¹

Despite the great industrial importance of CALB – it is already sold in free and immobilized form¹² by different companies (*e.g.*, Novozym 435 from Novozymes¹³) – great effort is being put into finding other CALB biocatalysts that are even more efficient. The efforts devoted to improve this lipase utility in the industry should involve all the production of the biocatalysts, from improvements on enzyme production to improvements on immobilization process.

^cLaboratório Roderick Barnes, Instituto de Pesquisas e Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^eDepartment of Biocatalysis, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC, C/ Marie Curie 2, Cantoblanco, 28049, Madrid, Spain. E-mail: rfl@icp.csic.es

^fLaboratório de Engenharia de Polímeros/EngePol, Programa de Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

In this context, *Pichia pastoris* is one of the most widely used yeasts to express heterologous proteins because of its secretory capacity and ability to mass-produce industrial enzymes, including lipases.¹⁴ The production method for biomolecules secreted by *Pichia pastoris* must consider the promoter which the protein gene is linked to. The most studied promoter is AOX.^{14,15} In this case, the gene that is introduced needs to be induced by methanol and the induction step has to be preceded by a biomass growth phase. However, the different steps involved and the use of methanol make the scale-up process more complex and, in some cases, even unfeasible, depending on the product.

In order to overcome the barriers inherent to use the AOX promoter, constitutive expression promoters have been widely investigated, since it is possible to obtain a culture associated with growth without needing to add neither methanol nor any other inducer. The promoter of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (pGAP) is the most widely used constitutive expression promoter because it is involved in the glycolysis, which is well regulated.¹⁶ However, there are other constitutive promoters, like PGK (from the enzyme phosphoglycerate kinase I), whose regulation is also associated with the glycolytic pathway, and which has been little explored in the literature.^{17,18}

Another point to be considered to have a more fruitful design of the biocatalysts is the culture medium. Glycerin is a byproduct in the production of biodiesel, and has become almost a residue.¹⁹ Thus, currently there are many efforts to find uses to glycerin, and in the case of our proposal, it may be interesting to evaluate their use as carbon source in the production of this new recombinant CALB.

Once the enzyme has been produced in a soluble form in the culture medium, purification is required to ensure the reaction specificity by eliminating other esterases in the crude extract, and, in some cases, the immobilization process is needed. A proper immobilization protocol should facilitate the enzyme reusability and, in certain cases, its stability and efficiency.20-26 In an ideal situation, the coupling of immobilization and purification will save time and costs.27 In the case of lipases, this can be achieved by using hydrophobic supports to immobilize lipases at low ionic strength28 immobilization strategy that even greatly improves the enzyme stability.29 This immobilization technique involves the interfacial activation of the lipase versus the hydrophobic surface of the support,³⁰ and this is the main cause of the lipase stabilization and improved activity. In homogenous aqueous medium, the active center of the lipases is usually secluded from the reaction media by a polypeptide chain, called lid (closed form).³¹⁻³⁴ Depending on the external conditions, this lid may move exposing to the medium a large hydrophobic pocket, formed by the internal face of the lid and the areas surrounding the lipase active center. This form of the enzyme, called open form, allows its readily adsorption on any hydrophobic surface, such as oil droplets,35,36 hydrophobic supports,37 open forms of other lipase molecules (homogeneous or heterogeneous dimmers, which may be formed),38,39 other hydrophobic proteins.40

Therefore, as well as the above mentioned strategies, mastery of technologies for synthesizing tailor-made supports

could be great advantage point to obtain an even more efficient biocatalyst.⁴¹⁻⁴⁴ In this context, hydrophobic core–shell polymeric supports synthesized by a combined suspension and emulsion polymerization process have shown a great potential on lipases immobilization procedures.^{5,45-48} This technique has already been described in the literature.⁴⁵⁻⁴⁸ It involves two fundamental reaction steps. Firstly, a standard suspension polymerization process is carried out in order to produce the polymeric cores. Then, on a second step, the emulsion constituents are added to the reaction system, resulting in the synthesis of *in situ* nanoparticles. Therefore, these nanoparticles coagulate over the previously produced cores to form a porous shell, resulting in porous core–shell polymeric particles. The final morphology of the particles is affected by the reaction conditions and the compounds added in each step.⁴⁵⁻⁴⁸

The versatility of these supports may be used to tune enzyme properties and permit the design of these supports, allowing the development of new biocatalysts for specific reaction media.^{45–48}

Therefore, the aim of this study was to express recombinant lipase B from *Candida antarctica* (we will call this lipase as LIPB to distinguish this enzyme from the commercial CALB) in *Pichia pastoris* using PGK as a constitutive promoter.⁴⁹ In this work LIPB and CALB were also immobilized on the home-made core–shell polymeric particles, and the performance of the new biocatalysts was compared to that of the commercial one in kinetic resolutions of different pharmaceuticals using different strategies.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Solutions of free *Candida antarctica* lipase B (CALB) (19.11 mg protein per mL) and immobilized Novozyme 435® were kindly donated by Novozymes (Spain). Accurel MP 1000 was purchased from Membrane GmbH (Germany). Styrene (S – Nitriflex Resinas S/A, minimum purity of 99.9 wt%), methyl methacrylate (MMA – Aldrich, minimum purity of 99.9) and the crosslinking agent, divinylbenzene (DVB – Aldrich, minimum purity of 99 wt%), were employed in the polymerization reactions. (\pm)-1,3,4-Tri-*O*-benzyl-*myo*-inositol (DL-1) and (\pm)-1,2-*O*-isopropylidene-3,6-di-*O*-benzyl-*myo*-inositol (DL-2) were obtained from Laboratory Roderick Barnes, UFRJ, RJ, Brazil. Bradford's reagent was obtained from BIO-RAD. All other reagents and solvents were of analytical grade.

2.2. Methods

All the experiments were performed in triplicate (n = 3) and the values that are shown correspond to their means associated with their corresponding standard deviation.

2.2.1. Recombinant strain of *Pichia pastoris*. The X-33 wild strain of *Pichia pastoris* was transformed previously by inserting a constitutive expression vector pPGK Δ 3_PRO_LIPB, constructed from a synthetic gene of *Candida antarctica* lipase B (sequencing LIPB). The cells of transformed *P. pastoris* were grown in a medium composed of 1% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) peptone and 2% (w/v) glycerol (YPG), stored in 25% glycerol at -80 °C.⁴⁹

2.2.2. Production of LIPB expressed in *P. pastoris.* The cells were reactivated on the same aforementioned media (see Section 2.2.1) in Erlenmeyer flasks with 200 mL volume, incubated at 30 °C, stirred at 200 rpm, for 20 h. The inoculum on the bioreactor (New Brunswick Scientific – Bioflo 310) was made using 1 g L⁻¹ of biomass, the used vase present 3 L of working volume. The cultivation medium contained: 2.0 g L^{-1} citric acid, 12.4 g L^{-1} (NH₄)₂HPO₄, 0.022 g CaCl₂·2H₂O, 0.9 g L⁻¹ KCl, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 100 g L⁻¹ glycerol, and 4.6 mL L⁻¹ PTM1 trace salts stock solution. PTM1 solution contained: 6.0 g L^{-1} CuSO₄·5H₂O, 0.08 g L⁻¹ NaI, 3.0 g L^{-1} MnSO₄·H₂O, 0.2 g L⁻¹ ZnCl₂, 65.0 g L^{-1} FeSO₄·7H₂O, 0.2 g L⁻¹ biotin, and 5.0 mL H₂SO₄ per L solution (95–98%).⁵⁰ The pH was set to 7.0 with 5% H₂SO₄ and 20% NH₄OH.

The temperature, pH, and dissolved oxygen (DO) were controlled throughout the whole cultivation period. Oxygenation was controlled in order to maintain dissolved oxygen saturation at 30%. A cascade control was used, with a stirrer range from 250 to 700 rpm and gas flow of $0-3 \text{ L min}^{-1}$.

Nitrogen, glycerol, protein, cell concentration, and lipase activity were analyzed periodically.

2.2.3. Nitrogen determination. The methodology was adapted from Fawcett and Scott⁵¹ and Tabacco and collaborators. 52

2.2.4. Glycerol determination. Glycerol was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC, Agilent Technologies) equipped with an HPX-87H column (BioRad – 300 mm × 7.8 mm). The temperature was maintained at 65 °C and a 0.005 M solution of sulfuric acid at 0.6 mL min⁻¹ was used as the mobile phase. The sample volume was 20 μ L using IR (Refractive Index) as detector.

2.2.5. Determination of protein. The methodology described by Bradford⁵³ was used.

2.2.6. Determination of cell concentration. Cell concentration was determined in a spectrophotometer (600 nm). The correlation factor between cell absorbance and its concentration was 0.411 g L^{-1} .

2.2.7. Lipase activity

2.2.7.1. Determination of lipase hydrolytic activity using *p*-*NPL*. Hydrolytic activity was monitored spectrophotometrically at 412 nm using 0.25 mM *p*-nitrophenyl laurate (*p*-NPL) in 25 mM sodium phosphate/5% (v/v) DMSO/5% acetonitrile (v/v) at pH 7.0 and 30 °C as described by Cunha *et al.*⁵ For the soluble samples, the reaction was conducted using 0.05 mL of a lipase solution in 2.45 mL a substrate solution.

For immobilized lipases, the reaction was started by the addition of 0.1 g of immobilized enzyme in 9 mL substrate solution in a flask. Periodically samples of 1 mL of the reaction were filtered and the absorbance was determined at 412 nm.

One activity unit (U) was defined as the amount of enzyme necessary to hydrolyze 1 μ mol of *p*-NPL per minute under assay conditions. Enzymatic activity was determined as the average of triplicates.

2.2.7.2. Determination of lipase hydrolytic activity using tributyrin. The hydrolysis of 100 mM tributyrin was performed at 40 $^{\circ}$ C and pH 7 using a pHstat and a 40 mM NaOH solution was employed as titrating reagent. One unit of lipase activity (U) is defined as the quantity of enzyme necessary to catalyze the production of 1 μ mol of butyric acid (supernatant analysis) per minute under the assay conditions.

2.2.7.3. Determination of esterification activity of the immobilized lipase. The esterification activity of the immobilized enzyme was determined as the initial rate in esterification reactions between oleic acid and ethanol at a molar ratio of 1:1 at 40 °C using a pHstat, with 5 wt% of enzyme in relation to the substrates followed by Cunha *et al.*^{5,63} After the addition of the enzyme to the substrates, the mixture of oleic acid and ethanol were collected on different times and stopped with acetone : ethanol (1:1). The remainder oleic acid content was determined by titration with 0.03 M NaOH. One lipase activity unit (U) was defined as the amount of enzyme necessary to consume 1 µmol of oleic acid per minute.

2.2.8. Preparation of core-shell polymeric supports. As previously mentioned, core-shell polymeric supports were synthesized through a combined suspension/emulsion polymerization process. The reactions were carried out in an open 1 L jacketed glass reactor at 85 °C. Three different supports were produced: core-shell particles based on a copolymer of styrene and divinylbenzene (which corresponded to 25% wt of the monomer mixture) on both core and shell; core-shell particles formed by a copolymer of methyl methacrylate and divinylbenzene (which also corresponded to 25% wt of the monomer mixture) on the core and the shell; core-shell particles based on an homopolymer of methyl methacrylate on the core and the shell.^{5,45} Styrene/divinylbenzene supports have been described as very useful supports for lipase immobilization.^{5,54-56}

Initially, the core particles were formed through standard batch suspension polymerization by dispersing the monomer mixture, containing benzoyl peroxide as an initiator, in an aqueous solution (containing poly(vinyl alcohol) as a stabilizer) under agitation (kept at 950 rpm in all experiments). After two hours of suspension reaction, the emulsion constituents (monomer mixture and aqueous solutions of potassium persulfate, used as an initiator, and lauryl sulfate, used as an emulsifier) were added to the reaction medium. In order to control the reaction temperature, the monomer mixture was added continuously at 0.04 L h⁻¹. After the end of the semibatch emulsion step, reaction was conducted for two hours to favor the coverage of the core particles. At the end of each experiment, the reactor was cooled down and the particles were filtered, washed several times with distilled water, and dried.^{5,45,48} It is possible to observe the reaction scheme on Fig. 1. It is important to mention that, depending on the supports composition, specific functional groups may be found on the particles surface. Divinylbenzene and styrene based particles contain phenyl groups on their surfaces.57 On the other hand, methyl methacrylate compounds show ester groups, as functional groups, on their surfaces.58 No covalent reaction may be expected, but different interactions are expected to exist between the polymeric particles and the studied enzymes.

2.2.9. Characterization of core-shell supports. The morphological properties of the supports (specific area, average pore size) were determined by nitrogen physisorption using



Fig. 1 Scheme of the combined suspension–emulsion polymerization reaction.

a Micromeritics analyzer (model ASAP 2000) applying the standard BET model. Each sample was treated at 60 $^{\circ}$ C. It is important to mention that the morphology of the core-shell polymeric particles was shown in a previous study.⁵

The features of the synthesized particles are shown in Table 1. The commercial support Accurel MP 1000 (polypropylene) was also used due to the successful performance of this support in lipase immobilization.^{30,59–61}

2.2.10. Immobilization of lipases on commercial and coreshell supports. One gram of Accurel MP 1000 or the core-shell supports – PS-*co*-DVB/PS-*co*-DVB (styrene copolymerized with divinylbenzene on core and shell), PMMA/PMMA (poly(methyl methacrylate) on core and shell) and PMMA-*co*-DVB/PMMA-*co*-DVB (methyl methacrylate copolymerized with divinylbenzene on core and shell) – were added to the corresponding volume of a solution of CALB (commercial lipase) or LIPB (recombinant lipase) in 5 mM sodium phosphate at pH 7 and 25 °C. In order to study the maximum loading capacity of each core-shell support, different units of activity were added to each solution (50, 200, 350 and 700 U of *p*-NPL hydrolytic activity), as shown in ESI section.†

The activity of the supernatant and suspension was monitored using p-NPL. Immobilization was considered to be complete when no significant changes in the activity of the supernatant were detected after 24 h. After immobilization, the

 $\label{eq:constraint} \begin{array}{ll} \textbf{Table 1} & \textbf{Morphological properties of the supports}^{\alpha} \mbox{ employed in CALB} \\ \textbf{and LIPB immobilization} \end{array}$

Supports	Surface area $(m^2 g^{-1})$	Average pore size (Å)
Accurel MP 1000	39.0	230.0
PS-co-DVB/PS-co-DVB ^b	28.9	190.4
PMMA-co-DVB/PMMA-co-DVB ^c	12.6	193.4
$PMMA/PMMA^d$	5.0	211.6

^{*a*} These results were shown in Cunha *et al.*^{5 *b*} This is a polymer support based on a copolymer of styrene and divinylbenzene in the core and the shell. ^{*c*} This is a polymer support based on a copolymer of methyl methacrylate and divinylbenzene in the core and the shell. ^{*d*} This is a polymer support based on an homopolymer of methyl methacrylate in the core and the shell, respectively, with 2 hours of suspension.⁵ suspension was filtered and the supported enzyme was washed several times with distilled water.

2.2.11. Resolution of racemic *myo***-inositol derivatives.** The enzymatic reactions were conducted in closed reactors with thermostats under the optimal reaction conditions for each substrate previously described:

(±)-1,3,5-O-Benzyl-*myo*-inositol (DL-1): 8 mg substrate dissolved in 2.0 mL vinyl acetate in hexane (1 : 5.5) and 222.8 U of biocatalyst (80 mg) at 45 °C, during 8 h of reaction time for the core–shell derivatives and Novozyme 435, and 8 h of reaction time (immobilized LIPB and Novozym 435) or 12 h (lyophilized LIPB, solution commercial CALB and immobilized CALB).⁶²

(\pm)-1,2-*O*-Isopropylidene-3,6-di-*O*-benzyl-*myo*-inositol (DL-2): 10 mg substrate dissolved in 2.0 mL vinyl acetate (solvent-free medium) at 45 °C and 71 U of biocatalyst (26 mg) using *p*-NPL; when immobilized LIPB and Novozyme 435 were employed, the reactions occurred for 8 h; when lyophilized LIPB, solution commercial CALB and immobilized CALB were used, the reactions occurred for 13 h.⁶³

The reactions were halted by removing the biocatalyst from the reaction medium, and the solvent was evaporated in a vacuum concentrator (Speed Vac Concentrator – Savant SPD 1010-Thermo Scientific). The samples were resolubilized in 1 mL of the mobile phase acetonitrile : H_2O (60 : 40) for the reverse-phase chiral HPLC analysis. The conversion rate and enantiomeric excess of the DL-1 and DL-2 derivatives were calculated as described in ref. 62 and 63, respectively.

2.2.12. Operational stability in the acetylation reactions of the biocatalysts using a single-stage batch system. After each reaction (8 h reaction time: immobilized LIPB and Novozym 435 and 12 h reaction time: lyophilized LIPB, solution commercial CALB and immobilized CALB), the experiment was halted and the reaction medium was centrifuged. The liquid phase was removed and analyzed by HPLC to determine the conversion rate and enantiomeric excess, while the biocatalyst was washed with ethyl acetate to remove any product and substrate from the previous reaction. Then, the lipase was put through the next reaction. In each run a 100 μ L sample was taken to analyze remaining hydrolytic activity. The biocatalyst was reused 12-fold in a batch system.

3. Results and discussion

3.1. Production of lipase B from *C. antarctica* (LIPB) in *P. pastoris*

After the improvements reported in the work of Maurer and collaborators,⁵⁰ the condition of 100 g L⁻¹ of glycerol as carbon source was chosen as the best condition for this study. Fig. 2 represents the growth of the yeast *Pichia pastoris* in a conventional batch system at 30 °C, pH 7.0, 30% oxygen saturation, and 100 g L⁻¹ of glycerol.

It is noteworthy that the production of the lipase is associated with the growth of the biomass as expected since the lipase gene is combined with a constitutive promoter. The lag phase ends after 18 h and the glycerol ends at 42 h. The nitrogen is kept stable during the whole process, indicating that this is not a limiting growth factor.



Fig. 2 Kinect of biomass growth, lipase production using *p*-NFL as substrate and consumption of glycerol and nitrogen on a batch with minimum media using 100 g L^{-1} of glycerol at 30 °C, pH 7.0 and cascade varying aeration (0–3 L min⁻¹) and stirrer (250–700 rotation per minute – rpm) to control DO at 30%.

In Table 2, the main parameters used to evaluate the efficiency of the batch and production at the end of fermentation are shown.

Lipase production utilizing the aforementioned promoter is not as high as the one achieved employing the most strong promoter usually employed on papers (pAOX), it is 3.5 fold lower when compared with the work made by Vadhana and collaborators.⁶⁴ However, the advantage of using a constitutive promoter (PGK) rather than an inducible promoter (pAOX) may compensate this lower lipase production. It must be considered that in large scale the storing and the use of methanol may promote some difficulties.⁶⁵

Candida antarctica lipase B was produced successfully in *Pichia pastoris* using a PGK constitutive promoter, but better production strategies (fed-batch and continuous) and genetic engineering (heterologous constructions with multiple copies of the synthetic gene) are being studied aiming to increase the productivity of the process to make it competitive compared to inductive expression.

After 42 h of growth, the cells were removed by centrifugation and the supernatant containing the enzyme (13 903 $U_t L^{-1}$, volumetric activity) was lyophilized for further immobilization experiments.

3.2. Studies into the immobilization of CALB and LIPB on core-shell supports and Accurel MP 1000

The loading capacity of the different supports using LIPB and CALB was studied (see on ESI: Table 1S and Fig. 1S to 8S[†]).

Table 2 Kinetic parameters of the growth of *Pichia pastoris* yeast transformed with pPGK Δ 3_PRO_LIPB and main parameters of lipase production using tributyrin as substrate at 42 h

Fermentation time (h)	42
Y _{x/s}	0.44 ± 0.09
$Y_{\rm p/s}$	314 ± 51
$Qp (U g^{-1} h^{-1})$	7.15 ± 1.17
Activity (U L^{-1})	$13~903\pm609$
Specific activity (U mg $^{-1}$)	55 ± 3

Under low enzymatic loading, almost all protein (and activity) becomes adsorbed on all the supports (more than 90-95%). When the amount of protein increased, and around 60 mg of enzyme are added to one gram of support, the obtained results varied, depending on the enzyme and the support. Using Accurel, 75% of the enzyme activity were adsorbed after 24 h, while only 40% of the protein were adsorbed, using both LIPB and CALB, indicating that some purification of the enzyme is being achieved. Comparing PS-co-DVB/PS-co-DVB-LIPB and Accurel-LIPB, the immobilization process is slightly higher both in protein and activity basis, while using CALB the enzymatic activity decrease to 60% and the protein remains similar. Comparing PMMA-co-DVB/PMMA-co-DVB-LIPB and PS-co-DVB/PS-co-DVB-LIPB the obtained results are quite similar using LIPB while using CALB the immobilization yield dropped to less of 45%, with a lower decrease in protein adsorption. Analyzing the obtained results for CALB in protein bases, it is observed that employing an excess of enzyme the amount of immobilized enzyme is similar using Accurel and PS-co-DVB/PS-co-DVB, but not for PMMA-co-DVB/PMMA-co-DVB that have significantly lower specific area. It is important to point that for all four supports, the pores are wide enough for the adsorption of small CALB onto the internal part of the shell. However, the contaminants may be expected to be different for both lipases extracts (and that may justify the different behavior when overloading the support, even when the target protein should behave in a very similar way). Considering CALB solution, a large contaminant protein, which is absent on LIPB preparation, could close the pores of the particles.²² Thus, the loaded preparations of LIPB presented some more enzyme than that of CALB, maximizing the difference using, for example, PMMA-co-DVB/PMMA-co-DVB (500 units per g using LIPB but 300 using CALB) and minimizing the differences using Accurel (525 units per g using LIPB, 514 using CALB). We decided to compare all the preparations to ensure that the differences between the enzymes are due to the enzyme and not to some artifact caused by a better immobilization of one enzyme in one specific support, taking advantage of the differences in the surface morphology and hydrophobicity of the 4 supports.66

3.3. Esterification activity of the core-shell derivatives

The biocatalysts produced in this study were evaluated as catalysts in oleic acid and ethanol esterification reactions in solvent-free medium. Table 3 shows the results comparing the 4 biocatalysts of LIPB, the ones from CALB and the commercial Novozym 435, a biocatalyst recognized as one of the most efficient ones. PS-*co*-DVB/PS-*co*-DVB-LIPB has the highest activity, similar to Novozym 435. Accurel and PMMA-*co*-DVB/PMMA-*co*-DVB produced LIPB biocatalyst quite less active in this reaction, even though both of them have similar enzyme loading. PMMA/PMMA-LIPB was the least active one. CALB immobilized on all supports was less active than the corresponding counterparts of LIPB. Differences were maximal using PS-*co*-DVB/PS-*co*-DVB (almost 3 folds) and minimal using PMMA/PMMA (just a 5%), suggesting strong modulation of the

 Table 3
 Esterification activity of LIPB and CALB immobilized on different polymeric supports

Supports	Esterification activity (U $g_{support}^{-1}$)
LIPB	
Accurel MP 1000	$1.97\ 000\pm 220$
PS-co-DVB/PS-co-DVB	$2.95\ 800 \pm 109$
PMMA-co-DVB/PMMA-co-DVB	$1.75\ 500\pm 170$
PMMA/PMMA	$1.35\;500\pm 170$
Novozyme 435	$2.72\;800\pm 339$
CALB	
Accurel MP 1000	$1.77\ 000 \pm 150$
PS-co-DVB/PS-co-DVB	$1.01\ 800\ \pm\ 109$
PMMA-co-DVB/PMMA-co-DVB	$1.81\ 500 \pm 105$
PMMA/PMMA	$1.29\ 800\ \pm\ 105$
Novozyme 435	$2.72\ 800\pm 339$

differences between the two enzymes with the support. The most active preparation using CALB was Novozym 435, but even this preparation was less active than PS-*co*-DVB/PS-*co*-DVB-LIPB (just by a 8%).

