

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

"INDUÇÃO DE MUTANTES COM ALTA ATIVIDA
DE DE PENICILINA AMIDASE INTRACELU -
LAR PRODUZIDA POR E.coli E ESTUDO DE
ALGUMAS CARACTERÍSTICAS DESTA ENZI
MA".

Demetrio Edgar Maranczenbaum Aguilera
Engenheiro Químico

Orientador:

Prof. Dr. Yong Kun Park

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agríco-
la da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título
de "Doutor" em Ciência de Alimentos.

Ao meu pai, fonte de responsabili-
dade e fôrça em minha vida.

À minha esposa e filho, onde amor
e ternura sempre estão presentes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço sinceramente ao Professor Dr. YONG KUN PARK pela sua constante e valiosa orientação durante todo o desenrolar deste trabalho.

Ao Professor Dr. ANDRÉ TOSELLO, Diretor da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola.

A ORGANIZAÇÃO DOS ESTADOS AMERICANOS, pela bolsa de estudos concedida.

Ao amigo e conselheiro Professor Dr. LEOPOLD HARTMAN.

Ao pessoal Técnico do Laboratório de Bioquímica de Alimentos pela colaboração prestada.

Ao pessoal do Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Bioengenharia, pela cooperação prestada no uso de diversos equipamentos.

Ao Laboratório da SQUIBB do BRASIL pelo fornecimento da Penicilina G.

Ao bom amigo Professor RAMÓN HINOJOSA GUTIERREZ, que soube estar presente dando seu apoio no transcorrer deste trabalho.

Também agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente ajudaram a realizar este trabalho.

ÍNDICE

	página
RESUMO	ii
SUMMARY	v
I. INTRODUÇÃO	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
III. MATERIAL E MÉTODOS	23
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
V. CONCLUSÕES	62
VI. QUADROS	65
VII. FIGURAS	74
VIII. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	90

RESUMO

De 695 microrganismos isolados do solo e de material clínico, foram encontrados quatro produtores da enzima penicilina amidase, sendo o maior produtor desta enzima, uma linhagem de E.coli FEA 30. Verificou-se que esta enzima é intracelular, e que o ácido - fenil acético induz sua produção.

Encontrou-se que o melhor meio de cultura, na produção da enzima penicilina amidase, por E.coli FEA 30 foi: 1% de peptona, 0,5 % de extrato de levedura e 0,15% de ácido fenil acético, com pH de 7,0 antes de autoclavagem. A melhor temperatura de incubação, na produção da enzima foi de 23°C. Um meio de cultura na produção da enzima penicilina amidase com possibilidades de ser usado, a nível industrial foi : 2% de farelo de soja desengordurada, 1 % de extrato preparado pela autólise de *Saccharomyces cerevisiae*, da Fleischmann e 0,15% de ácido fenil acético, com pH de 7,0 antes da autoclavagem.

Depois de colocar uma suspensão de E.coli FEA 30 por 50 minutos em uma solução de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), foram isoladas 800 linhagens, das quais foi obtida uma mutante denominada como E.coli FEA 30 MQ1. Esta mutante produz duas vezes -

mais penicilina amidase do que a linhagem selvagem, à temperatura de incubação de 25°C. Com esta linhagem mutante E.coli FEA 30 MQ1, foi feita novamente indução de mutação e dentre 1.000 linhagens isoladas após a exposição de 50 minutos em MNNG, foi encontrada uma linhagem E.coli FEA 30 MQ2, que produz 120% a mais de enzima que a selvagem. Tanto E.coli FEA 30 MQ1 como E.coli 30 - MQ2, quando inoculadas em meio mínimo de: 15g de KH_2PO_4 , 10 g de glicose, 2 g de sulfato de amônia, 0,2 g de sulfato de magnésio, com pH ajustado a 7 com hidróxido de sódio, não apresentaram divisão celular, crescendo em forma filamentosa às temperaturas de incubação de 25°C a 37°C.

Com a indução de mutação com raios ultravioletas, não foi possível encontrar mutante hiperprodutiva, ainda que nestas condições foram conseguidas mutantes auxotrofos e outras β galactosidase-negativas.

A enzima penicilina amidase de E. coli apresentou atividade máxima à temperatura de 40°C, sendo pH ótimo entre 8,0 e 8,5, seu valor da constante de Michaelis K_m foi 37 mM e V_m foi 1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{ml}$.

Na produção de 6APA, por penicilina amidase e penicilina G, à temperatura de incubação de 40°C, usando-se uma concentração de 7% de penicilina G, contendo 0,83 unidades de enzima por milili-

tro, conseguiu-se uma conversão de 90% em 20 horas de incubação, obtendo-se posteriormente uma recuperação de 70% do GAPA produzido.

SUMMARY

Of 695 microorganisms isolated from soil and clinical material, four were proved to be producers of penicillin amidase, the principal producer of the above enzyme being a lineage of *E. coli* FEA 30. It was verified that the enzyme was intracellular and that its production is induced by phenylacetic acid.

The best culture medium for the production of penicillin amidase by *E. coli* FEA 30 was found to be: 1% of peptone, 0,5% of yeast extract and 0,15% of phenylacetic acid, with pH 7,0 before autoclaving. The optimal temperature of incubation for the production of the enzyme was 23°C. For industrial purposes an appropriate culture medium would be: 2% of defatted soybean meal, 1% of an extract prepared by autolysis of *Saccharomyces cerevisiae* of Fleischmann and 0,15% of phenylacetic acid with pH 7,0 before autoclaving.

After placing a suspension of *E. coli* FEA 30 for 50 minutes in a solution of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG), there were isolated about 800 lineages from which there was obtained a mutant denoted as *E. coli* FEA 30 MQ1. This mutant produces

twice as much penicillin amidase than does the wild lineage at an incubation temperature of 25°C.

The mutant E.coli FEA 30 MQ1, was subjected again to a mutation process and of the 1.000 lineages isolated after 50 minutes immersion in MNNG solution, there was encountered a mutant lineage denoted as E.coli FEA 30 MQ2 which produces 120% more of the enzyme than the wild one. Both E.coli FEA MQ1 and E.coli FEA MQ2 when inoculated in minimal medium of: 15g of KH_2PO_4 , 10 g of glucose, 2 g of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and 0,2 g of MgSO_4 , with pH adjusted to 7,0 with sodium hydroxide, did not show cellular division, but grew in a filament form at an incubation temperature of 25°C to 37°C.

When inducing the mutation with ultraviolet rays it was not possible to obtain a penicillin amidase hyperproductive mutants even if under these conditions mutants such as auxotrophic and others with negative β -galactosidase were encountered.

The penicillin amidase of E.coli showed maximum activity at 40°C, the optimal pH being between 8,0 and 8,5. The value of its Michaelis constant K_m was 37 mM and its V_m was 1 μ mol/min/ml.