3.4. Kinetic resolution of DL-1 using recombinant LIPB immobilized on different supports

The kinetic resolution of DL-1 (Fig. 3) was studied using batch systems employing both enzymes in different forms: lyophilized, immobilized on Accurel and on the core–shell supports and Novozyme 435, used as reference (a biocatalyst that has been previously successfully employed in this reaction).^{63,67} The reaction conditions were determined based on the best condition found in the optimization of the reaction using Novozym 435,⁵⁵ which were 45 °C, 4 mg mL⁻¹ of substrate, and 222.8 U of enzyme, with hexane as a solvent. The reactions were halted when the yield reached 50% (8 h (see ref. 67) or 12 h, depending on the catalyst). Table 4 resumes main results.

All catalysts were capable of catalyzing the acetylation of DL-1 to obtain the product L-(–)-2 with high ee_p (99%), and a high enantiospecificity (E > 200). The main difference was in the initial activity.

Analyzing the group of the produced biocatalysts in which CALB was employed, the highest activity is obtained using the commercial biocatalyst. The lyophilized enzyme is the least active form of the lipase, as may be expected because it will be forming aggregates, except PMMA/PMMA-CALB that was significantly less active the other home-made preparations. All the other preparations offered very close activity, even though the enzyme loading was higher for Accurel and minimal for PS-*co*-DVB/PS-*co*-DVB.

The lyophilized LIPB is even less active than CALB, however this behavior is a result of many factors, as the commercial preparation may have different components compared with the home-made lipase. Except PMMA/PMMA-LIPB, all immobilized preparations were found to be slightly more active (25%) than the commercial Novozym 435. All the home-made preparations counterparts prepared using LIPB were more active than using CALB, in some cases by more than 50% (*e.g.*, 65% using PMMA/ PMMA). Using Accurel or PS-*co*-DVB/PS-*co*-DVB, where the enzyme loadings are similar using both enzymes, the improvement in activity of this recombinant enzyme compared to the commercial one is 50%. Curiously, using PMMA-*co*-DVB/ PMMA-*co*-DVB, the differences in activity almost matched the differences in loading.

3.5. Kinetic resolution of DL-2 using recombinant LIPB and CALB immobilized on different supports

Next, the kinetic resolution of DL-2 (Fig. 4) was analyzed using batch systems with the same formulations of Section 3.4. The reaction conditions were the ones optimized during the experimental design for DL-2 and Novozym 435,⁶³ which were 45 °C, 5 mg mL⁻¹ of substrate (using vinyl acetate as acylating agent, solvent free medium), 26 mg of biocatalyst. Table 5 shows the most relevant results.

Again, E and ee_p were very high for all catalysts but there were clear differences in activity.

The lyophilized preparations of both enzymes have similar activities and are the lowest ones, as mentioned before, because the use of an aggregated enzyme may offer complex results and difficult the understanding, although it is possible to assume the existence of diffusional problems. CALB offered the highest activity using the commercial preparation, shortly followed by the home-made preparations, except for PMMA/PMMA-CALB that was less than 50% active. Again, the activity of CALB immobilized on PMMA-*co*-DVB/PMMA-*co*-DVB was higher than should be expected from the low loading of the enzyme in the support, almost matching the activity of the other home-made preparations when the loading was almost 60% of that of the other preparations.

The use of the biocatalysts from LIPB provided higher activities than using CALB, the difference in activity is more



Fig. 3 Schematic diagram of the enantioselective reaction of DL-1 catalyzed by lipase biocatalyst. The reaction condition was: 8 mg substrate dissolved in 2.0 mL vinyl acetate in hexane (1 : 5.5), 222.8 U of biocatalyst at 45 °C, with 8 h reaction time for the core-shell derivatives and Novozyme 435, and 8 h of reaction time (immobilized LIPB and Novozym 435) or 12 h (lyophilized LIPB, solution commercial CALB and immobilized CALB).

Table 4 Results of racemic resolution of DL-1 with CALB and LIPB immobilized on different supports

Commercial lipase	X (%)	eep	E	Initial velocity (µmol min ⁻¹ g ⁻¹) \times 10 ²
Lyophilized CALB	$20^b\pm 0.1$	99	>200	3.30
CALB immobilized on Accurel MP 1000	$40.6^b\pm0.2$	99	>200	6.71
CALB immobilized on PS-co-DVB/PS-co-DVB	$42.0^b\pm0.1$	99	>200	6.94
CALB immobilized on PMMA-co-DVB/PMMA-co-DVB	$40.0^b\pm0.2$	99	>200	6.61
CALB immobilized on PMMA/PMMA	$31.0^b\pm0.5$	99	>200	3.21
Novozyme 435	$49.7^a\pm0.1$	99	>200	8.21
Recombinant lipase	X (%)	eep	Ε	Initial velocity (µmol min ⁻¹ g ⁻¹) \times 10 ²
Lyophilized LIPB	$3.0^b\pm 0.5$	99	>200	0.74
LIPB immobilized on Accurel MP 1000	$41.0^a\pm0.5$	99	>200	10.16
LIPB immobilized on PS-co-DVB/PS-co-DVB	$47.5^a\pm0.1$	99	>200	11.77
LIPB immobilized on PMMA-co-DVB/PMMA-co-DVB	$41.2^a\pm0.1$	99	>200	10.21
LIPB immobilized on PMMA/PMMA	$36.2^a\pm 0.1$	99	>200	5.30

^a Batch conditions: 45 °C; 4 mg mL⁻¹ of substrate; 222.8 U of enzyme; 8 h. Hexane as solvent. ^b 12 h reaction time.



Fig. 4 Schematic diagram of the enantioselective reaction of DL-2 catalyzed by commercial CALB and home-made LIPB immobilized on different supports. The condition was: 10 mg substrate dissolved in 2.0 mL vinyl acetate (solvent-free medium) at 45 °C and 71 U of biocatalyst.

Table 5 Results of the enantioselective resolution of DL-2 for the different versions of Candida antarctica lipase B

CALB (commercial)	X (%)	eep	Ε	Initial velocity (µmol min^{-1} g^{-1}) $\times ~10^2$
Lyophilized CALB	$28.0^b\pm0.8$	99	>200	4.93
CALB immobilized on Accurel MP 1000	$40.8^b\pm0.1$	99	>200	7.18
CALB immobilized on PS-co-DVB/PS-co-DVB	$45.3^a\pm0.5$	99	>200	7.97
CALB immobilized on PMMA-co-DVB/PMMA-co-DVB	$43.3^a\pm 0.2$	99	>200	7.62
CALB immobilized on PMMA/PMMA	$33.0^b\pm0.5$	99	>200	4.21
Novozyme 435	$49.0^a\pm0.1$	99	>200	8.62
Recombinant lipase	X (%)	eep	Ε	Initial velocity (µmol min^{-1} g^{-1}) $\times ~10^2$
Lyophilized LIPB	$18.0^b\pm0.8$	99	>200	4.75
LIPB immobilized on Accurel MP 1000	$48.0^a\pm0.5$	99	>200	12.67
LIPB immobilized on PS-co-DVB/PS-co-DVB	$49.3^a\pm0.5$	99	>200	13.01
LIPB immobilized on PMMA-co-DVB/PMMA-co-DVB	$48.6^a\pm 0.2$	99	>200	12.83
LIPB immobilized on PMMA/PMMA	$36.0^b\pm0.5$	99	>200	5.88

^{*a*} Batch conditions: 45 °C; 5 mg mL⁻¹ of substrate; 71 U of enzyme; 8 h reaction time; solvent-free reaction; vinyl acetate as acylating agent and solvent. ^{*b*} Batch conditions: 45 °C; 5 mg mL⁻¹ of substrate; 71 U of enzyme; 13 h reaction time; solvent-free reaction; vinyl acetate as acylating agent and solvent.

than 50% for all preparations, and the activity comparing with Novozym 435 is more than 50% in the case of PS-*co*-DVB/PS-*co*-DVB-LIPB. Again in the case of PMMA-*co*-DVB/PMMA-*co*-DVB, the difference in activity almost matches the difference in loading, suggesting a similar specific activity of the enzyme when immobilized on these support.

The immobilized LIPB proved more efficient in the enantioselective resolution of DL-2 than the derivatives from commercial CALB, including Novozyme 435, since it achieved maximum conversion in a shorter time (8 h). The higher conversion of DL-2 than of DL-1 could be due to the fact that the structure of DL-2 is less sterically hindered than the structure of DL-1 (in this case, the presence of benzyl groups could have hampered the interaction between the substrate and the biocatalyst).

The product, L-5, obtained from Novozyme 435 and LIPB in PS-co-DVB (core and shell) was found to have very high enantiomeric excess (ee_p of 99%) and high enantiomeric ratio (E).

These data gave an improvement of a 50% of the productivity (considering the whole reaction cycle) using PS-co-DVB-LIPB instead of Novozym 435 using DL-2 as substrate (0.060 $mg_{product} g_{derivative}^{-1} h^{-1}$).

3.6. Reuse of the biocatalyst

Reuse studies were conducted on the recombinant LIPB immobilized on Accurel MP 1000, PS-co-DVB/PS-co-DVB, PMMA-co-DVB/PMMA-co-DVB and PMMA-PMMA and compared with commercial biocatalyst Novozyme 435, for the kinetic resolution of DL-2. The reactions were run for 4 days under the following optimized conditions: 5 mg mL^{-1} of substrate and 26 mg derivative, 8 h reaction time, solvent-free reaction, vinyl acetate was simultaneously acylating agent and solvent.

After 12 reaction cycles (considering an 8 h reaction) no significant loss in the conversion of DL-2 was found when the recombinant LIPB derivative immobilized on PS-co-DVB was used throughout all the cycles conducted. The other derivatives suffered a slight decrease in conversion after the 7th reaction cycle, including Novozym 435 (Fig. 5).

All preparations could be stored at 4-30 °C for 60 days and keeping more than 95% of the initial activity.

Conclusion 4.

The recombinant lipase B from Candida antarctica (LIPB) expressed in Pichia pastoris using the constitutive promoter PGK has proved to be a very useful alternative to the commercial CALB in certain cases. The production of ethyl oleate is slightly lower for the new enzyme. However, in the resolution of DL-1 and DL-2 via transesterification (using different media), LIPB immobilized in Accurel or PS-co-DVB/PS-co-DVB presented more activity per enzyme molecule than CALB immobilized in similar supports, while when immobilized in PMMA-co-DVB/ PMMA-co-DVB the activity of both enzymes were similar.

The recombinant LIPB immobilized on PS-co-DVB proved to be the most efficient in the enantioselective resolution of both racemic derivatives, DL-1 and DL-2. The productivity for DL-2 resolution was 50% higher than the commercial Novozym 435, and the new derivative was operationally more stable than Novozyme 435. The products obtained had a high level of purity (ee of 99% for both derivatives). Both products of the enantioselective reaction, L-2 and L-5, obtained from the racemic derivatives (DL-1 and DL-2, respectively), are intermediates from different pharmacological pathways involved in the synthesis of building blocks for drugs that inhibit the etiological agent of Chagas disease, Trypanosoma cruzi. These results constitute a successful, novel approach for simultaneously evaluating new technologies for producing, immobilizing and using Candida antarctica lipase B.

The better enzyme performance on these reactions has encouraged our group to analyze the differences between LIPB and CALB. At first glance, the expression of the enzyme in Pichia may gave a more glycosylated protein, but preliminary results suggest a less compact structure of the new enzyme; the full characterization of this enzyme is under study and will be the subject of a forthcoming paper.

• The results shown in this paper are protected by the Brazilian patent application number US 20110183400 A1.49

Acknowledgements

The authors thank CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) for the scholarships and the financial support. R. Fernandez-Lafuente thanks MINECO of Spanish Government, by the grant CTQ2013-41507-R and CNPq (PVE 301139/2014-8). The help and suggestions during the writing of the paper by Dr Ángel Berenguer are gratefully recognized (Universidad de Alicante).

References

- 1 E. M. Anderson, K. M. Larsson and O. Kirk, Biocatal. Biotransform., 1998, 16, 181.
- 2 V. Gotor-Fernández, E. Busto and V. Gotor, Adv. Synth. Catal., 2006, 348, 797.





Fig. 5 Operational stability in the kinetic resolution of DL-2 using

different derivatives under the following conditions: 5 mg mL⁻¹ of

substrate; 71 U of enzyme; at 45 °C; reaction time of 8 hours in a batch

system. LIPB on PS-co-DVB (core and shell)-square; LIPB on PMMAco-DVB (core and shell)-circle; LIPB on Accurel MP 1000-triangle,

LIPB on PMMA (core and shell)-star and Novozym 435-diamond.

- 3 U. T. Bornscheuer and R. J. Kazlauskas, *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2nd edn, 2006.
- 4 Z. Boros, P. Falus, M. Márkus, D. Weiser, M. Oláh, G. Hornyánszky, J. E. Nagy and L. Poppea, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2013, 85–86, 119.
- 5 A. G. Cunha, M. D. Besteti, E. A. Manoel, A. A. T. Silva,
 R. V. Almeida, A. B. C. Simas, R. Fernandez-Lafuente,
 J. C. Pinto and D. M. G. Freire, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2014, 100, 59.
- 6 P. J. Dunn, A. S. Wells and M. T. Williams, *Green Chemistry in the Pharmaceutical Industry*, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2010.
- 7 D. Goswami, J. K. Basu and S. De, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 2013, 33, 81.
- 8 M. Kapoor and M. N. Gupta, Process Biochem., 2012, 47, 555.
- 9 O. Kirk and M. W. Christensen, *Org. Process Res. Dev.*, 2002, 6, 446.
- 10 D. M. Solano, P. Hoyos, M. J. Hernaiz, A. R. Alcantara and J. M. Sanchez-Montero, *Bioresour. Technol.*, 2012, **115**, 196.
- 11 M. M. Soumanou, M. Pérignon and P. Villeneuve, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2013, **115**, 270.
- 12 W. Du, W. Xu, D. Liu and J. Zeng, J. Mol. Catal. B: Enzym., 2004, 30, 125.
- 13 A. Khan, S. K. Sharma, A. Kumar, A. C. Watterson, J. Kumar and V. S. Parmar, *ChemSusChem*, 2014, 7, 379.
- 14 G. Potvin, A. Ahmad and Z. Zhang, *Biochem. Eng. J.*, 2012, 64, 91.
- 15 S. Macauley-Patrick, M. L. Fazenda, B. McNeil and L. M. Harvey, *Yeast*, 2005, 22, 249.
- 16 A. L. Zhang, J. X. Luo, T. Y. Zhang, Y. W. Pan, Y. W. H. Tan, C. Y. Fu and F. Z. Tu, *Mol. Biol. Rep.*, 2009, 36, 1611.
- 17 X. Qin, J. Qian, G. Yao, Y. Zhuang, S. Zhang and J. Chu, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77, 3600.
- 18 G. Stadlmayr, A. Mecklenbräuker, M. Rothmüller, M. Maurer, M. Sauer, D. Mattanovich and B. Gasser, *J. Biotechnol.*, 2010, **150**, 519.
- 19 D. L. Gazzoni, *Glicerina, biocombustíveis e bioprodutos*, http://www.gazzoni.eng.br/pagina42.htm, 02 April 2015.
- 20 P. Adlercreutz, Chem. Soc. Rev., 2013, 42, 6406.
- 21 R. Dicosimo, J. McAuliffe, A. J. Poulose and G. Bohlmann, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, **42**, 6437.
- 22 C. Garcia-Galan, A. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente and R. C. Rodrigues, *Adv. Synth. Catal.*, 2011, 353, 2885.
- 23 U. Guzik, K. Hupert-Kocurek and D. Wojcieszynska, *Molecules*, 2014, **19**, 8995.
- 24 E. T. Hwang and M. B. Gu, *Eng. Life Sci.*, 2013, **13**, 49; K. Min and Y. J. Yoo, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, 2014, **19**, 553–567.
- 25 R. C. Rodrigues, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres and R. Fernández-Lafuente, *Chem. Soc. Rev.*, 2013, 42, 62907.
- 26 R. A. Sheldon and S. van Pelt, Chem. Soc. Rev., 2013, 42, 6223.
- 27 O. Barbosa, C. Ortiz, A. Berenguer-Murcia, R. Torres,
 R. C. Rodrigues and R. Fernandez-Lafuente, *Biotechnol. Adv.*, 2015, 33, 435.

- 28 R. Fernandez-Lafuente, P. Armisén, P. Sabuquillo, G. Fernández-Lorente and J. M. Guisán, *Chem. Phys. Lipids*, 1998, 93, 185.
- 29 J. M. Palomo, G. Muoz, G. Fernández-Lorente, C. Mateo, R. Fernández-Lafuente and J. M. Guisán, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, 2002, **19–20**, 279.
- 30 E. A. Manoel, M. F. P. Ribeiro, J. C. S. Dos Santos, M. A. Z. Coelho, A. B. C. Simas, R. Fernandez-Lafuente and D. M. G. Freire, *Process Biochem.*, 2015, **50**, 1557.
- 31 A. M. Brzozowski, U. Derewenda, Z. S. Derewenda,
 G. G. Dodson, D. M. Lawson, J. P. Turkenburg, et al., Nature, 1991, 351, 491.
- 32 K. K. Kim, H. K. Song, D. H. Shin, K. Y. Hwang and S. W. Suh, *Structure*, 1997, 5, 173.
- 33 K. E. Jaeger, S. Ransac, H. B. Koch, F. Ferrato and B. W. Dijkstra, *FEBS Lett.*, 1993, 332, 143.
- 34 M. Cygler and J. D. Schrag, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, 1441, 205.
- 35 R. Verger, Trends Biotechnol., 1997, 15, 32.
- 36 P. Reis, K. Holmberg, H. Watzke and M. E. R. Miller, *Adv. Colloid Interface Sci.*, 2009, **147–148**, 237–250.
- 37 R. Fernandez-Lafuente, P. Armisén, P. Sabuquillo,
 G. Fernández-Lorente and M. Guisán, *Chem. Phys. Lipids*, 1998, 93, 185.
- 38 J. M. Palomo, C. Ortiz, G. Fernández-Lorente, M. Fuentes, J. M. Guisán and R. Fernández-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, 36, 447.
- 39 G. Fernández-Lorente, J. M. Palomo, M. Fuentes, C. Mateo, J. M. Guisán and R. Fernández-Lafuente, *Biotechnol. Bioeng.*, 2003, 82, 232.
- 40 J. M. Palomo, M. M. Peñas, G. Fernández-Lorente, C. Mateo,
 A. G. Pisabarro, L. Ramírez, R. Fernández-Lafuente and
 J. M. Guisán, *Biomacromolecules*, 2003, 4, 204.
- 41 R. V. Almeida, R. V. Branco, R. V. B. Peixoto, C. Lima, S. M. C. Martins, O. B. O. Antunes and D. M. G. Freire, *Biochem. Eng. J.*, 2008, **39**, 531.
- 42 J. V. Bevilaqua, A. G. Cunha, L. M. Lima, T. L. M. Alves, E. J. Barreiro, L. M. C. Paiva and D. M. G. Freire, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2005, **121**, 117.
- 43 A. G. Cunha, G. Fernández-Lorente, M. L. E. Gutarra,
 J. V. Bevilaqua, R. V. Almeida, L. M. C. Paiva,
 R. Fernández-Lafuente, J. M. Guisán and D. M. G. Freire, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2009, 156, 563.
- 44 E. A. Manoel, J. C. S. dos Santos, D. M. G. Freire, N. Rueda and R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 2015, **71**, 53.
- 45 M. D. Besteti, D. M. G. Freire and J. C. Pinto, *Macromol. React. Eng.*, 2011, 5, 518.
- 46 M. D. Besteti, A. G. Cunha, D. M. G. Freire and J. C. Pinto, *Macromol. Mater. Eng.*, 2014, **299**, 135.
- 47 M. K. Lenzi, F. M. Silva, E. L. Lima and J. C. Pinto, *J. Appl. Polym. Sci.*, 2003, **89**, 3021.
- 48 M. C. C. Pinto, D. M. G. Freire and J. C. Pinto, *Molecules*, 2014, **19**, 12509.
- 49 A. M. D. Castro, J. V. Bevilaqua, D. M. G. Freire, F. A. Torres,
 L. M. M. Santanna, M. L. E. Gutarra, C. A. Barbosa,
 R. V. Almeida, R. R. de Menezes and A. G. Cunha, A1-

process for production of lipases by genetic modification of veast, US 20110183400, 2011.

- 50 M. Maurer, M. Kühleitner, B. Gasser and D. Mattanovich, *Microb. Cell Fact.*, 2006, 5, 37.
- 51 J. K. Fawcett and J. E. Scott, J. Clin. Pathol., 1960, 13, 156.
- 52 A. Tabacco, F. Meiattini, E. Moda and P. Tarli, *Clin. Chem.*, 1979, **25**, 336.
- 53 M. Bradford, Anal. Biochem., 1976, 72, 248.
- 54 C. Garcia-Galan, O. Barbosa, K. Hernandez, J. C. S. Dos Santos, R. C. Rodrigues and R. Fernandez-Lafuente, *Molecules*, 2014, **19**, 7629.
- 55 K. Hernandez, C. Garcia-Galan and R. Fernandez-Lafuente, *Enzyme Microb. Technol.*, 2011, **49**, 72.
- 56 R. C. Rodrigues, K. Hernandez, O. Barbosa, N. Rueda, C. Garcia-Galan, J. C. S. Dos Santos, A. Berenguer-Murcia and R. Fernandez-Lafuente, *Curr. Org. Chem.*, 2015, **19**, 1707.
- 57 K. Yamabe, T. Ihara and A. Jyo, *Sep. Sci. Technol.*, 2001, 3511–3528.
- 58 J. Wang, C. Chen, S. M. Buck and Z. Chen, *J. Phys. Chem. B*, 2001, 12118–12125.
- 59 N. Gupta, P. Rathi, R. Singh, V. K. Goswami and R. Gupta, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **67**, 648.

- 60 R. Scherer, J. V. Oliveira, S. Pergher and D. de Oliveira, *Mater. Res.*, 2011, 14, 483.
- 61 E. Séverac, O. Galy, F. Turon, C. A. Pantel, J. S. Condoret, P. Monsan and A. Marty, *Enzyme Microb. Technol.*, 2011, 48, 61.
- 62 E. A. Manoel, K. C. Pais, A. G. Cunha, A. B. C. Simas, M. A. Z. Coelho and D. M. G. Freire, *Org. Process Res. Dev.*, 2012, **16**, 1378.
- 63 A. G. Cunha, A. A. T. Da Silva, M. G. Godoy, R. V. Almeida,
 A. B. C. Simas and D. M. G. Freire, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2012, 88, 205.
- 64 A. K. P. Vadhana, P. Samuel, R. M. Berin, J. Krishna, K. Kamatchi and S. Meenakshisundaram, *Enzyme Microb. Technol.*, 2013, 52, 177.
- 65 J. C. Goodrick, M. Xu, R. Finnegan, B. M. Schilling, S. Schiavi, H. Hoppe and N. C. Wan, *Biotechnol. Bioeng.*, 2001, 74, 492.
- 66 G. Fernandez-Lorente, Z. Cabrera, G. Godoy, R. Fernandez-Lafuente, J. M. Palomo and J. M. Guisan, *Process Biochem.*, 2008, 43, 1061.
- 67 E. A. Manoel, K. C. Pais, A. G. Cunha, M. A. Z. Coelho, D. M. G. Freire and A. B. C. Simas, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2012, 23, 47.



Pilot-scale development of core-shell polymer supports for the immobilization of recombinant lipase B from *Candida antarctica* and their application in the production of ethyl esters from residual fatty acids

Eliane Pereira Cipolatti ⁽⁰⁾,^{1,2} Martina Costa Cerqueira Pinto,^{1,3} Julia de Macedo Robert,¹ Tabita Pizoni da Silva,^{1,2} Thamires da Costa Beralto,^{1,2} Jorge G. F. Santos Jr.,³ Rui de Paula Vieira de Castro,¹ Roberto Fernandez-Lafuente,⁴ Evelin Andrade Manoel,^{1,2} José Carlos Pinto,³ Denise Maria Guimarães Freire¹

¹Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

²Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil ³Programa de Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Department of Biocatalysis, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco 28049, Madrid, Spain

Correspondence to: J. C. Pinto (E-mail: pinto@peq.coppe.ufrj.br), D. M. Guimarães Freire (E-mail: freire@iq.ufrj.br), and E. A. Manoel (E-mail: eamanoel@pharma.ufrj.br)

ABSTRACT: A recombinant lipase B from *Candida antarctica* (LipB) in *Pichia pastoris* was synthesized through submerged fermentation using crude glycerin as substrate. The immobilization of this enzyme on the core-shell polymeric supports is an effective alternative for its application. The supports with distinct levels of hydrophobicity were produced through combined suspension and emulsion polymerization in pilot scale. Particles with distinct compositions were synthesized (PMMA/PMMA; PMMA-*co*-DVB/PMMA-*co*-DVB; and PS-*co*-DVB/PS-*co*-DVB) and employed on the immobilization of the produced lipase (LipB) and the commercial enzyme (CalB). The morphological properties (specific area, average pore diameter, specific volume of pores, and hydrophobicity level) and the influence of the polymerization conditions on the morphology of the supports were studied. The thermal stability of such biocatalysts was also investigated in the presence of calcium cation (Ca⁺²), maintained 100% of the activity after 3 h at 50°C when the PMMA-*co*-DVB/PMMA-*co*-DVB was employed. The synthesized enzyme and supports manufactured in pilot scale were employed successfully for production of esters using residual fatty acids as substrates, adding value to these raw materials and increasing the ranges of possible applications. © 2018 Wiley Periodicals, Inc. J. Appl. Polym. Sci. **2018**, *135*, 46727.

KEYWORDS: biopolymers and renewable polymers; emulsion polymerization; microscopy; porous materials; polystyrene

Received 9 March 2018; accepted 14 May 2018 DOI: 10.1002/app.46727

INTRODUCTION

Lipases are used successfully in different fields, such as in food, pharmaceutical, textile, chemical, and cosmetic industries. For this reason, many studies aimed to produce, immobilize, improve the performance, and extend the use of lipases in industrial applications.^{1–3} Consequently, distinct immobilization procedures have been employed in order to characterize the most appropriate immobilization processes for each enzyme, aiming at specific applications.^{4–6} These immobilization techniques enable the reuse of the biocatalysts, the implementation of continuous processes,

and the improvement of several enzymatic properties, including the enzymatic activity and stability.^{7–9}

Regarding the three-dimensional structure of lipases, it is important to note the existence of two distinct conformations. In the "closed" conformation, the active site of the enzyme is isolated from the reaction medium by a type of cap, corresponding to the inactive form of the enzyme. The "open" conformation, corresponding to the active form of the enzyme, is characterized by the opening of the cap and exposure of the active site of the enzyme to the reaction medium.¹⁰ The two structural forms exist

© 2018 Wiley Periodicals, Inc.



in equilibrium and can be affected by the reaction conditions.¹¹ However, when the enzyme is subjected to hydrophobic interfaces, there is a tendency to favor the "open" conformation, which can lead to the increase of the enzymatic activity.^{12,13} For this reason, many studies aimed to develop immobilization techniques in order to improve the enzyme performance, as lipases have been frequently absorbed or bounded to rigid hydrophobic supports, leading to more stable and active biocatalysts.^{14–17}

It should be stressed that some important features are required for the support materials intended for enzyme immobilization, such as good mechanical stability and strong enzyme immobilization on the support surfaces (to avoid enzyme desorption during operation, without causing enzymatic deactivation).18,19 Nevertheless, easy removal of the enzyme after enzyme inactivation can allow the reuse of the support.²⁰ Although different materials can be used as supports, including inorganic materials and natural polymers,^{18,19} synthetic polymers have received special attention, since these materials can be produced easily and some of their properties (such as composition, porosity, particle size, and surface functionality) can be manipulated to allow a proper control of the interaction between the enzyme and the support. In this context, the manufacture of coreshell polymer supports through combined suspension and emulsion polymerizations can be advantageous, since this technique allows the production of porous particles and functionalization of the core and the shell in situ, without additional reaction steps. Consequently, supports with different properties can be produced and adapted to the intrinsic characteristics of each enzyme.²¹⁻²⁴

This area, still underdeveloped, generally called Support Engineering, searches for materials that interact in the best way with the enzyme with the aims to improve biochemical performance results. The different characteristics of the core-shell particles and the possible peculiar properties of the surface make it possible to use them in different applications: in the area of production of plastics, as impact modifiers; in the synthesis of films; in the production of adhesives and paints; in the area of foams, for the manufacture of thermal insulation materials; in the medical field and of bioprocesses, as enzymatic supports or vascular embolization agents.²⁵⁻²⁸ In addition, such materials may be porous and have pronounced specific areas, further increasing the spectrum of applications of the core-shell particles.^{26,29,30} It is important to note that this simultaneous suspension and emulsion polymerization process has many advantages, especially when the application of such particles as a support for the synthesis of biocatalysts is envisaged. First, the technique allows obtaining micrometric particles, facilitating the processes of separation of the biocatalyst from the reaction medium in which they are to be used. In addition, the technique allows the generation of porous particles with pore diameters large enough to allow the enzyme to enter the innermost regions of the shell. The generation of pores achieved through this polymerization technique unlike the other processes hitherto presented, since such processes result in rigid particles or require the addition of porogenic compounds to the reaction medium. Moreover, this technique enables the functionalization of the particles, by altering the composition of the polymeric shell. Another advantage is a simultaneous conduction of the two processes without even a reactor, without the need for additional steps of separation, purification, and functionalization.^{26,29,30}

In this work, core-shell polymer supports with different compositions were produced in pilot scale, based on poly(methyl meth-(PMMA/PMMA), acrylate)/poly(methyl methacrylate) poly(methyl methacrylate-co-divinylbenzene)/poly(methyl methacrylate-co-divinylbenzene) (PMMA-co-DVB/PMMA-co-DVB), and poly(styrene-co-divinylbenzene)/poly(styrene-co-divinylbenzene) (PS-co-DVB/PS-co-DVB). Polymeric particles exhibiting similar compositions have been synthesized in previous works.^{21,22,25-28} However, other reaction conditions were recommended in order to produce core-shell particles with high specific area and porosity, as described in some studies.^{23,24} Therefore, in this study it was gathered the most appropriate compositions and most adequate reaction conditions to increase the specific area and porosity of the obtained supports. Besides, it is important to emphasize that the scaling-up of this polymerization process had not been reported previously.

A recombinant lipase B from *Candida antarctica* (LipB) in *Pichia pastoris* under the PGK1 promoter (which is related to the glycolytic enzyme 3-phosphoglycerate kinase) can be produced through submerged fermentation, using crude glycerin as substrate.31 In another study, it must be noted that LipB and CalB present similar performances in terms of both temperature and pH stability. Nevertheless, LipB is significantly less stable, probably because of the lack of stabilizers in the enzyme medium added by Novo in their formulations, once this lipase is obtained directly from the culture supernatant.³¹

Based on the previous remarks, this work proposes the immobilization of LipB and CalB onto different polymer supports and the comparison of the performances of the obtained biocatalysts with the performance of a commercial product in different reactions. The thermal stability of LipB and CalB was also evaluated in the presence of the cation calcium Ca⁺². The use of cations, mainly Ca⁺², as additives for enzyme stabilization is generally employed to characterize new enzymes, in order to maintain the tridimensional structure of some lipases. However, the study of the presence of different ions during the immobilization process in little studied.^{32,33} The first work that reported the cation induced enzyme stabilization was developed by Fernandez-Lopez *et al.* (2015).³³ Therefore, the addition of Ca⁺² was a strategy adopted in this work in order to stabilize lipase B from *C. antarctica.* This trial had not been reported previously aiming CalB stabilization.

Besides hydrolysis reactions, previous studies showed that coreshell polymer supports can be employed successfully for LipB and CalB immobilization and that the resulting biocatalysts can be used for syntheses of esters and *myo*-inositol derivatives.^{24,30,34} In this work, the obtained biocatalysts are used to promote esterification reactions of palm fatty acid distillate (PFAD) and soybean fatty acid distillate (SFAD). These substrates were selected because they are important byproducts of the industrial processes of palm and soybean oils, which are largely available in Brazil.^{35,36}

The use of industrial residuals and byproducts as substrates constitutes an interesting alternative for reduction of industrial wastes and aggregation of value to these processes. The obtained esters can be used eventually in biodiesel and cosmetic products. Particularly, the production of palm oil is expected to increase from 17.7 million tons in 2015/16 to 19.4 million tons in 2016/17



and to 21 million tons in 2017/18.37 The free fatty acid (FFA) content of palm oil is about 3-5 wt %, which can be reduced through neutralization and deodorization steps to less than 0.01 wt %. In the neutralization step, an alkali solution is added to the oil and reacts with the FFA, leading to a product that is removed in the form of soap. The deodorization step involves the steam distillation under vacuum. As the oil flows through different compartments, the volatile components can be separated and collected. At the end of the process, the FFA is obtained in the form of PFAD,³⁸ which can be used as animal food, soap, and for production of chemicals for the cosmetic and biodiesel industries.^{39,40} Another interesting byproduct is the SFAD. SFAD is obtained after the deodorization step during the refining of soybean oil. This byproduct presents a high concentration of free acids and triglycerides, being an attractive raw material for production of esters. Considering its low cost, SFAD is very competitive when compared to rival refined vegetable oils.⁴¹

The esterification reactions of SFAD and PFAD cannot be conducted effectively with homogeneous alkaline catalysts because the high amount of FFAs can hinder the separation process. On the other hand, the use of acid catalysts does not lead to saponification, but to esterification reactions. However, the rate of ester formation can be very low in this process, when compared to alkaline catalyst reactions.⁴² Therefore, the use of heterogeneous enzymatic catalysts becomes an interesting and promising alternative. The combination of synthesized enzymes and plant-scale developed polymer supports can lead to the generation of efficient biocatalysts for the production of esters used in biodiesel and cosmetic industries, constituting the main focus of this work.

EXPERIMENTAL

Materials

The substrate used for determination of hydrolytic activities, *p*-nitrophenyl laurate (*p*-NPL), was purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) with minimum purity of 98 wt %. Extra pure acid oleic and ethanol were obtained from Merck (São Paulo, SP, Brazil). Petrobras (Brazil) kindly provided the crude glycerin, with purity of 84% (v/v), containing less than 1000 ppm of methanol and 7 g/L NaCl. PFAD from palm oil refining process was provided by Agropalma (Belém, Pará, Brazil). SFAD obtained through acidulation of soapstock from soybean oil refining was provided by Miracema-Nuodex (Campinas, São Paulo, Brazil). The commercial immobilized biocatalyst Novozyme435 was kindly provided by Novozymes (Spain) and used for comparative evaluation of performance of the synthesized biocatalysts.

Regarding the manufacture of the polymer supports, the initiator used on the suspension polymerization step was benzoyl peroxide (BPO), supplied by Vetec Química Fina (Duque de Caxias, RJ, Brazil). The stabilizer poly(vinyl alcohol) was also provided by Vetec Química Fina (Duque de Caxias, RJ, Brazil). The emulsifier sodium lauryl sulfate and the initiator potassium persulfate, both materials used on the emulsion polymerization step, were supplied by Vetec Química Fina (Duque de Caxias, RJ, Brazil). Sodium bicarbonate, supplied by Proquimios (Rio de Janeiro, RJ, Brazil) was also employed on the second reaction step. The comonomer styrene (S) (distilled under vacuum prior to use) was provided by INNOVA (Triunfo, RS, Brazil). Divinylbenzene (DVB) was also used as a comonomer in the polymerization reactions, being supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) as 80 wt % technical grade and containing 20 wt % of ethylstyrene. The comonomer methyl methacrylate was purchased from Unigel (Candeias, BA, Brazil), stabilized with 40 ppm of hydroquinone. All other reagents and solvents used in the immobilization and polymerization steps were of analytical grade and used as received, without any additional purification step.

Production of LipB Expressed in P. pastoris

The production of lipase B from C. antarctica in P. pastoris was conducted with crude glycerin, as described in previous studies.^{31,43} The microorganisms used for preparation of the preinoculum were stored in 20 wt % glycerol at -80°C, using Petri plates with 2 wt % YPD (1 wt % yeast extract, 2 wt % peptone, and 2 wt % glycerol) agar. The preinoculum was prepared in shake flasks at 200 rpm and 30°C in 2 wt % YPD. The cultivation was performed in a bioreactor (New Brunswick 7L, Germany) with control of pH (pH 7), temperature (30°C), agitation (250-700 rpm), and gas flow (0-1 vvm). During the cultivation process, the oxygen saturation level was maintained at 30% with help of a cascade control, by changing agitation and gas flow in the indicated ranges. The culture media used for fermentation included: (1) basal salts medium containing (g/L): 11.50 citric acid; 14.90 MgSO₄·7H₂O; 0.93 CaSO₄·2H₂O; 18.20 K₂SO₄; 4.13 KOH; 5.00 (NH₄)₂SO₄; 40 glycerol; 4.25 mL H₃PO₄ adjusted to pH 7 with KOH; and 4.35 mL/L of P. pastoris Trace Minerals (PTM₄) trace salts. (2) Minimal medium (MM) containing (g/L): 2.00 citric acid; 12.4 (NH₄)₂HPO₄; 0.022 CaCl₂·2H₂O; 0.90 KCl; 0.50 MgSO4·7H2O; 40 glycerol, adjusted to pH 7 with KOH; and 4.60 mL of PTM₄ trace salts.³¹

Production of Core-Shell Polymer Supports

The core-shell polymer supports were produced through combined suspension and emulsion polymerization.^{21,22,24,30} First, a suspension polymerization was conducted for preparation of the cores. After a certain period, the emulsion constituents were added to the reactor for preparation of the porous shell. In this work, some modifications of the reaction conditions were proposed to allow the increase of the specific area and porosity of the final particles. It is important to point out that the scaling-up of this polymerization process is reported here for the first time, using a stainless-steel pilot plant reactor of 12 L.

A reaction run [reaction (0), P(S-*co*-DVB)/P(S-*co*-DVB)], containing 25 wt % of DVB) was conducted in bench scale and used as reference. The reaction conditions were based on previous studies.^{23,34} However, the duration of the suspension step was diminished in order to produce stickier cores and enable the agglomeration of additional amounts of emulsified nanoparticles around the core. Distinct feed compositions and reaction conditions were evaluated during the plant-scale study, allowing the production of PMMA/PMMA, P(S-*co*-DVB)/P(S-*co*-DVB) (25 wt % of DVB) and P(MMA-*co*-DVB)/P (MMA-*co*-DVB) (25 wt % of DVB) core–shell particles.

Initially, an organic solution (20–25 wt %) that contained the monomer mixture and the initiator BPO was dispersed in an aqueous solution that contained distilled water and 0.6 wt % of poly(vinyl alcohol), used as stabilizer. When only MMA was used, the amount of BPO was equal to 1 wt % of the organic



5		Temperature	Δt suspension	Monomer feed flow rate	
Reaction	Chemical composition	(°C)	(min)	(Lh ⁺ g ⁺) ^a	Scale
0	P(S <i>-co-</i> DVB)/P(S <i>-co-</i> DVB) (25 wt % DVB)	85	40	0.0007	Bench
1	PMMA/PMMA	(65-75)	60	0.0004	Pilot
2	PMMA/PMMA	(65-75)	70	0.0004	Pilot
3	PMMA/PMMA	70	70	0.0003	Pilot
4	P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB) (25 wt % DVB)	75	25	0.0007	Pilot
5	P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB) (25 wt % DVB)	80	40	0.0007	Pilot

Table I. Operation Conditions of Polymerization Runs

^a The monomer feed flowrate was divided by the monomer mass employed in the suspension step, in order to facilitate the comparison between the bench and the pilot reactions.

phase, to avoid thermal runaway. In the remaining reactions, the BPO content was equal to 4 wt % in respect to the organic phase.

After a specified period, the emulsion components were added to the reaction medium. The total amount of water in the feed was equal 35 wt % of the feed mass. The aqueous phase also contained the buffer agent sodium bicarbonate (0.1 wt %) and the emulsifier sodium lauryl sulfate (0.8 wt %). An initial load of monomer mixture (7 wt % of the feed mass) was added at the beginning of the emulsion step, while the remaining of the monomer feed (18 wt %) was added continuously into the reactor during the emulsion polymerization step. The potassium persulfate initiator content of the second reaction step was equal to 0.1 wt % of the total reaction mass, when only MMA was used as monomer, and equal to 0.04 wt % in the remaining reactions. This modification aimed to affect the conversion of the nanoparticles and the adhesion to the cores.

After finishing the semibatch step, 2 h additional reaction were carried out to ensure the appropriate coverage of the core and the formation of the shell. At the end of the polymerization reaction, the reactor was cooled down to room temperature and the particles were washed and dried with help of a vacuum oven (for the bench scale reactions) or a lyophilizer (LP040, Liotop, São Carlos, SP, Brazil) (for the pilot-scale reactions).

The bench scale reaction was conducted in an open 1 L jacketed glass reactor (FGG Equipamentos Científicos, São Paulo, SP, Brazil) equipped with a thermostatic bath (Haake Phoenix II model, Thermo Scientific, Karlsruhe, Germany), to maintain the reaction temperature. The pilot-scale reactions were carried out in a 12 L jacketed stainless steel reactor (Implantação, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) coupled to a hot water stream, used to control the reactor temperature, under continuous stirring (800 rpm).

The duration of the suspension polymerization step was not the same for each reaction and was adjusted in order to improve the porosity of the particles, depending on the monomer employed and the characteristic of each polymerization system. The reaction temperature was also diminished when MMA was employed as comonomer because of its high reactivity. Besides, the monomer feed flowrate was slightly modified in the different runs, as this variable affects the porosity of the core-shell particles.²³ The operation conditions used to perform the distinct polymerization reaction trials are presented in Table I.

The morphology of the core-shell particles was characterized by optical microscopy. The binocular microscope (Axiovert 40 MAT, Carl Zeiss, Göttingen, Germany) was equipped with a digital camera (AxioCam MRc 5, Carl Zeiss, Göttingen, Germany), enabling the amplification and digitization of the images. A scanning electron microscope (SEM) (Versa 3D, Fei Company, Eindhoven, The Netherlands) was also used for morphological characterization of the obtained particles.

The polymer supports were also characterized in terms of the distribution of particle diameters, with help of a particle size distribution analyzer supplied by Malvern Instruments (Master sizer Hydro 2000S model, Malvern, Worcestershire, UK). Measurements were performed in replicates and the experimental errors were reported with confidence level of 95%.

The morphological properties (specific area, average pore diameter and specific volume of pores) of the polymer supports were characterized through nitrogen physisorption, using a surface analyzer (ASAP 2020 model, supplied by Micromeritics, Norcross, GA), assuming the validity of the BET model and BJH method. The samples were treated under vacuum at $60^{\circ}C.^{23,24}$

In order to determine the hydrophobicity level of the polymer materials, the core-shell particles were compressed in a disk template and the contact angles between the pastilles and distilled water were measured under atmospheric conditions using a tensiometer (K100, Kruss, Hamburg, Germany).

Immobilization of Lipases on Core-Shell Polymeric Supports

One gram of the core–shell support was added to 10 mL of the enzymatic solution in 5 m*M* sodium phosphate at pH 7. The immobilization process was conducted at 10°C, under slight stirring. The activities of the supernatant and of the suspension were monitored with *p*-NPL. Immobilization was considered finished when no significant change was detected on the supernatant activity.²³ The recovered activities (*R_a*) were determined as shown in eqs. (1) and (92)³⁰:

$$R_a(\%) = \frac{U_{\rm imo}.100}{U_{\rm teo}} \tag{1}$$

$$U_{\text{teo}} = \frac{U_c - U_s}{g_{\text{support}}} \tag{2}$$

where U_{imo} represents the actual amount of immobilized enzyme [UI $g_{support}^{-1}$]; U_C represents the total amount of enzyme used in





Figure 1. PMMA/PMMA particles obtained at the end of reaction (1).

the immobilization [UI $g_{support}^{-1}$]; Us is the amount of enzyme not immobilized, [UI $g_{support}^{-1}$]; and U_{teo} represents the amount of enzyme theoretically immobilized, defined in accordance with eq. (2). The yield of immobilization was determined as shown in eq. (3).

$$V_{\text{ted}} \text{ of immobilization} = \frac{U_{\text{teo}}}{U_c} * 100 \tag{3}$$

After immobilization, Fourier transform infrared (FTIR) analyses were performed in order to evaluate the composition of the biocatalysts (the final immobilized enzyme). The FTIR analyses were conducted with a Nicolet 6700 spectrophotometer, from Thermo Electron Corporation (Madison) under ambient conditions, using 128 scans. Wave numbers ranged from 500 to 4000 cm⁻¹.

Determination of Protein Content

The protein concentration was determined spectrophotometrically at 595 nm according to Bradford.⁴⁴ Bovine serum albumin was used as standard protein for calibration curves.

Hydrolytic Activity of the Biocatalysts

The biocatalysts (free and immobilized enzyme) were also characterized in terms of their hydrolytic activity. Hydrolysis reactions were carried out under mild stirring at 30° C, using *p*-NPL as substrate. The hydrolytic activity procedure was detailed in previous studies.^{9,24,34}

It is important to highlight that one unit of enzyme activity (1 UI) corresponds to the amount of enzyme required to produce 1 μ moL of *p*-NPL per minute under the adopted operational conditions.

Esterification Activity of the Biocatalysts

The esterification activities of the biocatalysts were also evaluated. Each reaction was carried out at 40°C under mild stirring. Oleic acid (10.1 mL) and ethanol (1.9 mL) were used as substrates. The detailed reaction procedure has been described in previous studies.^{9,24,34}

It is important to point that a unit of enzyme activity (1 UI) corresponds to the amount of enzyme required to form 1 μ moL of ethyl oleate (product of the esterification reaction) per minute under the described operating conditions.

Thermal Inactivation of Lipases on Core-Shell Polymer Supports

This step was performed aiming to determine the effect of the cation Ca^{+2} on the enzyme stability. For this purpose, 1 g of each immobilized lipase was suspended in 10 mL of 5 m*M* of Tris buffer at pH 7 at 50°C, containing 5 m*M* of calcium. Periodically, samples were withdrawn and their activities were measured using *p*-NPL, as substrate. The free forms of CalB and LipB were also evaluated and used as reference.

Esterification Reaction of the FFA

Esterification reactions were carried out using ethanol and PFAD or SFAD as substrates. The reactions were carried out at 45°C with molar ratio of 1:1 (SFAD or PFAD: ethanol). Conversions were calculated through titration with NaOH.³⁶

Statistical Analysis

All measurements involved with the immobilization step were conducted in triplicates and results were reported with significance level of 95%. It was used as statistical method Tukey Studentized Range test, using the software Statistica 7.0.

RESULTS AND DISCUSSION

Influence of the Polymerization Conditions on the Morphology of the Supports

Different core-shell polymeric supports were manufactured successfully in the pilot-scale, as shown in Figure 1. Figure 1(A) shows







Table II. Average Particle Diameters of the Core-Shell Polymer Supports

Supports	Average particle diameter (d ₅₀) (μm)
Reaction 0: P(S <i>-co-</i> DVB)/P (S <i>-co-</i> DVB)	86.1 ± 12.1
Reaction (1): PMMA/PMMA	157.2 ± 47.1
Reaction (2): PMMA/PMMA	481.4 ± 96.9
Reaction (3): PMMA/PMMA	49.1 ± 5.7
Reaction (4): P(MMA <i>-co-</i> DVB)/P (MMA <i>-co-</i> DVB)	163.5 ± 4.7
Reaction (5): P(S <i>-co-</i> DVB)/P (S <i>-co-</i> DVB)	98.9 ± 1.2

the internals of the reactor, illustrating the formation of the polymer particles, as shown in the SEM micrograph of Figure 1(B).

The particle size distributions of the polymer supports are presented in Figure 2. First, it must be noticed that the proposed polymerization reactions resulted in wide particle size distributions, regardless the chemical composition of the reaction media. It can also be observed that the particle size distribution of reaction (2) was shifted toward larger particle size values, while the particle size distribution of reaction (3) was shifted toward smaller diameter values. So, it becomes evident that suitable changes of the operation conditions, such as the monomer feed flowrate of the emulsion polymerization step, can be used to manipulate the final morphology of the core–shell polymer particles.

In order to facilitate the understanding of the effects of the polymerization conditions on the average diameters of the particles, the average particle diameters are presented in Table II. The average particle diameters of P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB) manufactured in the pilot-scale and bench-scale were similar, indicating that the balances between the rates of particles breakage and particle coalescence were similar in both scales. It must also be noticed that different average particle diameters were obtained for MMA reactions, reinforcing that operation conditions can affect the final particle size distributions significantly. The increase of the monomer feed flow rates can increase the rates of particle agglomeration, resulting in larger particle size diameters, as observed previously for P(S-co-DVB) particles in the benchscale.³⁴ Besides, by comparing reactions (1) and (2), it can be

Table III. Morphological Characteristics of the Core-Shell Polymer Supports

observed that there is an optimal time length for the suspension step in order to avoid production of excessively agglomerated particles. It is very important to point out that the final particles could be easily separated from the suspension at the end of the batch, facilitating the manipulation and use of the supports.

Table III presents the specific areas, the average pore diameters and the specific volumes of pores of the produced core-shell particles. Based on the results, the successful manufacture of porous particles seemed evident, indicating the formation of the shell over the particle cores, since the specific areas of the cores are very close to zero.^{21,24,34}

By comparing P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB) particles produced in pilot-scale and bench-scale, it can be noticed that the formation of the shell was less effective in the pilot-scale reaction, probably because of the lower reaction temperature employed in the pilotscale and, consequently, lower reaction rates. The similar average pore sizes of both products reinforces the assumption that agglomeration of nanoparticles was less effective in the pilot-scale at the analyzed conditions, leading to narrower shells and lower total pore volumes. As shown in Table III, supports with higher specific areas also exhibited higher pore volumes, as nanoparticle agglomeration increases simultaneously the specific surface areas and pore volumes, as discussed in the literature.²⁴ Particularly, reaction (3) resulted in supports with the highest specific area and porosity, indicating that the operation conditions employed in this reaction were the most appropriate for production of polymer supports based on MMA composition.

The average pore sizes of the supports are also presented in Table III. It must be highlighted that all supports exhibited average pore sizes that were wide enough to allow enzyme immobilization, favoring the access of the enzyme to the internal surfaces of the shell.

It is important to observe in Table III that the produced particles exhibited distinct hydrophobic features. As shown by Cunha *et al.* (2014),²¹ this characteristic also affects the enzyme immobilization process. It must be noticed that the supports based on styrene show hydrophobic features that stimulate the enzymatic interfacial activation during the immobilization procedure. Based on the contact angle values, some apparent discrepancies can be observed, once samples with similar compositions exhibited different contact angle values. However, it must be observed that this apparent discrepancy can be justified in terms of the existence of residual

Supports	Specific area (m ² /g)	Average pore diameter (Å)	Specific volume of pores (cm ³ /g)	Contact angle (°)
Reaction 0: P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)	48.2	253.1	0.29	92.3 ± 0.4
Reaction 1: PMMA/PMMA	29.9	176.4	0.15	55.9 ± 0.1
Reaction 2: PMMA/PMMA	7.5	190.9	0.04	31.6 ± 0.2
Reaction 3: PMMA/PMMA	44.5	211.6	0.27	56.6 ± 0.5
Reaction 4: P(MMA <i>-co-</i> DVB)/P (MMA <i>-co-</i> DVB)	27.0	222.1	0.16	a
Reaction 5: P(S <i>-co-</i> DVB)/P(S <i>-co-</i> DVB)	5.3	253.3	0.03	105.7 ± 0.8

^a The contact angle of this sample could not be detected.







Figure 3. Morphological features of the core-shell polymer supports. (A) Optical microscopy (OM) of reaction (0): P(S-*co*-DVB)/P(S-*co*-DVB); (B) SEM of reaction (0): P(S-*co*-DVB)/P(S-*co*-DVB); (C) OM of reaction (3): PMMA/PMMA; (D) SEM of reaction (3): PMMA/PMMA; (E) OM of reaction (4): P(MMA-*co*-DVB)/P(MMA-*co*-DVB)/P(MMA-*co*-DVB).

surfactant on the surfaces of the particles, which may eventually justify the enhanced purification of the particles or manipulation of hydrophobicity levels through modification of surfactant concentrations. As expected, supports based on methyl methacrylate presented more hydrophilic surfaces. Although the hydrophilic surfaces do not favor the enzymatic interfacial activation, this type of biocatalyst can facilitate the diffusion of substrates and products through the support shell, increasing the enzymatic activity.

The supports that exhibited the highest specific areas and distinct chemical compositions were selected for the enzyme immobilization studies: P(S-*co*-DVB)/P(S-*co*-DVB) [reaction (0)], PMMA/PMMA [reaction (3)], and P(MMA-*co*-DVB)/P(MMA-*co*-DVB)

[reaction (4)]. The morphological features of the core-shell polymer supports employed in the immobilization process are shown in Figure 3. Particles produced in reactions (0) and (3) presented more regular shape, while particles produced in reaction (4) were more irregular due to the higher rates of reaction and particle agglomeration, which also led to larger average particle diameters.

Immobilization of Different Lipases on Distinct Core-Shell Supports

The immobilization process was monitored through measurement of the hydrolytic activity over the time. It is important to mention that the immobilization of the enzymes onto the



polymer supports occurred through interfacial activation of the lipases on the hydrophobic support surfaces, mainly in the shell, which concentrates most of the specific area (more than 95%).

FTIR spectra of the distinct core-shell supports were acquired in order to compare the changes of the functional groups before and after the immobilization process (Figure 4).⁴⁵ The main difference was observed between the spectra of the biocatalysts and the supports, as one might already expect, indicating the successful immobilization of the enzymes. In Figure 4, the broad peak in the range of $3100-3600 \text{ cm}^{-1}$ corresponds to O—H and N—H stretching, related to the enzyme structure.⁴⁶ In Figure 4(A), the FTIR spectrum of the immobilized LipB on P(S-*co*-DVB)/P(S-*co*-DVB) showed a peak close to 1000 cm^{-1} , which could not be observed for CalB in the same support, possibly indicating structural differences between the two enzymes, which can be attributed to the presence of larger number of aminoacid groups in LipB (data not shown).

The immobilization parameters are presented in Table IV. It is possible to observe that each lipase shows different esterification and hydrolytic activities, depending on the support employed for immobilization. The immobilization yields were high for both enzymes and supports, with the exception of the pair CalB and P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB) [reaction (0)], which exhibited the highest specific area. This result shows clearly that the chemical composition of the supports can affect significantly the enzyme immobilization process and efficiency.

It can be noticed that the recovered activity was higher when CalB was immobilized. The constituents of the enzymatic extract possibly help the conservation of the enzyme structure during the immobilization process. In fact, when the PMMA/PMMA support was employed, CalB exhibited a hyper-activation (147% of recovered activity), which had not been described before for this enzyme using other substrates and octyl agarose.^{47,48}

Analyzing the hydrolytic activities of the final derivatives, it can be observed that most biocatalysts produced with CalB were more active than the LipB counterparts. However, the most active biocatalyst was synthesized when LipB and PMMA/PMMA were employed during the immobilization procedure. Valério *et al.* (2015)³⁶ and Li *et al.* (2004)⁵³ also obtained high active biocatalysts employing PMMA matrices.

The esterification activities of the distinct biocatalysts obtained with LipB were also evaluated. The highest esterification activity was obtained when PMMA/PMMA-CalB biocatalyst was employed (838.64 \pm 57.20 U/g). When similar conditions were used for determination of the esterification activity, the Novozyme435 (Sigma-Aldrich, Basvaerd, Denmark) showed 947.20 \pm 0.05 U/g, which reinforces the impressive performance of the synthesized biocatalysts and encourage the development of more porous particles and the immobilization of larger amount of enzymes.

As mentioned before, the thermal stability of each enzyme was evaluated in the presence the cation calcium Ca^{+2} ; the obtained results are shown in Figure 5. The same behavior that was observed by Fernandez-Lopez *et al.* (2015)³³ was noticed for CalB and LipB: the addition of 5 m*M* of calcium was able to preserve



Figure 4. FTIR spectra of the supports and corresponding biocatalysts. (A) P(S-*co*-DVB)/P(S-*co*-DVB); (B) P(MMA-*co*-DVB)/P(MMA-*co*-DVB); (C) PMMA/PMMA. [Color figure can be viewed at wileyonlinelibrary.com]

the activity of the enzymes. This effect is more evident for both lipases immobilized on PMMA/PMMA and P(MMA-*co*-DVB)/P (MMA-*co*-DVB), in which the enzymatic activities were maintained at 100% for 3 h at 50°C. Under the absence of this cation both enzymes were inactivated in less than 1 h of analysis. Therefore, it was observed that the addition of this ion increased significantly the stability of the produced biocatalysts, encouraging a deep study in this field, analyzing other ions and other concentrations.

The biocatalysts were also evaluated in terms of esterification reactions of residual FFAs obtained from soybean oil and palm oil. Results were shown in terms of conversion of FFAs. Observing Figures 6 and 7, it can be noticed that the reaction rates of esterification were higher when CalB was employed [except for CalB-P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB) and FFA]. As expected in a



т

	LIPB				CALB			
		Yield of			Hydrolytic	Yield of		
Biocatalyst	Hydrolytic activity (U/g _{support}) ^a	immobilization (%)	Recovered activity (%)	Esterification activity (U/g _{support})	activity (U/g _{support}) ^a	immobilization (%)	Recovered activity (%)	Esterification activity (U/g _{support})
Free ^b	199.45 ± 9.50°	1	1	1	123.20 ± 15.30 ^d	1	1	1
PMMA/PMMA	144.23 ± 2.00	99.2	72.8	392.12 ± 0.37	137.35 ± 1.90	75.7	147.3	838.64 ± 57.20
PMMA <i>-co</i> -DVB/ PMMA <i>-co</i> -DVB	35.31 ± 0.49	97.5	18.2	391.93 ± 0.53	54.16 ± 0.75	69.2	63.4	367.34 ± 30.70
PS <i>-co</i> -DVB/ PS <i>-co</i> -DVB	15.56 ± 0.22	94.3	ю. Ю	168.08 ± 0.17	18.25 ± 0.25	31.4	47.2	378.02 ± 64.22
Hydrolytic activity usi Enzymatic activity on Protein content on Lig Protein content on Ca	ng p -NPL, means of triplic the beginning of the imm B solution: 2.49 ± 0.04 r IB solution: 0.90 ± 0.01	:ates ± SD. obilization process. mg/mL. mg/mL.						

thermodynamically controlled esterification process, the final conversions were very similar, except for the PMMA/PMMA biocatalysts with PFAD. Possibly, the best result of conversion with LipB instead of CalB can be attributed to the better interaction of the LipB enzyme on PMMA/PMMA support, not considering the immobilization parameters, but a possible increase in thermal stability compared with CalB lipase. It is also observed that, depending on the substrate, the synthesized biocatalysts (based on PMMA composition) showed similar (in PFAD reactions) or higher activity (in SFAD reactions) than the commercial Novozyme435.

Figure 6 shows the esterification reaction of SFAD and ethanol. Analyzing the biocatalysts produced with LipB, the highest conversion results were obtained after 3 h of reaction using PMMA/PMMA (76%), which was higher than the conversion achieved with CalB-PMMA/PMMA at the same time (68.9%). Aguieiras *et al.* $(2013)^{36}$ studied the use of Lipozyme RM IM in esterification reactions of SFAD and PFAD with ethanol. The authors obtained 63% of conversion of the FFAs, for both substrates, after 2.5 h of reaction at 50 and 60°C, with 3 wt % of lipase. The values were lower than those achieved in this work. This shows that LipB may present some comparative advantages over CalB when immobilized onto certain materials. These changes in enzyme activity/specificity have been published in other cases and show the complexity in selecting an optimal biocatalyst.⁴⁹

Souza *et al.*⁵⁰ used commercial immobilized lipases for synthesis of ethyl esters via esterification of SFAD with ethanol. The highest conversion was 83.5% using Novozyme435 (3 wt %) after 90 min and using two-stage stepwise addition of ethanol at 50°C. Using the same substrate, the conversions obtained for LipB and CalB onto the PMMA/PMMA support after 3 h of reaction were equal, respectively, to 76% and 60.7%; and after 24 h of reaction were 82.9% and 76.9%, respectively. When Novozyme435 was applied in the reactions of this work, the results obtained were of 72.4% and 72.9%. Therefore, comparing the performance of the developed biocatalysts and the commercial one (Novozyme435), it is noteworthy the promising results that have been obtained.

It is shown in Figure 7 that, when the FFA from palm oil was used (PFAD), the highest conversion was achieved when LipB-PMMA/PMMA was employed as biocatalyst (76%). Again, the biocatalysts proposed in this work showed good results, similar to the ones exhibited by Novozyme435. Comparing the reactions at 24 h, the values obtained for CalB-P(MMA-*co*-DVB)/P (MMA-*co*-DVB) was 76%, with no significance difference of the LipB- P(MMA-*co*-DVB)/P(MMA-*co*-DVB) (74%). For the other biocatalysts the best results were obtained at 24 h for LipB: the results were 73.2% and 69.4% for PMMA/PMMA and P(S-*co*-DVB)/P(S-*co*-DVB), respectively. Using CalB, the conversions were below expectations: 58.0% and 59.4% for PMMA/PMMA and P(S-*co*-DVB).

Based on the available results, it becomes evident that the most adequate biocatalyst (pair enzyme-support) is different for each reaction. So, a better knowledge regarding the features of the enzymes can aid the proper selection and development of new supports. The structure of CalB has been described in previous studies. For instance, according to crystallographic data, CalB has



Table IV. Immobilization Parameters



Figure 5. Thermal stability at 50°C. Dashed line: using 5 m*M* calcium + 25 m*M* sodium phosphate buffer pH 7; continuous line: no calcium, 25 m*M* sodium phosphate buffer pH 7. (A) Free LipB; (B) free CalB; (C) LipB-PMMA/PMMA; (D) CalB-PMMA/PMMA; (E) LipB-P(MMA-*co*-DVB)/P(MMA-*co*-DVB); (F) CalB-P(MMA-*co*-DVB)/P(MMA-*co*-DVB); (G) LipB-P(S-*co*-DVB); (H) CalB-P(S-*co*-DVB)/P(S-*co*-DVB).





Figure 6. Kinetics of fatty acids conversion in esterification reaction of SFAD with ethanol using LipB and CalB. (A) Continuous line: LipB-PMMA/PMMA; dashed line: CalB-PMMA/PMMA; circle line: Novozyme435; (B) continuous line: LipB-P(MMA-*co*-DVB)/P(MMA-*co*-DVB); dashed line: CalB-P(MMA-*co*-DVB); (C) continuous line: LipB-P(S-*co*-DVB)/P(S-*co*-DVB); dashed line: CalB-P(S-*co*-DVB)/P(S-*co*-DVB); dashed line: CalB-P(S-*co*-DVB)/P(S-*co*-DVB).

approximate dimensions of $(30 \times 40 \times 50)$ Å, molecular weight of 35,500 Da and isoelectric point of 6.¹⁰

PMMA, which resulted in the most active biocatalysts, is a synthetic organic polymer that is well known for its good biocompatibility and mechanical resistance.⁵¹ Studies indicate the efficient use of PMMA particles as supports for immobilization of lipases, also increasing the resistance of the immobilized enzyme to temperature effects.^{52,53} This increased stability of the immobilized lipases may be the cause of the better conversion results obtained in this study. The interesting results obtained with the other analyzed core-shell polymer supports must not be disregarded. For instance, the use of DVB can increase the reactivity and enable better interaction with the enzyme.³¹ However, in this study, considering the described reactions under the mentioned conditions, this was not sufficient to overcome the excellent properties of the support developed with PMMA only.

CONCLUSIONS

New core-shell polymer supports were manufactured in pilotscale through the combined suspension and emulsion polymerization process for the first time, allowing the production of polymer particles that could be used successfully for immobilization of lipases (CalB and LipB) and preparation of biocatalysts. PMMA/PMMA, P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB) and P(Sco-DVB)/P(S-co-DVB) core-shell polymer supports were produced and used for synthesis of new biocatalysts, using both CalB and LipB enzymes. The PMMA/PMMA core-shell support showed the best results for enzymatic activity and application in esterification reactions, resulting in biocatalysts with similar or higher activity than the commercial Novozyme435. It was also noticed that the addition of Ca⁺² increased significantly the stability of the produced biocatalysts, encouraging further studies in this field.



Figure 7. Kinetics of fatty acids conversion in esterification reaction of PFAD with ethanol using LIPB and CALB. (A) Continuous line: LipB-PMMA/PMMA; Dashed line: CalB-PMMA/PMMA; Circle line: Novo-zyme435; (B) continuous line: LipB-P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB); dashed line: CalB-P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB); (C) continuous line: LipB-P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB); dashed line: CalB-P(S-co-DVB)/P (S-co-DVB).


It was also shown that definition of the most appropriate enzyme-support pair depends on the particular characteristics of the analyzed reaction. The obtained biocatalysts were efficiently applied to promote esterification reactions with SFAD and PFAD, expanding the application and increasing the aggregate values of these waste materials.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank CNPq, CAPES, and FAPERJ (Processo 202.713/16) for scholarships, for financial support and for funding the project PVE 301139/2014-8. The authors gratefully recogsupport through nize the of MINECO grant CTQ2017-86170-R. The authors thank Mr. Ramiro Martínez (Novozymes, Spain) for the kind supply of the enzymes used in the present research. The authors also thank Miracema-Nuodex for donating the SFAD and Agropalma (Homero Souza and Ricardo Tinoco) for donating the PFAD. E.P.C. and M.C.C.P. performed the synthesis of the supports, immobilization of the enzymes, and wrote the manuscript. J.M.R. and R.P.V.C. were responsible for the production of the enzyme in bioreactor. The graduation students T.P.S. and T.C.B. performed the esterification reactions. J.G.F.S. performed the characterization of the supports. R.F.-L. and E.A.M. wrote the manuscript. J.C.P. and D.M.G.F. supervised the research.

REFERENCES

- 1. Ribeiro, B. D.; de Castro, A. M.; Coelho, M. A. Z.; Freire, D. M. G. *Enzyme Res.* **2011**, *2011*, 1.
- Brígida, A. I. S.; Amaral, P. F. F.; Coelho, M. A. Z.; Gonçalves, L. R. B. J. Mol. Catal. B 2014, 101, 148.
- 3. Najafpour, G.D. Industrial Microbiology, Biochem. Eng. Biotechn, Chapter 1, Second Edition **2015**, 1.
- 4. Fernandez-Lafuente, R. Enzyme Microb. Technol. 2009, 45, 405.
- 5. Bezbradica, D. I.; Mateo, C.; Guisan, J. M. J. Mol. Catal. B 2014, 102, 218.
- 6. dos Santos, J. C. S.; Rueda, N.; Gonçalves, L. R. B.; Fernandez-Lafuente, R. *Enzyme Microb. Technol.* 2015, 77, 1.
- 7. Mateo, C. Enzyme Microb. Technol. 2006, 39, 274.
- 8. Sheldon, R. a.; van Pelt, S. Chem. Soc. Rev. 2013, 42, 6223.
- 9. Manoel, E. A.; José, C. S.; Freire, D. M. G.; Rueda, N.; Fernandez-Lafuente, R. *Enzyme Microb. Technol.* 2015, 71, 53.
- 10. Uppenberg, J.; Hansen, M. T.; Patkar, S.; Jones, T. A. *Structure* **1994**, *2*, 293.
- Quilles, J. C. J.; Brito, R. R.; Borges, J. P.; Aragon, C. C.; Fernandez-Lorente, G.; Bocchini-Martins, D. A.; Gomes, E.; da Silva, R.; Boscolo, M.; Guisan, J. M. *Biochem. Eng. J.* 2015, 93, 274.
- Bastida, A.; Sabuquillo, P.; Armisen, P.; Fernandez-Lafuente, R.; Huguet, J.; Guisán, J. M. *Biotechnol. Bioeng.* 1998, 58, 486.

- Mateo, C.; Palomo, J. M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. *Enzyme Microb. Technol.* 2007, 40, 1451.
- 14. Kuwahara, Y.; Yamanishi, T.; Kamegawa, T.; Mori, K.; Yamashita, H. *ChemCatChem* **2013**, *5*, 2527.
- Manoel, E. A.; dos Santos, J. C. S.; Freire, D. M. G.; Rueda, N.; Fernandez-Lafuente, R.; *Enzyme Microb. Tech*nol. 2015, 50, 1557.
- Cipolatti, E. P.; Valério, A.; Nicoletti, G.; Theilacker, E.; Araújo, P. H. H.; Sayer, C. J. V.; Ninow, J. L.; de Oliveira, D. J. Mol. Catal. B: Enzym. 2014, 109, 116.
- Cipolatti, E. P.; Moreno-Pérez, S.; Souza, L. T. de A.; Valério, A.; Guisán, J. M.; de Araújo, P. H. H.; Sayer, C.; Ninow, J. L.; de Oliveira, D. *Pessela. J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2015, *122*, 163.
- Datta, S.; Christena, L. R.; Rajaram, Y. R. S. 3 Biotech. 2013, 3, 1.
- Kahraman, M.; Bayramoglu, G.; Kayamanapohan, N.; Gungor, A. Food Chem. 2007, 104, 1385.
- 20. Rodrigues, R. C.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Torres, R.; Fernández-Lafuente, R. *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6290.
- Cunha, A. G.; Besteti, M. D.; Manoel, E. A.; da Silva, A. A. T.; Almeida, R. V.; Simas, A. B. C.; Fernandez-Lafuente, R.; Pinto, J. C. P.; Freire, D. M. G. *J. Mol. Catal. B.* 2014, 100, 59.
- 22. Lenzi, M. K.; Lima, E. L.; Pinto, J. C. Polimeros 2004, 14, 112.
- Manoel, E. A.; Pinto, M.; dos Santos, J. C. S.; Tacias-Pascacio, V. G.; Freire, D. M. G.; Pinto, J. C.; Fernandez-Lafuente, R. RSC Adv. 2016, 6, 62814.
- 24. Pinto, M. C. C.; Freire, D. M. G.; Pinto, J. C. *Molecules* **2014**, *19*, 12509.
- 25. Scott, C. E.; Rockford, L. E. E. D. J. Vinyl Addit. Technol. 1999, 5, 125.
- 26. Besteti, M. D.; Freire, D. M. G.; Pinto, J. C. Macromol. React. Eng. 2011, 5, 518.
- 27. Gonçalves, O. H.; Asua, J. M.; De Araújo, P. H. H.; Machado, R. A. F. *Macromolecules* **2008**, *41*, 6960.
- Reddy, C. K.; Raju, L. Y.; Srinivas, P. V. S. S.; Rao, P. S.; Shekharam, T.; Shailaja, D. J. Appl. Polym. Sci. 2011, 122, 1807.
- 29. Lenzi, M. K.; Silva, F. M.; Lima, E. L.; Pinto, J. C. J. Appl. Polym. Sci. 2003, 89, 3021.
- Besteti, M. D.; Cunha, A. G.; Freire, D. M. G.; Pinto, J. C. Macromol. Mater. Eng. 2014, 299, 135.
- Robert, J. M.; Lattari, F. S.; Machado, A. C.; de Castro, A. M.; Almeida, R. V.; Torres, F. A. G.; Valero, F.; Freire, D. M. G. *Biochem Eng J.* 2017, *118*, 123.
- 32. Miroliaei, M.; Sharifi, R.; Halling, P. J. Biomed. Biotechnol. 2014, 2, 3.
- Fernandez-Lopez, L.; Bartolome-Cabrero, R.; Rodriguez, M.D.; dos Santos, C. S.; Rueda, N.; Fernandez-Lafuente, R. RSC Adv. 2015, 8, 83868.
- Manoel, E. A.; Robert, J. M.; Pinto, M. C. C.; Machado, A. C. O.; Besteti, M. D.; Coelho, M. A. Z.; Simas, A. B. C.;



Fernandez-Lafuente, Pinto, J. C. Freire, D. M. G. RSC Adv. 2016, 6, 4043.

- Melo-Espinosa, E. A.; Piloto-Rodríguez, R.; Sánchez-Borroto, Y.; Verhelst, S. Appl. Therm. Eng. 2017, 120, 187.
- Aguieiras, E. C. G.; Souza, S. L.; Langone, M. A. Quim. Nova 2013, 36, 646.
- Wahab, A. G. Oilseeds and Products Annual; GAIN: Malaysia, 2017; p 1. Available at: https://gain.fas.usda.gov/ Recent GAIN Publications/Oilseeds and Products Annual_ Kuala Lumpur_Malaysia_3-29-2017.pdf.
- Abdul Kapor, N. Z.; Maniam, G. P.; Rahim, M. H. A.; Yusoff, M. M. J. Clean. Prod. 2017, 143, 1.
- Cheryl-Low, Y. L.; Theam, K. L.; Lee, H. V. Energy Convers. Manage. 2015, 106, 932.
- 40. Kantama, A.; Narataruksa, P.; Hunpinyo, P.; Prapainainar, C. *Biomass Bioenergy* **2015**, *83*, 448.
- Visioli, L. J.; de Castilhos, F.; Cardozo-Filho, L.; de Mello, B. T. F.; da Silva, C. *Fuel Process. Technol.* **2016**, *149*, 326.
- 42. Haas, M. J. Fuel Process. Technol. 2005, 86, 1087.
- 43. de Castro, J. V.; Bevilaqua, D. M. G.; Freire, F. A.; Sant'anna, M. L. E.; Gutarra, C. A.; Barbosa, R. V.; de

Menezes, R. R.; Cunha, A. G. US 2011000 A1 – Process for production of lipases by genetic modification of yeast 1834, **2011**.

- 44. Bradford, M. M. Anal. Biochem. 1976, 72, 248.
- 45. Barth, A. Biochim. Biophys. Acta 2007, 1767, 1073.
- Jenjob, S.; Sunintaboon, P.; Inprakhon, P.; Anantachoke, N.; Reutrakul, V. *Carbohydr. Polym.* 2012, 89, 842.
- 47. Fernandez-lafuente, R.; Torres, R. *Catal. Today* **2015**, DOI: 10.1016/j.cattod.2015.05.027.
- 48. Rueda, N.; dos Santos, J. C. S.; Ortiz, C.; Barbosa, O.; Fernandez-Lafuente, R.; Torres, R. *Catal. Today.* **2015**, 259, 107.
- 49. LiuGuo, Y. C.; Liu, C. Z. Chem. Eng. J. 2015, 280, 36.
- 50. Souza, M. S.; Aguieiras, E. C. G.; Da Silva, M. A. P.; Langone, M. A. P. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2009**, *154*, 74.
- 51. Bulmuş, V.; Ayhan, H.; Pişkin, E. Chem. Eng. J. 1997, 65, 71.
- 52. Valério, A.; Nicoletti, G.; Cipolatti, E. P.; Ninow, J. L.; Araujo, P. H. H.; Sayer, C.; de Oliveira, D. *Appl Biochem Biotechol.* **2015**, *175*, 2961.
- 53. Li, S.; Hu, J.; Liu, B. Biosystems 2004, 77, 25.



Accepted Manuscript

Title: Continuous operation, a realistic alternative to fed-batch fermentation for the production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* under the constitutive promoter PGK in *Pichia pastoris*

Authors: Julia de Macedo Robert, Xavier Garcia-Ortega, José Luis Montesinos-Seguí, Denise Maria Guimaraes Freire, Francisco Valero



PII:	S1369-703X(19)30112-3
DOI:	https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.03.027
Reference:	BEJ 7198
To appear in:	Biochemical Engineering Journal
Received date:	20 November 2018
Revised date:	1 March 2019
Accepted date:	31 March 2019

Please cite this article as: de Macedo Robert J, Garcia-Ortega X, Montesinos-Seguí JL, Guimaraes Freire DM, Valero F, Continuous operation, a realistic alternative to fedbatch fermentation for the production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* under the constitutive promoter PGK in *Pichia pastoris*, *Biochemical Engineering Journal* (2019), https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.03.027

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Continuous operation, a realistic alternative to fed-batch fermentation for the production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* under the constitutive promoter *PGK* in *Pichia pastoris*

Julia de Macedo Robert,¹ Xavier Garcia-Ortega,² José Luis Montesinos-Seguí,² Denise Maria Guimaraes

Freire,¹ Francisco Valero^{2*}

¹Federal University of Rio de Janeiro, Institute of Chemistry, Department of Biochemistry, Laboratory of Microbial Biotechnology, Av. Athos da Silveira Ramos, and 149 – CT – Bloco A – Sala 549-1 – Cidade Universitária Ilha do Fundão, 21941-909, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

²Department of Chemical, Biological and Environmental Engineering, Escola d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

Corresponding author: Dr. Francisco Valero*. Francisco.Valero@uab.cat

Graphical abstract



Highlights

- Use of constitutive PGK promoter for CalB production on Pichia pastoris.
- Study of specific growth rate effect for CalB production on *Pichia pastoris*.
- Comparison between chemostat and fed-batch culture modes.
- Theoretical best operational strategy over a 6-weeks period.

1. Abstract

In this work, continuous and fed-batch operational modes for producing the recombinant protein lipase B from *Candida antarctica* under the new constitutive promoter *PGK* in the cell factory *Pichia pastoris* was assessed. For this purpose, the influence of the specific growth rate (μ) was examined from 0.05 to 0.16 h⁻¹ on various key bioprocess parameters.

The global biomass-to-substrate yield $Y_{X/S}$ and specific substrate uptake rate (q_s) were found to be independent of the particular operational mode. However, the μ -dependence of specific production rate (q_p) differed with the cultivation strategy used. Thus, q_p was linearly related in the continuous mode but suggested saturation in fed-batch cultures.

The highest volumetric and specific productivity were obtained at the highest μ levels in the continuous mode, which provided volumetric and specific productivities (Q_P and Q_e , respectively) roughly 1.5 and 3 times greater, than the fed-batch mode. The continuous mode also proved more effective in the long rung; thus, CalB production after 6 weeks was estimated to be about 5.8 times greater than with the fed-batch mode.

Continuous operation with the novel constitutive promoter *PGK* is thus a realistic alternative to the standard fed-batch cultivation at a high cell density typically used in industrial bioprocesses for heterologous protein production in *Pichia pastoris*.

Key words: Pichia pastoris, Komagataella phaffii., PGK promoter, CalB, chemostat, fed-batch.

2. Introduction

Lipases (EC 3.1.1.3) are well-known enzymes which catalyse hydrolysis- and esterification-like reactions in aqueous and non-aqueous environments [1]. The stereochemical and regiospecific properties of theses versatile enzymes make them useful for a variety of applications ranging from simple processes such as biodiesel production to more sensitive procedures such as those used by the pharmaceutical industry [2,3]. Lipase B from *Candida antarctica* (CalB) is a 33 kDa globular protein possessing Sn-3 regiospecificity for triacylglycerol and an active site consisting of Ser–Asp–His [4]. These properties have turned it into one of the most widely used lipases in biocatalytic processes [5].

Heterologous CalB has so far been produced for various classical host microorganisms including *Escherichia coli* [6], *Aspergillus oryzae* [7] and *Saccharomyces cerevisiae* [8]. Over the last decade, however, the cell factory *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) has proved an excellent alternative cell factory for this purpose [9]. This methylotrophic yeast is largely used as host to recombinant proteins by virtue of its ability to grow at high cell densities in a simple economical media and its amenability to post-translational modification with a variety of strong promoters [10–14].

The most widely studied and used promoter for CalB production is the tightly regulated methanolinducible alcohol oxidase promoter (*AOX1*), which is the first enzyme in the methanol utilization pathway [11,15,16]. Methanol-induced CalB expression can be enhanced in different ways. Expression of this protein is not affected by N74S mutation, demonstrating that glycosylation does not influence protein folding [17]. The effect of overexpression of molecular chaperones has also been examined: whereas the Ydj1p–SSa1p combination increased CalB expression by a factor of 2.5, overexpression of Kar2p decreased CalB levels [18]. The co-overexpressing enzymes in the methanol metabolic pathway have been found to affect the productivity and specific production rate of the bioprocess [19]. Thus, optimizing the CalB codon and the α factor signal peptide led to highly efficient expression [20].

However, scaling-up these production processes is made difficult by some operational shortcomings such as heat generation and increased oxygen requirements, in addition to the problems derived from methanol handling, storage and transportation, due to its high flammability, which substantial raise production costs [17,20]. These shortcomings can be circumvented by using de-repressed *AOX1* variant promoters of a high specific productivity and requiring no methanol induction [21].

The alternative promoter typically used to avoid the need for methanol is the constitutive glyceraldehyde-3-phosphate promoter (P_{GAP}). It is part of the glycolysis pathway [17,20]. One effective

alternative to P_{GAP} is the *PGK1* promoter; P_{PGK} is relative to the 3-phosphoglycerate kinase step first producing ATP in the glycolytic pathway. This promoter has proved an efficient constitutive promoter for CalB production in terms of growth and glycerol uptake cell-wise. Also, lipase obtained with P_{PGK} is similarly stable to commercial formulations of the enzyme [22], but for production scale it has still to be optimized, in which this work is focussed on.

Recombinant protein production processes can be characterized by using a fed-batch or a chemostat approach. The first one consists in a non-stationary state that gives information about the cultivation with both product and biomass accumulation throughout the bioprocess. By contrast, the chemostat approach operates under steady-state conditions [23].

Using fed-batch and chemostat cultivation systems in combination provides wealthy enough information to ensure virtually optimal development of a bioprocess. Performance with these two systems can be compared in terms of the specific substrate consumption and product generation rates (q_s and q_P , respectively). Thus, the relationships of q_s and q_P to the specific growth rate (μ) can be used to identify changes or saturation in cell physiology and metabolism.

In this work, two different production strategies including glycerol-limited fed-batches and chemostat cultivation were assessed for recombinant CalB production with the novel constitutive promoter *PGK* from *Pichia pastoris* by examining the influence of the specific growth rate on the specific rates of substrate consumption and CalB production. Also, bioprocess efficiency was assessed in terms of yield and productivity.

3. Materials and methods

3.1. Microorganism

The recombinant host strain used was *Pichia pastoris* X-33 transformed with vector pPGK Δ 3_PRO_LIPB for the P_{PGK1}-driven constitutive expression of recombinant CalB. A 954-bp version of the *C. antarctica* CalB gene corresponding to the mature protein was codon-optimized for expression in *P. pastoris* and synthesized *de novo* by Epoch Biosciences (USA). The synthetic gene, *rLipB* was cloned into the vector pPGK Δ 3AMY which contain a codon-optimized α -factor secretion signal and a Zeocin resistance cassette. Thus resulting into the pPGK Δ 3LIPB vector and rLipB, which uses Zeocin as a selection marker and the expression is regulated by the constitutive pPGK1 promoter. Further on, the rLipB was integrated into the genome by homologous recombination. The construction details for this producer strain are described elsewhere [24].

3.2. Inoculum preparation

The *P. pastoris* producer clone was stored in glycerol stocks (20%) and maintained at -80°C. To prepare the inoculum, firstly, cells were propagated on petri dish with YPD medium (10 g yeast extract, 20 g peptone and 20 g D-glucose per litre of distilled water; initial pH, 7.4) with 2% w/v agar-agar and Zeocin (100 μ g/mL). Later on, single colonies from the plate were used to inoculate 1L baffled shake flasks with 100 mL of YPD and Zeocin (100 μ g/mL), which were cultivated at 30°C and 200 rpm for 24h in an HT Multitron incubator from Infors AG (Bottmingen, Switzerland). Once the flask cultures reached the equivalent OD₆₀₀ of about 12, 100 mL of broth were used as inoculum of the bioreactor being the 10% of the fermenter working volume (1 L). Therefore, equivalent OD₆₀₀ at the beginning of the fermentation was 1.2.

3.3. Culture media

The batch culture medium used was prepared as described elsewhere [25] and contained the following amounts per litre: 2.0 g citric acid, 12.4 g (NH₄)₂HPO₄, 0.022 g CaCl₂·2H₂O, 0.9 g KCl, 0.5 g MgSO₄·7H₂O, 40 g glycerol, 2 mL Biotin (0.02%), 4.6 mL PTM1 trace salt solution (6.0 g CuSO₄·5H₂O, 0.08 g Nal, 3.0 g MnSO₄·H₂O, 0.2 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0.02 g H₃BO₃, 0.5 g CoCl₂, 20.0 g ZnCl₂, 65.0 g FeSO₄·7H₂O and 5.0 mL H₂SO₄ (95%-98%) with final acid pH 1.2). Both the biotin and PTM1 solutions were sterilized separately by filtration (0.22 μ m) and added to the fermenter once autoclaved.

The fed-batch culture medium was also prepared as described elsewhere [25] and contained the following amounts per litre: 550 g glycerol, 10 g KCl, 6.45 g MgSO₄·7H₂O, 0.35 g CaCl₂·2H₂O and 12 mL PTM₁ trace salt solution. On the other hand, the chemostat culture medium contained 0.92 g citric acid, 50 g glycerol, 4.35 g (NH₄)₂HPO₄, 0.65 g MgSO₄·7H₂O, 1.7 g KCl, 0.01 g CaCl₂·2H₂O, 1.6 mL trace salt solution and 0.2 mL antifoam Glanapon 2000kz (Bussetti and Co GmbH Wien, Austria) per litre of feeding medium.

3.4. Bioreactor cultivation

3.4.1. Fed-batch cultures

Fermentations were performed in a 3L Applikon Biobundle bioreactor from Applikon Biotechnology B.V. (Delft, The Netherlands) with an initial working volume of 1 L. Dissolved oxygen (DO) was maintained at 30% by using a cascade-control approach by which the stirring rate was changed from 500 to 1000 rpm and the

aeration rate from 0 to 1 vvm. A mixture of compressed air and pure oxygen was used whenever required, and Glanapon 2000kz anti-foam from Bussetti and Co GmbH (Wien, Austria) was added during process if needed. The reactor pH was kept at 7.0 with 15% NH₄OH and the temperature at 30 °C.

An open loop control strategy was used to implement the feeding profile during the fed-batch phase in order to the set specific growth rates by means of the carbon-source limitation under pseudo steady-state conditions. It is the most commonly used and a very well-known procedure for substrate-limited fed-batch cultivation to reach a constant specific growth rate. The feeding profile for substrate addition was derived from mass balance equations as described elsewhere [26].

3.4.2. Continuous cultures

Fermentation runs were conducted in a 2 L Biostat B plus bioreactor from Braun Biotech (Elsungen, Germany) with a working volume of 1 L. DO was kept at about 20 % (air saturation) by mixing air and pure oxygen as needed to a total aeration rate of 0.8 vvm, bioreactor was kept under 0.2 bar of manometric pressure to prevent contamination. The stirring rate was kept at 1000 rpm, pH at 7.0 with 15% NH₄OH and the temperature at 30 °C. The maximum specific growth rate obtained in batch cultures with the same culture medium was 0.20 h⁻¹. Thus, three nominal dilution rates (0.05, 0.10, 0.15 h⁻¹) were selected. In order to start with the continuous operation, a previous batch culture was performed. At the mid-late-exponential phase of the batch cultivation, and according with the selected set-point dilution rate, a constant flow rate of chemostat feeding medium was set. Inlet and outlet flow rates were checked periodically to ensure that dilution rate was maintained.

For every dilution rate, the continuous cultures were carried out for at least five residence times. In order to ensure that steady-state was achieved, several samples were taken and analysed since three residence time during three consecutive residence times up to confirming the stability of the studied parameters.

3.5. Analytical methods

3.5.1. Biomass analysis

Biomass concentrations were estimated from absorbance measurements at 600 nm made with a Hach DR3900 VIS spectrophotometer from Hach Lange GmbH (Düsseldorf, Germany).

A linear relationship with dry cell weight [DCW (g/L) = $0.3068 \cdot Abs$] was assumed. Determinations were performed in triplicate, and the residual standard deviation was approximately 5%.

3.5.2. Nitrogen determination

Nitrogen was determined by reacting ammonium ion with salicylate, sodium nitroprusside and hypochlorite in an alkaline medium that turned blue-green upon addition of the reagents. The procedure was adapted from that used by Fawcett and Scott to determine urea [27,28]. Absorbance measurements were made at 595 nm, using ammonium sulphate as standard. The relative standard deviation (RSD) was less than 5% for all the samples.

3.5.3. Titrimetric lipolytic activity assay

Enzyme activity was determined by hydrolysis, using tributyrine as substrate. Fatty acids thus released were neutralized with 0.06 M NaOH. The reaction was conducted at 40 °C at 250 rpm for 15 min [29]. One unit of lipase activity is defined as the amount of enzyme needed to catalyse the production of 1 μ mol butyric acid per minute under the assay conditions. RSD was estimated to be 5%.

3.5.4. Glycerol determination

Glycerol was determined by HPLC on an HP 1050 liquid chromatograph from Dionex Corporation (Sunnyvale, CA, USA), using an ICSep ICE COREGEL 87H3 column from Transgenomic, Inc. (Omaha, NE, USA). The temperature was kept at 40 °C and the mobile phase consisted of 0.0032 M sulphuric acid that was circulated at a flow rate of 0.5 ml/min. The injected sample volume was 20 μ L [30]. All determinations were performed in triplicate. RSD was estimated to be less than 1%.

3.6. Specific rates in the fed-batch mode

Methods based on arithmetic mean rates or time-weighted average rates needs that discrete specific rates have to be calculated for each off-line value which considers first-time derivatives of the global variables, for biomass (X), volume (V), substrate (S) and product (P): (XV), (SV) and (PV). The derivatives calculation increases the estimation error.

In this work, in order to avoid the first-time derivatives calculation, the mean specific rates in the fed-batch cultures were calculated by linear regression as described elsewhere [31]. Global state variables ((*XV*), (*SV*) and (*PV*)) were estimated within the induction time by applying the smoothing tool (Matlab R2009a Curvefit Toolbox, The Mathworks Inc., Natik, USA) from off-line data. Linear regression equations to obtain each

specific rate are derived from their corresponding mass balances within the induction time. They are integral equations due to the time-varying nature of the state variables, *X*, *S*, *P*, *V* and feeding rate *F*. The slope of each linear regression corresponds to the averaged specific rate for biomass (μ), substrate uptake (q_S) or product generation (q_P). The standard error (*SE*) of the averaged values is obtained from the linear regression data.

3.7 Maintenance coefficient in continuous and fed-batch modes

Substrate maintenance coefficient (m_s) and intrinsic substrate-to-biomass yield ($Y^G_{s/x}$) for both strategies were calculated by linearization of q_s versus μ (dilution rate D), based on *Pirt's* maintenance energy model as it is shown in equation 1. Similar calculation was performed to obtain the product maintenance coefficient (m_P) and intrinsic substrate-to-biomass yield ($Y^G_{P/x}$), according to a *Luedeking-Piret* model, by linear regression of q_p versus μ (D) as presented in equation 2.

$$q_s = Y_{s/x}^G \mu + m_s$$

$$q_P = Y_{P/x}^G \mu + m_P$$
Eq. 1
Eq. 2

Accordingly, it is expected that the higher the specific growth rate, the lower the global substrate-to-biomass yield (q_s/μ) is. In a similar way, when the specific growth rate increases, the global product-to-biomass yield (q_P/μ) decreases. In particular, for low m_s values a decrease on the global product-to-substrate (q_P/q_s) can also be observed when increasing the specific growth rate.

4. Results

4.1. Glycerol continuous cultures

One of the main advantages of using *P. pastoris* as a host for CalB production is the ability to achieve high cell densities. Because the CalB gene was expressed under the constitutive promoter *PGK*, CalB production was dependent on cell growth. As a result, the most appropriate culture system for obtaining accurate information about the physiological state of the cells was continuous cultivation; in fact, because continuous cultures evolve under a steady state, they facilitate the determination of specific rates, productivities and yields. Based on the μ_{max} value obtained with batch cultures in previous work (0.20 h⁻¹ [22]), three different nominal specific growth rates for continuous cultivation were selected to carry out this study. The actual

highest μ , 0.16 h⁻¹, one intermediate at 0.09 h⁻¹, and the lowest, 0.05 h⁻¹. Using the previous μ_{max} value was avoided in order to prevent washing-out of the bioreactor. Figures 1A–1C show the results for the CalB production, specific rates and yields.

As expected, the biomass concentration remained virtually constant throughout the dilution rate range studied. CalB activity decreased slightly with increasing dilution rate (Figure 1A), which contradicts previous results in the production of antibody fragment Fab under similar conditions [30], and also that of human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) [32]. Clearly, different target recombinant proteins can exhibit different production patterns. Although both previous studies used glucose rather than glycerol as carbon source, this is unlikely to have been the reason for the difference from our results. In fact, as can be seen from Figures 1A and 1B, *Y*_{X/S} was about 0.48 gx/g_{Gly} whichever the dilution rate and similar to the values obtained with batch cultures [22]. However, global product yields (*Y*_{P/S} and *Y*_{P/X}) decreased slightly with increase in the dilution rate. This is in accordance with a *Pirt's* maintenance energy model for substrate uptake with a low maintenance coefficient and a *Luedeking-Piret* model for production kinetics as presented in materials and methods section.

As can be seen from the specific substrate consumption and CalB production rates in Figure 1C, the specific glycerol uptake rate was linearly related to the dilution rate. The resulting maintenance coefficient (m_s) was 0.01 $g_{Gly}/(g_x \cdot h)$ and the intrinsic substrate-to-biomass yield $(Y^{G}_{5/X})$ 2.04 (g_{Gly}/g_x) . As a result, the overall $Y_{X/S}$ value remained quite constant at 0.5 g_X/g_{Gly} throughout the range of dilution rates. Correlation between specific CalB production and the dilution rate was lower and activity decreased with increasing rate. The intrinsic product-to-biomass yield $(Y^{G}_{P/X})$ was 343 U/gx and the maintenance coefficient (m_p) 5.8 U/(gx·h). hGM-CSF production exhibited a different trend (viz., a concave curve indicating that q_p increased marginally faster than the dilution rate). However, CalB production exhibited a slight decrease in titre at the highest dilution rate suggesting that extracellular production was slowed down. As previously observed with other recombinant lipase production systems, this result may have been a consequence of a problem associated to unfolding of the protein at the highest specific growth rates. Thus, Zhong et al. [33] examined the production of human interleukin-10 and found increased specific growth rates associated to also increased temperatures to cause prolonged retention of immature molecules on the endoplasmic reticulum and to eventually lead to stress and diminished production.

Figure 2 illustrates the influence of the dilution rate on the volumetric and specific productivity (Q_P and Q_e), respectively. CalB volumetric productivity increased 3-fold with increasing dilution rate (from 449

U/L·h at D \approx 0.05 h⁻¹ to 1331 U/L·h at D \approx 0.16 h⁻¹). This was also the case with the specific productivity, which was 3 times higher at the highest dilution rate than at the lowest.

4.2. Glycerol-limited fed-batch cultures

Fed-batch cultivation is an efficient method for supplying large amounts of carbon source in order to obtain high cell densities without metabolic repression. The carbon source was added to the fed phase by using a pre-programmed exponential feed rate allowing a pseudo steady state to be maintained at a constant specific rate under glycerol-limited conditions (viz., a zero glycerol concentration in the medium). This openloop control system was programmed based on mass balance equations and updated at 1 min intervals irrespective of the particular variable to be measured [26].

Specific growth rates, similar to those employed in the continuous mode, were considered (specifically, 0.06, 0.11 and 0.14 h⁻¹) to assess their effect on CalB production. However, the maximum μ setpoint was lower than the μ_{max} value obtained in the batch experiments (0.14 vs 0.20 h⁻¹) in order to prevent glycerol accumulation.

By way of example of the time course of the main process variables under the optimum CalB production conditions ($\mu = 0.14 \text{ h}^{-1}$), Figure 3A shows the glycerol concentration, biomass concentration and CalB activity, and Figure 3B the mean specific rates (μ , q_5 and q_P) as calculated from the slopes of linear regression curves (see Section 3). The standard error of the averaged values was also obtained from the linear regression data.

As noted earlier, glycerol was depleted and the specific growth rate was close to the set-point throughout the fed-phase in all bioprocesses. These results confirm the robustness of the strategy based on exponential substrate feeding derived from mass balances.

As expected when using a constitutive promoter, biomass production and CalB activity increased in parallel. Nitrogen analysis revealed that the lowest values were reached at the end of the fed-batch at concentration not lower than 4 g/L. Therefore, glycerol was the limiting factor throughout the production process.

As typically observed in fed-batch fermentations under constitutive inducers [31], q_s and q_P also remained quite constant throughout the fed-batch process. Figures 4A–4C show the CalB activity, yields and mean specific rates obtained at the different growth rates studied. As can be seen, the final CalB activity was linearly related to the specific growth rate and reached a maximum value of 31.2·10³ U/L at the highest rate.

However, $Y_{P/X}$ and $Y_{P/S}$ had a maximum value at the intermediate specific growth rate tested (Figures 4A and 4B), but $Y_{X/S}$ was quite constant and independent on μ .

The variation of the specific substrate consumption and CalB production rates with the specific growth rate, Figure 4C, was more informative. As expected, q_s was linearly related to μ ; also, it was quite similar to the values for Fab production with glucose as substrate under the promoter *GAP* [31]. The resulting maintenance coefficient (m_s) was negligible and the overall biomass-to-substrate yield ($Y_{x/s}$) 0.50 g_x/g_{Gly}.

The relationship of specific CalB production to the specific growth rate was different from that of q_s . Although CalB production peaked at the highest rate, the two variables were non-linearly related. In fact, as previously found in Fab production under the promoter GAP [31], the plot of q_P against μ was a saturation curve.

Figure 5 illustrates the effect of the specific growth rate on the volumetric and specific productivity (Q_P and Q_e , respectively). Productivities were calculated with provision for the whole processing time, which included the batch and fed-batch phases, in order to easily and more accurately compare them with those for other operational modes and strategies. As can be seen, Q_P and Q_e evolved rather differently. Thus, the specific productivity increased almost linearly with increasing μ , whereas the volumetric productivity exhibited a saturation pattern at high μ values.

4.3. Comparison of operational modes and strategies

The continuous and fed-batch operation modes are compared for performance in terms of final product titre, yields and productivities in Tables 1A and B, and of specific rates and kinetics in Tables 2A and 2B.

The overall $Y_{X/S}$ value was quite constant and similar at all specific growth rates, albeit slightly higher with the fed-batch cultures (0.50 vs 0.48 $g_{X/g_{Gly}}$). CalB activity with fed-batch cultures peaked at $31.2 \cdot 10^3$ U/L at the highest μ value used (0.14 h⁻¹). By contrast, continuous cultures led to a slight decrease in CalB activity with increase in μ .

 $Y_{P/X}$ was also quite constant (ca. 400 U/g_x) irrespective of the operational mode; however, it exhibited a slight linear decrease with increasing specific growth rate in the continuous mode but peaked at the intermediate μ level in the fed-batch mode.

Figures 6A and 6B illustrate the differences in q_s and q_p between the two operational modes. As can be see, the specific substrate uptake rate was essentially similar with both modes, which suggests that the cell growth metabolism was independent of the particular mode. Also, $Y_{X/S}$ was virtually independent of μ as

a result of the maintenance term being negligible in the fed-batch mode and very small in the continuous mode.

According to the literature, the intrinsic $Y^{G}_{X/S}$ value for glycerol in the production of proteins under P_{GAP} typically ranges from 0.43 to 0.61 g_X/g_{Gly} and the maintenance coefficient (m_s) from 0.009 to 0.032 $g_{Gly}/(g_X \cdot h)$ [9,32]. Our values under P_{PGK} fell in these ranges: 0.49 g_X/g_{Gly} and 0.01 $g_{Gly}/(g_X \cdot h)$ in the continuous mode, and 0.50 g_X/g_{Gly} and a negligible m_s value in the fed-batch mode. Based on these results, using the P_{PGK} instead of P_{GAP} , no appreciable influence on the specific uptake rate of the carbon source selected was observed.

The variation of q_P differed somehow between the two operational modes. Thus, although q_P values were quite similar, they were linearly dependent on μ in the chemostat but not at the highest rate in the fed-batch mode. Also, a clearly linear trend was observed in the continuous mode but saturation near the highest μ value in the fed-batch mode.

The highest global $Y_{P/X}$ value as calculated from the q_P vs μ plots (about 423 U/g_X) was obtained at the intermediate μ level in the fed-batch mode. By contrast, global $Y_{P/X}$ was linearly correlated with μ and had an intrinsic value of 343 U/g_X in the continuous mode, where m_P was 5.8 U/(g_X·h). These differences may have arisen from the intrinsic nature of fed-batch cultures, were the cell population is usually heterogeneous.

Although the volumetric productivity was quite similar with both modes at the low and intermediate μ levels, it peaked at 1331 U/L·h at the highest μ level in the continuous mode. The better performance of the continuous mode was more apparent in terms of specific productivity, which was more than 3 times higher at all μ levels. Also, final biomass production under continuous operation was up to 4 times lower than with fed-batch cultivation. Therefore, on identical product yields, productivity in the continuous mode can be substantially increased by increasing the biomass concentration.

In a previous study, simply using 4 glycerol pulses of 25 g/L during the exponential cell growth phase [22] provided a higher global $Y_{P/X}$ value than using the continuous or fed-batch mode (561 U/g_X vs 449 and 423 U/g_X, respectively). Unfortunately, comparing our CalB production titres with previously reported values is made rather difficult by the different lipase activity tests and conditions used in their determination. In fact, most such values were obtained with 4-nitrophenyl esters —which are known not be the most suitable substrates for CalB [22]— and colorimetric measurements.

Industrial CalB production depends markedly on the volumetric and specific productivity. The maximum running time performance for continuous operation was 6 weeks at actual $\mu = 0.14$ h⁻¹ in steady state conditions. This long run was carried out with the aim to obtain fresh CalB lipase to be used for biocatalysis applications. The potential of the two modes examined here was assessed by the estimation of the maximum possible total CalB production (U) over a period of 6 weeks. The best mode was established with provision for its volumetric productivity, flow rates and bioreactor volume (2.33 mL/min in the exit liquid flow rate in the continuous mode and a final volume of 2,5 L in the fed-batch mode) and under the assumption that 17 h in each 53-h production cycle was used to set up, drain out, clean and re-assemble and were thus unproductive —by contrast, only the time needed for the initial set-up and batch were assumed unproductive under continuous operation. Under these conditions, CalB production over 6 weeks would amount to an estimated 3.24·10⁷ U with the fed-batch mode and to an impressive, 5.8 times greater value (1.89·10⁸ U), with the continuous cultivation.

Thus, from the results obtained in the trade-off for cultivation strategies, the continuous operation has been shown as a realistic and more advantageous alternative, even with both lower biomass concentration and working volume. Very much higher volumetric and specific productivities are expected for the continuous cultivation with low-demanding space and mass transfer requirements. Although the operating costs of the two operating modes should also be considered, the final selection is unlikely to change because, due to lower cell density on the exit stream for the continuous mode, downstream processing should be easier than the needed for fed-batch operation.

5. Conclusions

A sound understanding of the kinetics of protein production (specifically, of the variation of the specific production rate (q_P) with the specific growth rate (μ) is essential with a view to choosing the most appropriate operational mode for scaling-up bioprocesses.

The global biomass-to-substrate yield ($Y_{X/S}$) was independent of the specific growth rate (μ) with both types of culture operation. Based on this result, and on the fact that that specific uptake rate (q_S) was similar with both modes, one can conclude that the new constitutive P_{PGK} has no effect on cell physiology and provides values similar to those of the classic P_{GAP} .

Specific production rate of lipase B from *Candida antarctica* under P_{PGK} in *Pichia pastoris* peaked at the maximum specific growth used in both the continuous mode (59.1 U/g_X·h) and the fed-batch mode (52.3 U/g_X·h). However, the global product-to-biomass yield ($Y_{P/X}$) peaked at the lowest specific growth rate in the continuous mode and at the intermediate μ level in the fed-batch mode. Therefore, this variable was influenced by the operational mode used.

The bioprocess was successfully optimized in terms of volumetric and specific productivity (Q_P and Q_e , respectively) in both modes. Bioprocess efficiency was substantially increased by a dilution rate of ca. 0.16 h⁻¹ in the continuous mode, the resulting Q_P and Q_e values being roughly 1.5 and 4.8 times greater, respectively, than those for the fed-batch mode.

Even though the CalB activity obtained was lower, the continuous mode is to be preferred for longterm operation. In fact, CalB production after 6 weeks with this mode was estimated to be 5.8 times higher than with fed-batch operation.

Industrial heterologous protein production has traditionally relied on high-cell density cultures in the fed-batch mode. Nevertheless, current trends are moving from fed-batch to continuous operation, being this recently discussed for *P. pastoris* [34]. As shown in the present work, continuous operation with the novel constitutive promoter *PGK* is an advantageous and realistic alternative for this purpose.

6. Acknowledgements

We are grateful to CAPES/DGPU (Brazil) for funding this work and to Laboratório de Biologia Molecular from UNB (Brazil) for supplying the *C. antarctica* strain used. Additional funding was provided by MINECO/FEDER (Project CTQ2016-74959-R). The Spanish group is a member of 2017-SGR-1462 and the Reference Network in Biotechnology (XRB, Generalitat de Catalunya).

7. References

[1] E.M. Anderson, K.M. Larsson, O. Kirk, One biocatalyst–many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis, Biocatal. Biotransfor. 16 (1998) 181–204. doi:10.3109/10242429809003198.

[2] E.C.G. Aguieiras, E.D. Cavalcanti-Oliveira, A.M. De Castro, M.A.P. Langone, D.M.G. Freire, Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of

vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts, Fuel 135 (2014) 315–321. doi:10.1016/j.fuel.2014.06.069.

[3] E.A. Manoel, J.M. Robert, M.C.C. Pinto, A.C.O. Machado, M.D. Besteti, F. M.A.Z. Coelho, A.B.C. Simas, R. Fernandez-Lafuente, J.C. Pinto, D.M.G. Freire, Evaluation of the performance of differently immobilized recombinant lipase B from *Candida antarctica* preparations for the synthesis of pharmacological derivatives in organic media, RSC Adv. 6 (2016) 4043–4052. doi:10.1039/c5ra22508f.

[4] O. Kirk, M.W. Christensen, Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin, Org. Process Res. Dev. 6 (2002) 446–451. doi:10.1021/op0200165.

[5] V. Gotor-Fernández, E. Busto, V. Gotor, *Candida antarctica* lipase B: An ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds, Adv. Synth. Catal. 348 (2006) 797–812. doi:10.1002/adsc.200606057.

[6] A. Ujiie, H. Nakano, Y. Iwasaki, Extracellular production of *Pseudozyma* (*Candida*) *antarctica* lipase B with genuine primary sequence in recombinant Escherichia coli, J. Biosci. Bioeng. 121 (2016) 303–309. doi:10.1016/J.JBIOSC.2015.07.001.

[7] I. Høegh, S. Patkar, T. Halkier, M.T. Hansen, Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in Aspergillus oryzae, Can. J. Bot. 73 (1995) 869–875. doi:10.1139/b95-333.

[8] J. Whang, J. Ahn, C.S. Chun, Y.J. Son, H. Lee, E.S. Choi, Efficient, galactose-free production of *Candida antarctica* lipase B by GAL10 promoter in Δgal80 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*, Process Biochem. 44 (2009) 1190–1192. doi:10.1016/J.PROCBIO.2009.06.009.

[9] V. Looser, B. Bruhlmann, F. Bumbak, C. Stenger, M. Costa, A. Camattari, D. Fotiadis, K. Kovar, Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: A review, Biotechnol. Adv. 33 (2015) 1177– 1193. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.05.008.

[10] G. Potvin, A. Ahmad, Z. Zhang, Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review, Biochem. Eng. J. 64 (2012) 91–105. doi:10.1016/j.bej.2010.07.017.

[11] J.M. Cregg, J.L. Cereghino, J. Shi, D.R. Higgins, Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*, Mol. Biotechnol. 16 (2000) 23–52. doi:10.1385/MB:16:1:23.

[12] M. Ahmad, M. Hirz, H. Pichler, H. Schwab, Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production, Appl. Microbiol. Biotechnol. 98 (2014) 5301–5317. doi:10.1007/s00253-014-5732-5.

[13] V. Juturu, J.C. Wu, Heterologous protein expression in *Pichia pastoris*: Latest research progress and applications, ChemBioChem 19 (2018) 7–21. doi:10.1002/cbic.201700460.

[14] Z. Yang, Z. Zhang, Engineering strategies for enhanced production of protein and bio-products in *Pichia pastoris*: A review, Biotechnol. Adv. 36 (2018) 182–195. doi:10.1016/j.biotechadv.2017.11.002.

[15] J.C. Rotticci-Mulder, M. Gustavsson, M. Holmquist, K. Hult, M. Martinelle, Expression in *Pichia pastoris* of *Candida antarctica* lipase B and lipase B fused to a cellulose-binding domain, Protein Expr. Purif. 21 (2001) 386–392. doi:10.1006/prep.2000.1387.

[16] M. Jahic, M. Gustavsson, A.K. Jansen, M. Martinelle, S.O. Enfors, Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes, J. Biotechnol. 102 (2003) 45–53. doi:10.1016/S0168-1656(03)00003-8.

[17] M.W. Larsen, U.T. Bornscheuer, K. Hult, Expression of *Candida antarctica* lipase B in *Pichia pastoris* and various *Escherichia coli* systems, Protein Expr. Purif. 62 (2008) 90–97. doi:10.1016/j.pep.2008.07.012.

[18] A.K.P. Vadhana, P. Samuel, R.M. Berin, J. Krishna, K. Kamatchi, S. Meenakshisundaram, Improved secretion of *Candida antarctica* lipase B with its native signal peptide in *Pichia pastoris*, Enzyme Microb. Technol. 52 (2013) 177–183. doi:10.1016/j.enzmictec.2013.01.001.

[19] F.W. Krainer, C. Dietzsch, T. Hajek, C. Herwig, O. Spadiut, A. Glieder, Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* strains with an engineered methanol utilization pathway, Microb. Cell Fact. 11 (2012) 22. doi:10.1186/1475-2859-11-22.

[20] J. K. Yang, L. Y. Liu, J. H. Dai, Q. Li, De novo design and synthesis of *Candida antarctica* lipase B gene and α -factor leads to high-level expression in *Pichia pastoris*, PLoS One 8 (2013) e53939. doi:10.1371/journal.pone.0053939.

[21] V. Looser, D. Lüthy, M. Straumann, K. Hecht, K. Melzoch, K. Kovar, Effects of glycerol supply and specific growth rate on methanol-free production of CalB by P. pastoris: functional characterisation of a novel promoter, Appl. Microbiol. Biotechnol. 101 (2017) 3163–3176. doi:10.1007/s00253-017-8123-x.

[22] J.M. Robert, F.S. Lattari, A.C. Machado, A.M. de Castro, R.V. Almeida, F.A.G. Torres, F. Valero, D.M.G. Freire. Production of recombinant lipase B from *Candida antarctica* in *Pichia pastoris* under control of the promoter PGK using crude glycerol from biodiesel production as carbon source, Biochem. Eng. J. 118 (2016) 123–131. doi:10.1016/j.bej.2016.11.018.

[23] O. Cos, R. Ramón, J.L. Montesinos, F. Valero, Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review, Microb. Cell Fact. 5 (2006) 17. doi:10.1186/1475-2859-5-17.

[24] A.M. de Castro, J.V. Bevilaqua, D.M.G. Freire, F.A. Torres, L.M.M. Sant'anna, M.L.E. Gutarra, C.A. Barbosa, R.V. Almeida, R.R. de Menezes, A.G. Cunha US 20110183400 A1 - Process for production of lipases by genetic modification of yeast, 2011.

[25] M. Maurer, M. Kühleitner, B. Gasser, D. Mattanovich, Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with *Pichia pastoris*, Microb. Cell Fact. 5 (2006) 37. doi:10.1186/1475-2859-5-37.

[26] O. Cos, D. Resina, P. Ferrer, J.L. Montesinos, F. Valero, Heterologous production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* using the alcohol oxidase and formaldehyde dehydrogenase promoters in batch and fed-batch cultures. Biochem. Eng. J. 26 (2005) 86–94. doi:10.1016/j.bej.2005.04.005.

[27] J.K. Fawcett, J.E. Scott, A rapid and precise method for the determination of urea, J. Clin. Pathol. 13 (1960) 156–159. doi:10.1136/jcp.13.2.156.

[28] A. Tabacco, F. Meiattini, E. Moda, P. Tarli, Simplified enzymic/colorimetric serum urea nitrogen determination, Clin. Chem. 25 (1979) 336–337.

[29] D.M. Freire, E.M. Teles, E.P. Bon, G.L. Sant' Anna, Lipase production by *Penicillium restrictum* in a bench-scale fermenter: Effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration, Appl. Biochem. Biotechnol. 63–65 (1997) 409–421. doi:10.1007/BF02920442.

[30] X. Garcia-Ortega, N. Adelantado, P. Ferrer, J.L. Montesinos, F. Valero, A step forward to improve recombinant protein production in *Pichia pastoris*: From specific growth rate effect on protein secretion to carbon-starving conditions as advanced strategy, Process Biochem. 51 (2016) 681–691. doi:10.1016/j.procbio.2016.02.018.

[31] X. Garcia-Ortega, P. Ferrer, J.L. Montesinos, F. Valero, Fed-batch operational strategies for recombinant Fab production with *Pichia pastoris* using the constitutive GAP promoter, Biochem. Eng. J. 79 (2013) 172–181. doi:10.1016/j.bej.2013.07.013.

[32] Y.P. Khasa, A. Khushoo, L. Srivastava, K.J. Mukherjee, Kinetic studies of constitutive human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) expression in continuous culture of *Pichia pastoris*, Biotechnol. Lett. 29 (2007) 1903–1908. doi:10.1007/s10529-007-9473-8.

[33] Y. Zhong, L. Yang, Y. Guo, F. Fang, D. Wang, R. Li, M. Jiang, W. Kang, J. Ma, J. Sun, W. Xiao, Hightemperature cultivation of recombinant *Pichia pastoris* increases endoplasmic reticulum stress and decreases production of human interleukin-10, Microb. Cell Fact. 13 (2014) 1–10. doi:10.1186/s12934-014-0163-7.

[34] Cankorur-Cetinkaya, A., Narraidoo, N., Kasavi, C., Slater, NKH., Archer, DB., Oliver, SG. Process development for the continuous production of heterologous proteins by the industrial yeast, *Komagataella phaffii*, Biotechnol Bioeng. 2018, 115(12), 2962–73. doi:10.1002/bit.26846.

Figure legends



Figure 1: Main bioprocess parameters for continuous cultures of *P. pastoris* grown at a 0.05, 0.09 and 0.16 h^{-1} dilution rate on glycerol under promoter PGK. (A) Global product-to-biomass yield ($Y_{P/X}$, \bigcirc) and CalB activity (\Box). (B) Global product-to-substrate yield ($Y_{P/S}$, \bigtriangledown) and Global biomass-to-substrate yield ($Y_{X/S}$, \triangle). (C) Specific substrate uptake rate (q_S , \diamondsuit) and specific production rate (q_P , \times).



Figure 2: Influence of the dilution rate on the volumetric (\Box) and specific productivity (\triangle) with continuous cultures.



Figure 3: Main state variables and mean specific rates for *P. pastoris* fed-batch cultures growing at $\mu = 0.14$ h⁻¹ on glycerol. Only the results for the fed-batch phase are shown. (A) Biomass concentration (\blacktriangle), CalB activity (\blacksquare) and glycerol concentration (\blacktriangledown). (B) Determination of the mean specific rates: specific growth rate (μ , \blacktriangle), specific glycerol uptake rate (q_s , \blacktriangledown) and specific CalB production rate (q_P , \blacksquare).





Figure 4: Main bioprocess parameters for fed-batch cultures of *P. pastoris* growing at a mean specific growth rate of 0.06, 0.11 or 0.14 h⁻¹ on glycerol under PGK. (A) Global product-to-biomass yield ($Y_{P/X}$, \bullet) and CalB activity (\blacksquare). (B) Global product-to-substrate yield ($Y_{P/S}$, ∇) and Global biomass-to-substrate yield ($Y_{X/S}$, \blacktriangle). (C) Specific substrate uptake rate (q_S , ∇) and specific production rate (q_P , \blacksquare).

С



Figure 5: Influence of the mean specific growth rate (μ) on volumetric productivity (\blacksquare) and specific productivity (\blacktriangle) with fed-batch cultures.



Figure 6: Comparison of the kinetics of *P. pastoris* growing on glycerol under *PGK* in both operational modes. (A) Glycerol uptake rate (q_s) in the chemostat (\bigtriangledown) and fed-batch mode (\blacktriangledown). (B) Specific CalB production rate (q_P) in the chemostat (\Box) and fed-batch mode (\blacksquare).

Experimental µ (h ⁻¹)	Biomass <i>(X)</i>	CalB activity (10 ³ U/L)	Y _{x/s} (gx/g _{Gly})	Ү _{Р/Х} (U/gx)	Q₽ (U/L∙h)	Qe (U/gx∙h)
0.05	20.2 ± 0.4	9.88 ± 0.19	0.46 ± 0.01	449 ± 25	449 ± 9	20.4 ± 2.3
0.09	20.4 ± 0.2	9.51 ± 0.04	0.48 ± 0.01	423 ± 21	864 ± 6	38.4 ± 1.6
0.16	22.4 ± 0.3	8.48 ± 0.26	0.48 ± 0.01	377 ± 7	1331 ± 39	59.1 ± 4.7

8. Table 1A. Summary of the main bioprocess parameters obtained in chemostat cultures. ± indicates SD.

9. Table 1B. Summary of the main bioprocess parameters obtained in fed-batch operation. ± indicates SD.

Experimental µ (h ⁻¹)	Biomass <i>(X_{MAX})</i>	CalB activity <i>(10³ U/L)</i>	Yx/s (gx/g _{Gly})	Y _{P/X} (U/gx)	Q₽ (U/L·h)	Qe (U/gx∙h)
0.06	93.4 ± 1.3	20.4 ± 0.1	0.51 ± 0.01	323 ± 19	402 ± 11	4.3 ± 0.4
0.11	87.4 ± 3.5	27.9 ± 0.3	0.51 ± 0.01	423 ± 16	796 ± 62	9.1 ± 0.9
0.14	70.7 ± 2.5	31.2 ± 0.2	0.50 ± 0.01	377 ± 17	868 ± 45	12.3 ± 1.0

10. Table 2A. Specific rates and kinetics for substrate uptake and product generation in continuous cultures.
 ± indicates SD or SE from regression analysis

Experimental μ (h ⁻¹)	qs (g _{Gly} /gx.h)	Ys/x (g _{Gly} /gx)	ms (g _{Gly} /gx.h)	q₽ (U/gx.h)	Y _{P/X} (U/gx)	m₽ (U/gx.h)
0.05	0.10 ± 0.01			20.4 ± 2.3		
0.09	0.19 ± 0.01	2.04 ± 0.03	0.01 ± 0.01	38.4 ± 1.6	343 ± 21	5.8 ± 2.3
0.16	0.33 ± 0.01			59.1 ± 4.7		

11. Table 2B. Specific rates and kinetics for substrate uptake and product generation in fed-batch cultures. ± indicates SE from regression analysis

Experimental µ (h ⁻¹)	qs (g _{Gly} /gx.h)	Ys/x (g _{Gly} /gx)	ms (g _{Gly} /gx.h)	q₽ (U/gx.h)	Ү _{Р/Х} (U/gx)	m₽ (U/gx.h)
0.06	0.12 ± 0.01			19.4 ± 1.3		
0.11	0.22 ± 0.01	1.99 ± 0.04	negligible	47.5 ± 1.8	Non-linear	Non-linear
0.14	0.28 ± 0.01			52.3 ± 1.0		

BIOTECHNOLOGY AND INDUSTRIAL MICROBIOLOGY - RESEARCH PAPER

Increase of *Candida antarctica* lipase B production under PGK promoter in *Pichia pastoris*: effect of multicopies

Julia Macedo Robert¹ • Maritza Ocampo Betancur² • Antonio Carlos Oliveira Machado¹ • Andrelisse Arruda² • Viviane Castelo Branco Reis² • Rodrigo Volcan Almeida³ • Fernando Araripe Gonçalves Torres² • Pau Ferrer Alegre⁴ • Francisco Valero⁴ • Denise Maria Guimarães Freire¹

Received: 13 September 2018 / Accepted: 3 January 2019 © Sociedade Brasileira de Microbiologia 2019

Abstract

The effect of gene dosage on the production of *Candida antarctica* lipase B (CalB) in the methylotrophic yeast *Komagataella phaffii*, at high densities in a simple medium containing crude glycerin as the sole carbon source, is described. The use of crude glycerin, the main by-product of biodiesel production from vegetable oils, will reduce the production cost of the bioprocess. Two *K. phaffii* strains were constructed with one or three copies of LipB, an optimized version of the gene encoding CalB under the control of the constitutive P_{PGK1} promoter. These two constructs were tested and compared on batches using minimal-salts medium with crude glycerin. The strain with three copies achieved a higher enzyme yield (48,760 U/L, 2.3-fold higher than the one-copy strain), with 42 g/L biomass, with no effects on growth.

Keywords Candida antarctica, lipase $B \cdot Komagataella phaffii \cdot Constitutive expression \cdot Multicopy vector integration \cdot Gene dosage$

Introduction

The yeast *Candida antarctica* is capable of producing two lipases, lipase A (CalA) and lipase B (CalB). The latter is one of the lipases most used for biocatalysis thanks to its high enantioselectivity with a broad range of substrates and good thermal stability [1–3]. From an industrial angle, CalB tested has high efficiency in transesterification [4] and also catalyze alcoholysis to produce biodiesel [5, 6]. CalB is

Julia de Macedo Robert and Maritza Ocampo Betancur contributed equally to this work.

Responsible Editor: Gisele Monteiro

Electronic supplementary material The online version of this article (https://doi.org/10.1007/s42770-019-00056-8) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Francisco Valero francisco.valero@uab.cat

- Denise Maria Guimarães Freire freire@iq.ufrj.br
- ¹ Institute of Chemistry, Department of Biochemistry, Laboratory of Microbial Biotechnology, Federal University of Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos, 149 – CT – Bloco A – Sala 549-1 – Cidade Universitária – Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ 21941-909, Brazil

produced commercially by Novozymes as a recombinant enzyme from *Aspergillus niger*, which is widely used in organic synthesis for resolution of racemic mixtures of alcohols, amines, and acids or in the preparation of optically active compounds [2, 7]. The 33 kDa CalB has the following characteristics: isoelectric point of 6.0, 15% retained activity after 20 min of incubation at 70 °C pH 7, stable in basic pH [7–10] and regiospecificity of hydrolysis of triacylglycerol Sn-3 [7].

- ² Department of Cell Biology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, DF 70910-900, Brazil
- ³ Institute of Chemistry, Department of Biochemistry, Laboratory of Molecular Microbiology and Proteins, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil
- ⁴ Department of Chemical, Biological and Environmental Engineering, Escola d'Enginyeria, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193, Bellaterra, Barcelona, Spain





The methylotrophic yeast *Komagataella phaffii* (formerly known as *Pichia pastoris*) has several advantages over other eukaryotic or prokaryotic systems as an expression platform for CalB production [1]: high productivity in simple medium containing glycerol as the sole carbon source [2]; growth at high cell densities [3]; well-established fermentation protocols [4]; GRAS status [5]; ability to perform various post-translational modifications, including glycosylation, methylation, acylation, and proteolysis; and [6] extracellular soluble-protein purification [8, 9].

Most vectors developed for K. phaffii are based on the methanol-induced P_{AOXI} promoter [10]. However, the use of methanol may be undesirable in large-scale fermentation processes because of its flammability and toxicity. Variants of P_{AOXI} are being developed, in order to regulate the production without the need for methanol, but the production rates are not as well studied as the classic P_{AOXI} [11]. Constitutive expression systems represent an attractive alternative, with the advantage that different carbon sources can be employed, including crude glycerol, a by-product of the biodiesel industry [12]. The most commonly used promoter is P_{GAP} which is strongly regulated and capable of hyperexpression [13]. Other promoters of the glycolytic pathway can be explored, such as a reduced-version P_{PGKI} used in this study, which has potential for use in the development of new engineered pathways [14].

In order to improve the protein production of K. phaffii, several studies have focused on increasing the copy number of the desired gene, using different approaches such as in vitro multimerization, PVTA (post-transformational vector amplification), integration targeted to the rDNA locus, and the use of defective markers [15]. The drug-resistance genes Sh ble and kan (zeocin and G418 resistance, respectively) are typically used to select yeast multicopy clones. Although the use of these markers is laborious and requires expensive antibiotics, they can be used in wild-type yeast strains and provide the opportunity to obtain a multicopy strain. In most cases, a higher gene dosage may greatly enhance the expression of recombinant protein. However, an excessively high gene dosage will lead to a plateau in expression, and may even be detrimental [16, 17]. A high level of overexpression of heterologous proteins in K. phaffii saturates or overloads the secretory pathway, or even triggers the protein to unfold [18].

Defective markers are typically auxotrophic genes, which are transcriptionally impaired. In this case, prototrophy is normally obtained when several copies of the transforming vector are present to compensate for the weak transcription from the defective marker [19]. This approach has been used successfully to obtain multicopy transformants in many types of yeast, such as *Saccharomyces cerevisiae* [20–22], *Yarrowia lipolytica* [23, 24], and *Hansenula polymorpha* [25]. Recently, Betancur et al. [26] developed a transformation system for *K. phaffii* based on the leucine-defective marker *leu2*- *d*, which proved to be an easy and efficient way to obtain multicopy integration of the desired gene after a single transformation event.

In this study, we sought the development of *K. phaffii* strains that express a synthetic gene coding for CalB under the control of a constitutive promoter, P_{PGKI} , and evaluated the effect of gene dosage in order to improve lipase production. In addition, we evaluated several fermentation batches based on crude glycerol as the sole carbon source, in order to compare the productivity of each strain in a controlled environment.

Material and methods

Material

The crude glycerol used in this study was derived from biodiesel synthesis from soybeans and was kindly provided by Petrobras (Rio de Janeiro, Brazil). The main features of this crude glycerol were: density 1.25 g/L, NaCl content about 7 g/ L, and less than 1000 ppm methanol. The purity of the glycerol was 84%.

Strains and media

Chemically competent *Escherichia coli* StellarTM (Clontech, USA) and XL10-Gold® (Stratagene, USA) were used for the DNA cloning procedures. Bacterial cells were cultured in LB modified medium (in *w*/*v*, 1% peptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7.2), with 100 µg/mL ampicillin or 50 µg/mL kanamycin added when necessary, at 37 °C and 200 rpm. Low-salt LB (0.5% *w*/*v* NaCl) was used for selection with zeocin (25 µg/mL). Solid medium was prepared by adding 1.5% agar.

K. phaffii X-33 (Invitrogen) and M12 (*leu2*) [26] were used for lipase expression. *K. phaffii* was routinely cultured in YPD medium (in *w/v*, 1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) at 28 °C and 200 rpm. For transformation, *K. phaffii* X-33 cells were plated on YPDS (YPD with 1 M sorbitol) with 100 µg/ mL zeocin added, while M12 cells were selected on MD medium (1.34% yeast nitrogen base without amino acids—YNB, 2% glucose, 4×10^{-5} % biotin). Lipase activity was detected on MDT (MD plus 100 mM phosphate buffer and 1% tributyrin) or YPDT (YPD plus 1% tributyrin) medium plates. For solid medium, 2% agar was added.

Plasmid construction

A 954-bp version of the *C. antarctica* CalB gene corresponding to the mature protein was codon-optimized for expression in *K. phaffii* and synthesized de novo by Epoch Biosciences (USA). The synthetic gene, LipB, contained in its 5'-end a XhoI site followed by 18 nt required to reestablish the Kex2 and Ste13 proteolytic sites present in the *S. cerevisiae* α -factor signal sequence; while the 3'-end had a NotI site after the stop codon. LipB was cloned into pBluescript II SK, resulting in pBSK_LIPB. LipB was removed after double digestion of this vector with XhoI/NotI following subcloning in pPGK Δ 3AMY [14] digested with the same enzymes, resulting in pPGK Δ 3LIPB. To further improve CalB production, the original α -factor secretion sequences were replaced with codon-optimized sequences, resulting in pPGK Δ 3PRO_LIPB. This vector has the *Sh ble* dominant marker, and LipB is under the control of the constitutive *pPGK1* promoter.

For multicopy integration of LipB mediated by a defective marker, the pK-ld vector [26] was used. This vector contains pPGK1 and the leu2-d selection marker. A fragment corresponding to LipB and the optimized α -factor sequences was amplified by PCR from pPGK Δ 3PRO LIPB with the primers EGFif-F (GATTACGAAAGGATCACGATGAGATT CCCATCTATCTTCACTG) and Liprec-R (ATGGTCGA CGCGGCCGCTTATGGAGTAACGATACCAGAG) using CloneAmp HiFi PCR Premix (Clontech). The ~1.2 kb amplicon was cloned into pK-ld previously double-digested with BamHI/NotI by in vitro recombination (In-Fusion® HD Cloning Kit, Clontech). The resulting vectors pPGK Δ 3PRO LIPB and pKLip-ld were linearized with SacI and PvuI, respectively, for direct integration into the K. phaffii PGK1 locus. Schemes of the constructed plasmids are shown as supplemental figures.

Yeast transformation

K. phaffii cells were transformed by electroporation following the protocol described in the *Pichia* Expression Kit (Invitrogen). Transformed cells were plated on YPDS containing zeocin (pPGK Δ 3PRO_LIPB) or MD (pKLip-ld). Transformants were screened for lipase activity on YPDT (pPGK Δ 3PRO_LIPB) or MDT (pKLip-ld) plates.

DNA extraction

Genomic DNA (gDNA) was isolated using a DNA purification kit (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega). DNA concentration and quality were verified with NanodropTM (Thermo ScientificTM).

Primer design

For DNA amplification, a set of primers for the gene of interest (LipB) was used, and the reference β -actin gene (*ACT1*) was used as an endogenous control to normalize the data. Primers for ddPCR were designed according to the Bio-Rad guidelines. Primer sequences are listed in Table 1.

ddPCR methodology

To ensure accurate quantification and avoid a negative impact on the droplet volume, genomic DNA was digested with EcoRI (Thermo Scientific). As a result, different gDNA fragments were obtained, containing individual expression cassettes. EcoRI was selected on the following basis: (i) the LipB expression cassette was not cut by this enzyme and (ii) LipB was cloned into a standard plasmid backbone such as pPICZ α , i.e., containing a single restriction site for EcoRI in its multicloning site. ddPCR reactions contained 10 µL of QX200[™] ddPCR[™] EvaGreen® Supermix, 200 nM of forward primer, 100 nM of reverse primer, 0.4 ng of digested gDNA, and the required amount of DNase/RNase-free water up to 20 µL of final volume. Reactions were incubated at 95 °C for 10 min, followed by a denaturation (94 °C, 30 s), and an annealing/extension step (58 °C, 1 min for LipB primers; 56.5 °C, 1 min for ACT1 primers) during 40 cycles. Droplets were detected by using the QX100[™] Droplet Digital[™] PCR System and the software QuantaSoft[™] v. 1.7.4.0917. All the reagents used in the ddPCR were purchased from Bio-Rad. This methodology was adapted based on [16].

Storage and inoculum

Transformed *K. phaffii* cells were stored in 20% glycerol and maintained at -80 °C for storage. A Petri dish with YPD (in *w*/*v*, 1% yeast extract, 2% peptone, and 2% glucose) and 2% *w*/*v* agar-agar was maintained in a refrigerator to be used as the inoculum. A single colony from the Petri dish was propagated in shaker flasks at 200 rpm and 30 °C in YPD medium.

Culture medium

The culture medium used for fermentation in bioreactors was adapted from [27] containing (per liter): 2 g citric acid, 12.4 g $(NH_4)_2HPO_4$, 0.022 g CaCl₂·2H₂O, 0.9 g KCl, 0.5 g MgSO₄· 7H₂O, 100 g crude glycerol, and 4.6 mL of PTM₁ trace salts. The pH was maintained at 7.0 using 5% H₂SO₄ and 20% NH₄OH.

The composition of PTM_1 trace salts used contains (per liter): 2 g CuSO₄·5H₂O, 0.08 g KI, 3 g MnSO₄·H₂O, 0.2 g MnSO₄·H₂O, 0.02 g H₃BO₃, 0.5 g CoCl₂·6H₂O, 6.7 g ZnCl₂, 21.7 g FeSO₄·7H₂O, 0.2 g biotin, and 1.7 mL H₂SO₄.

Fermentation process

The bioreactor used was a bench-top Multifors from Infors with three vessels of 500 mL working volume. The bioreactor was maintained at 30 °C. Aeration was controlled in order to try to maintain the dissolved-oxygen saturation at 30%. This control was effected through a cascade with stirring between

Tube 1 Construction design of primers for Lipb and ACT							
Oligonucleotide	Sequence	Tm	%GC	Amplicon size (nt)			
LipB Fw	5'-TGGCTTTCGCTCCAGACTAC-3'	63	55	137			
LipB Rev	5'-AGTCAAACCACCAGCGTTTC-3'	63	50				
ACTI Fw	5'-CACCACACCTTCTACAAC-3'	56	50	139			
ACTI Rev	5'-AGAAGGCTGGAACGTTG-3'	58	52				

 Table 1
 Construction design of primers for LipB and ACT1

250 and 700 rpm and gas flow between 0 and 1 vvm. The inoculum was produced as mentioned in the "Storage and inoculum" section and used to inoculate the bioreactor at the desired concentration, typically between 0.7 and 1 g/L. The fermentations were performed in duplicate.

Titrimetric activity

Titrimetric activity was performed with 56 mM tributyrin for hydrolysis at 40 °C and pH 7.0, based on the method described by [28] using a pHstat and 0.06 M NaOH as titrating reagent. One unit of lipase activity (U) is defined as the quantity of enzyme needed to catalyze the production of 1 μ mol butyric acid (volumetric analysis) per minute under the assay conditions. This analysis was conducted at the peak of production activity, to obtain the parameters associated with the fermentation. The results were determined as the mean of triplicates.

Biomass measurement

Cell growth was quantified based on a standard curve of dry weight, related to the measurement of optical density at 600 nm in a spectrophotometer (Hach Lange DR 3900^{TM}): DCW (g/L) = 0.4382 abs.

Glycerol concentration

Glycerol was determined using HPLC (HPLC Agilent Technologies) equipped with an HPX-87H column (Bio-Rad $300 \text{ mm} \times 7.8 \text{ mm}$). The temperature was maintained at 65 °C, using as the mobile phase a 0.005 M sulfuric acid solution at a flow rate of 0.6 mL/min. The sample volume injected was 20 μ L.

N-NH₄⁺ concentration

This was measured using the method adapted from [29, 30]. Ammonium sulfate was used as a standard. The nitrogen concentration was determined as the mean of triplicates.

Results

Copy number determination

In order to produce CalB in *K. phaffii*, a synthetic gene (LipB) was designed with codon optimization for this yeast. LipB was cloned under the transcriptional control of the *K. phaffii* constitutive promoter P_{PGKI} , resulting in two vectors: pPGK Δ 3PRO_LIPB and pKLip-ld. *K. phaffii* was transformed with linearized pPGK Δ 3PRO_LIPB and pKLip-ld in order to target integration to the *PGK1* locus. Over 85% of transformants from both systems showed lipolytic activity on plates containing tributyrin (data not shown). A clone showing the largest halo from each system was selected for further study. Clones derived from pPGK Δ 3PRO_LIPB and pKLip-ld were denominated 04-MR and 34-MR, respectively.

DNA quality and concentration

Because of the low quality and quantity of DNA samples, genomic extractions were repeated. The results of the Nanodrop quantification are shown in Table 2.

Gene dosage quantification

For each sample, five replicates were performed. The number of copies of LipB was determined by calculating the ratio between positive droplets of LipB and *ACT1* amplification (Fig. 1).

These results established that strain 04-MR has one gene copy and strain 34-MR has three copies.

 Table 2
 Results obtained from Nanodrop quantification for both strains tested

Strain	Concentration (ng/µg)	260/280 ratio	260/230 ratio
04-MR	1018	2.09	1.56
34-MR	523	1.95	1.2



Fig. 1 In blue, positive droplets (PCR amplification detected). Pink line indicates threshold between positive and negative droplets. **a** Amplification with CalB primers. **b** Amplification with Act1 primers

Comparison of CalB production between K. phaffii strains

In a previous study, the best conditions for Clone 04-MR in terms of production were evaluated, and the use of 100 g/L of crude glycerin as initial in a batch culture was the best condition obtained [3]. In order to conduct a comparative analysis of the new strain, the same conditions were used in this study. Figure 2 shows the culture progress of CalB production using Clone 04-MR.

The fermentation attained a biomass/substrate yield $(Y_{x/s})$ of 0.47 gX/gS. The specific growth rate was 0.10 h⁻¹ and the volumetric productivity was 453 U/L·h, with the crude glycerin being completely consumed after 46 h of growth. No nitrogen limitation occurred; as can be seen, the NH₄OH added to maintain the pH assured a nearly constant nitrogen concentration in the culture.



Figure 3 shows the fermentation process using Clone 34-MR. Biomass/substrate yield $(Y_{x/s})$ was 0.44 gX/gS, the specific growth rate was 0.11 h⁻¹ and the volumetric productivity and activity were 2.3-fold higher than in the previous case. Figure 4 shows the comparison of the main parameters obtained with the two strains.

Discussion

Two integrative vectors for lipase production were constructed in this work, pPGK Δ 3PRO_LIPB and pKLip-ld. The main difference between these vectors is that the latter allows the direct isolation of transformants with multiple copies of the expression cassettes [26]. This vector contains the defective auxotrophic marker *leu2-d*, which is an allele bearing only 29 bp of the 5' flanking region of the *S. cerevisiae LEU2* gene


Fig. 3 Kinetics of cell growth, enzymatic activity, and consumption of glycerol and nitrogen of Clone 34-MR on minimal medium with 100 g/L crude glycerin, pH 7, with a cascade control to maintain oxygen saturation at 30%



[31]. In *S. cerevisiae*, this marker is typically used to maintain multiple copies of episomal plasmids [31] but since this class of vectors is not common in *K. phaffii*, prototrophy is necessarily achieved after multiple plasmid integration events in the host's chromosome as previously shown [21].

Over 85% of transformants from both systems showed lipolytic activity on plates containing tributyrin (data not shown), thus showing that CalB was efficiently secreted by the *S. cerevisiae* α -factor signal sequence.

The recommended 260/230 ratio (related to some of the extraction contaminants, e.g., phenol and guanidine) to the ddPCR methodology is around 2 [32, 33], but the samples were of sufficient quality to continue with the procedure, although it achieved only 1.6 and 1.2, respectively.

For both cultivations, the growths were coupled to the production of CalB as expected, since a constitutive promoter was used. In general, both clones had the same behavior of production. Nevertheless, the biomass/substrate yield ($Y_{x/s}$) for strain 34-MR was slightly smaller (0.44 gX/gS); this is explainable since the strain used for the modification is auxotrophic. Volumetric productivity and activity were 2.3fold higher in this case, which shows that this multicopy construction generates higher lipase production, as has previously been reported for other multicopy integration processes. The production of tumor necrosis factor (TNF) increased 200-fold with more than 20 integrated copies [34]; hepatitis B surface antigen showed a linear correlation between copy number, mRNA and protein [35]; and proinsulin secretion increased 13-fold with 11 copies of the expression cassette [36]. Marx et al. (2009) [37] found a linear correlation between copy number and hSOD production. Specifically, for *K. phaffii*, some studies with lipase expression found an increase in protein production with multicopy integration [38–41].

For all parameters, the 34-MR strain showed better performance, around 2.4-fold. This behavior was expected because of the larger number of copies integrated; the increase was nearly linearly related to the number of integrations, as there are 3 times more copies of the lipase B gene from *C. antarctica*. It is also possible that this number of copies is close to saturation, due to limits on secretion or transcription,



Fig. 4 Comparison of biomass/product yield, enzymatic activity, and volumetric and product productivity for both strains on minimal medium with 100 g/L crude glycerin, pH 7, with a cascade control to maintain oxygen saturation at 30%

and the integration of more copies would reduce the correlation until the productivity becomes stable, independently of the number of copies, as for the HSA (human serum albumin) productivity reported by Marx et al. [37]. Notably, the maximum specific growth rate achieved was half the rate normally obtained with glycerol (0.2 h^{-1 3}), with both copy numbers, also a reflection of the auxotrophic characteristic.

The effect of gene dosage on the production of different microbial recombinant lipases in *K. phaffii* has also been reported. Under P_{AOXI} , the maximum gene dosage was around five copies for *C. rugosa* Lip1 [18] and *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 lipase [39]. For the constitutive promoter P_{GAP} the gene dosage was lower, three copies; for *C. rugosa* Lip2 [42], the same optimal copy number found in this study.

Although this strain produced much less than the highest cell density (which would be about 120 g/L as previously achieved in K. phaffii culturing [43]), because of the decrease in $Y_{x/s}$, the fed-batch strategy can circumvent this problem and further increase the parameters obtained. Attempts to find a strong constitutive promoter and construction to match or even exceed the activities obtained with the P_{AOXI} promoter are important, in order to eliminate the use of methanol. This system produces the highest standards reported in the literature, as obtained by Vadhana et al. [44]: 300 U mL^{-1} at 6 days of induction. In some cases, such as the hepatitis B surface antigen, constitutive expression is better than induction because no induction is necessary and the specific growth rate is generally higher using glucose or glycerol than using methanol, which leads to faster processes [45]. Obviously, one must be careful when comparing activity numbers, because different substrates and methods used generate divergent results. Vadhana and colleagues used the same method to measure the activity as in this study, and they achieved a production, per hour, very near that obtained with methanol induction (1.87 U/ml·h with methanol induction, while the present study achieved 1.5 U/ml·h). These results demonstrate the excellent potential of K. phaffii for CalB production, and different culture strategies should be studied in order to explore its full potential. The enzyme produced on this work was already used to produce myo-inositol derivates that are intermediates from pharmacological pathways involved in the synthesis of building blocks for drugs that inhibit the etiological agent of Chagas disease, Trypanosoma cruzi [46].

Conclusion

Evaluating the newly constructed *K. phaffii* strain with a multicopy gene of *C. antarctica* lipase B, the increase in the number of gene copies directly impacted the lipase productivity. Clone 34-MR, with three copies, showed around 2.4-fold better performance in terms of volumetric and product productivity, although the final biomass decreased by 10%.

The optimal gene dosage to maximize CalB production under control of the P_{PGKI} promoter was three copies, similar to the number obtained with the well-known constitutive promoter P_{GAP}

Therefore, the novel constitutive promoter P_{PGKI} showed high potential for production of this lipase when coupled with multicopy integration, close to the productivities achieved when using methanol induction, but without the downsides of toxicity and hazards involved in using methanol. The process described here can easily be scaled up (pilot and industrial), as it is simple and low in cost.

Funding information This work was financially supported by PETROBRAS/ANP and CAPES/DGPU from Brazil. Also by the Spanish project CTQ2016-74959-R (MINECO/FEDER, UE). The Spanish group is a member of 2014-SGR-452 and the Reference Network in Biotechnology (XRB) (Generalitat de Catalunya).

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

References

- Gotor-Fernández V, Busto E, Gotor V (2006) Candida antarctica Lipase B: an ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. Adv Synth Catal 348(7–8):797–812. https:// doi.org/10.1002/adsc.200606057
- Anderson EM, Larsson KM, Kirk O (1998) One biocatalyst–many applications: the use of Candida Antarctica B-lipase in organic synthesis. Biocatal Biotransformation 16(3):181–204. https://doi.org/ 10.3109/10242429809003198
- Robert JM, Lattari FS, Machado AC, de Castro AM, Almeida RV, Torres FAG, Valero F, Freire DMG (2016) Production of recombinant lipase B from Candida antarctica in Pichia pastoris under control of the promoter PGK using crude glycerol from biodiesel production as carbon source. Biochem Eng J 118:123–131. https://doi. org/10.1016/j.bej.2016.11.018
- Wu Q, Soni P, Reetz MT (2013) Laboratory evolution of enantiocomplementary Candida antarctica lipase B mutants with broad substrate scope. J Am Chem Soc 135(5):1872–1881. https://doi.org/10.1021/ja310455t
- Ghaly AE, Dave D, Brooks MS, Budge S (2010) Production of biodiesel by enzymatic transesterification: review. Am J Biochem Biotechnol 6(2):54–76
- Aguieiras ECG, Cavalcanti-Oliveira ED, De Castro AM, Langone M a P, Freire DMG (2014) Biodiesel production from Acrocomia aculeata acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. Fuel. 135:315–321. https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.06.069
- Kirk O, Christensen MW (2002) Lipases from Candida antarctica: unique biocatalysts from a unique origin. Org Process Res Dev 6(4):446–451. https://doi.org/10.1021/op0200165
- Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in Pichia pastoris. Biotechnology (N Y);11(8):905–910. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ 7763913. Accessed 10 Jan 2016
- Li P, Anumanthan A, Gao X-G, Ilangovan K, Suzara VV, Düzgüneş N (2007) Renugopalakrishnan V Expression of recombinant proteins in Pichia pastoris. Appl Biochem Biotechnol;142(2):105–124. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025573. Accessed 20 Jan 2016

- Cereghino JL, Cregg JM (2000) Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. FEMS Microbiol Rev 24(1):45–66
- Looser V, Lüthy D, Straumann M, Hecht K, Melzoch K, Kovar K Effects of glycerol supply and specific growth rate on methanol-free production of CALB by P. pastoris: functional characterisation of a novel promoter. Applied Microbiol and Biotech 101(8):3163– 3176https://doi.org/10.1007/s00253-017-8123-x
- Anastácio GS, Santos KO, Suarez PAZ, Torres FAG, De Marco JL, Parachin NS (2014) Utilization of glycerin byproduct derived from soybean oil biodiesel as a carbon source for heterologous protein production in Pichia pastoris. Bioresour Technol 152:505–510. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.11.042
- Zhang AL, Luo JX, Zhang TY, Pan YW, Tan YH, Fu CY, Tu FZ (2009) Recent advances on the GAP promoter derived expression system of Pichia pastoris. Mol Biol Rep 36(6):1611–1619. https:// doi.org/10.1007/s11033-008-9359-4
- Arruda A, Reis VCB, Batista VDF, Daher BS, Piva LC, de Marco JL, de Moraes LMP, Torres FAG (2016) A constitutive expression system for Pichia pastoris based on the PGK1 promoter. Biotechnol Lett 38(3):509–517. https://doi.org/10.1007/s10529-015-2002-2
- Piva LC, Bentacur MO, Reis VCB, De Marco JL, de Moraes LMP, Torres FAG (2017) Molecular strategies to increase the levels of heterologous transcripts in Komagataella phaffii for protein production. Bioengineered. 8:1–5. https://doi.org/10.1080/21655979. 2017.1296613
- Cámara E, Albiol J, Ferrer P (2016) Droplet digital PCR-aided screening and characterization of *Pichia pastoris* multiple gene copy strains. Biotechnol Bioeng 113(7):1542–1551. https://doi. org/10.1002/bit.25916
- Cos O, Serrano A, Montesinos JL, Ferrer P, Cregg JM, Valero F (2005) Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in Pichia pastoris fed-batch cultures. J Biotechnol 116(4):321–335. https:// doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.12.010
- Li X, Liu Z, Wang G, Pan D, Jiao L, Yan Y (2016) Overexpression of Candida rugosa lipase Lip1 via combined strategies in Pichia pastoris. Enzym Microb Technol 82:115–124. https://doi.org/10. 1016/j.enzmictec.2015.09.003
- Kazemi Seresht A, Nørgaard P, Palmqvist EA, Andersen AS, Olsson L (2013) Modulating heterologous protein production in yeast: the applicability of truncated auxotrophic markers. Appl Microbiol Biotechnol 97(9):3939–3948. https://doi.org/10.1007/ s00253-012-4263-1
- Servienë E, Melvydas V (2001) Effect of the defective leucine gene leu2-d, on the properties of recombinant plasmid in yeast Saccharomyces cerevisiae. Biologia (Bratisl) 4:30–33
- OKKELS JS (1996) A URA3-promoter deletion in a pYES vector increases the expression level of a fungal lipase in Saccharomyces cerevisiae. Ann N Y Acad Sci 782(1):202–207. https://doi.org/10. 1111/j.1749-6632.1996.tb40561.x
- Moon HY, Lee DW, Sim GH, Kim HJ, Hwang JY, Kwon MG, Kang BK, Kim JM, Kang HA (2016) A new set of rDNA-NTSbased multiple integrative cassettes for the development of antibiotic-marker-free recombinant yeasts. J Biotechnol 233:190– 199. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.07.006
- Pignede G, Wang H-J, Fudalej F, Seman M, Gaillardin C, Nicaud J-M (2000) Autocloning and amplification of LIP2 in Yarrowia lipolytica. Appl Environ Microbiol 66(8):3283–3289. https://doi. org/10.1128/AEM.66.8.3283-3289.2000
- Nicaud J-M, Madzak C, Broek P, Gysler C, Duboc P, Niederberger P, Gaillardin C (2002) Protein expression and secretion in the yeast Yarrowia lipolytica. FEMS Yeast Res 2(3):371–379. https://doi.org/ 10.1111/j.1567-1364.2002.tb00106.x
- 25. Krasovska OS, Stasyk OV, Sibirny AA (2013) Stable overproducer of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast

Hansenula polymorpha due to multiple integration of heterologous auxotrophic selective markers and defect in peroxisome biogenesis. Appl Microbiol Biotechnol 97(23):9969–9979. https://doi.org/10. 1007/s00253-013-5223-0

- Betancur MO, Reis VCB, Nicola AM, De Marco JL, de Moraes LMP, Torres FAG (2017) Multicopy plasmid integration in Komagataella phaffii mediated by a defective auxotrophic marker. Microb Cell Factories 16(1):99. https://doi.org/10.1186/s12934-017-0715-8
- Maurer M, Kühleitner M, Gasser B, Mattanovich D (2006) Versatile modeling and optimization of fed batch processes for the production of secreted heterologous proteins with Pichia pastoris. Microb Cell Factories 5(37):37. https://doi.org/10.1186/ 1475-2859-5-37
- Freire DM, Teles EM, Bon EP, Sant' Anna GL (1997) Lipase production by Penicillium restrictum in a bench-scale fermenter: effect of carbon and nitrogen nutrition, agitation, and aeration. Appl Biochem Biotechnol 63-65:409–421. https://doi.org/10.1007/ BF02920442
- Fawcett JK, Scott JE (1960) A rapid and precise method for the determination of urea. J Clin Pathol 13:156–159. https://doi.org/10. 1136/jcp.13.2.156
- 30. Tabacco A, Meiattini F, Moda E, Tarli P (1979) Simplified enzymic/colorimetrlc serum urea nitrogen determination thymol is a suitable preservative for uric acid standards in the Uricase technique CHEMISTRY, in the CK-BB least-squares evaluation of linearity more on the detection of serum CK-BB Acti. Clin Chem 25(2):4–5
- Erhart E, Hollenberg CP (1983) The presence of a defective LEU2 gene on 2μ DNA recombinant plasmids of Saccharomyces cerevisiae is responsible for curing and high copy number. J Bacteriol 156(2):625–635
- Robin JD, Ludlow AT, La Ranger R, Wright WE, Shay JW (2016) Comparison of DNA quantification methods for next generation sequencing. Sci Rep 6:1–10. https://doi.org/10.1038/srep24067
- Endrullat C, Glökler J, Franke P, Frohme M (2016) Standardization and quality management in next-generation sequencing. Appl Transl Genomics 10:2–9. https://doi.org/10.1016/j.atg.2016.06.001
- Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R, Cruze J, Mazzaferro P, Fish W, Fuke M, Holden K, Phelps D (1989) High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Biochemistry. 28(9):4117–4125. https://doi.org/10.1021/ bi00435a074
- 35. Vassileva A, Arora Chugh D, Swaminathan S, Khanna N (2001) Effect of copy number on the expression levels of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast Pichia pastoris. Protein Expr Purif 21(1):71–80. https://doi.org/10.1006/prep.2000.1335
- Mansur M, Cabello C, Hernández L et al (2005) Multiple gene copy number enhances insulin precursor secretion in the yeast Pichia pastoris. Biotechnol Lett 27(5):339–345. https://doi.org/10.1007/ s10529-005-1007-7
- 37. Marx H, Mecklenbräuker A, Gasser B, Sauer M, Mattanovich D (2009) Directed gene copy number amplification in Pichia pastoris by vector integration into the ribosomal DNA locus. FEMS Yeast Res 9(8):1260–1270. https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009. 00561.x
- Brunel L (2004) High-level expression of Candida parapsilosis lipase/acyltransferase in Pichia pastoris. J Biotechnol. https://doi. org/10.1016/S0168-1656(04)00162-2
- 39. Sha C, Yu X-W, Li F, Xu Y (2013) Impact of gene dosage on the production of lipase from Rhizopus chinensis CCTCC M201021 in Pichia pastoris. Appl Biochem Biotechnol 169(4):1160–1172. https://doi.org/10.1007/s12010-012-0050-9
- Sha C, Yu X-W, Lin N-X, Zhang M, Xu Y (2013) Enhancement of lipase r27RCL production in Pichia pastoris by regulating gene

dosage and co-expression with chaperone protein disulfide isomerase. Enzym Microb Technol 53(6–7):438–443. https://doi.org/10. 1016/j.enzmictec.2013.09.009

- He D, Luo W, Wang Z, Lv P, Yuan Z (2015) Combined use of GAP and AOX1 promoters and optimization of culture conditions to enhance expression of Rhizomucor miehei lipase. J Ind Microbiol Biotechnol 42(8):1175–1182. https://doi.org/10.1007/s10295-015-1633-6
- Kuo T-C, Shaw J-F, Lee G-C (2015) Improvement in the secretory expression of recombinant Candida rugosa lipase in Pichia pastoris. Process Biochem 50(12):2137–2143. https://doi.org/10.1016/j. procbio.2015.09.013
- Charoenrat T, Ketudat-Cairns M, Stendahl-Andersen H, Jahic M, Enfors SO (2005) Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for Pichia pastoris recombinant protein processes. Bioprocess Biosyst Eng 27(6):399–406. https://doi.org/10.1007/ s00449-005-0005-4
- 44. Vadhana AKP, Samuel P, Berin RM, Krishna J, Kamatchi K, Meenakshisundaram S (2013) Improved secretion of Candida

antarctica lipase B with its native signal peptide in Pichia pastoris. Enzym Microb Technol 52(3):177–183. https://doi.org/10.1016/j. enzmictec.2013.01.001

- 45. Vassileva A, Chugh DA, Swaminathan S, Khanna N (2001) Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast Pichia pastoris using the GAP promoter. J Biotechnol 88(1): 21–35. https://doi.org/10.1016/S0168-1656(01)00254-1
- 46. Manoel EA, Robert JM, Pinto MCC, Machado ACO, Besteti MD, Coelho MAZ, Simas ABC, Fernandez-Lafuente R, Pinto JC, Freire DMG (2016) Evaluation of the performance of differently immobilized recombinant lipase B from Candida antarctica preparations for the synthesis of pharmacological derivatives in organic media. RSC Adv 6:4043–4052. https://doi.org/10.1039/c5ra22508f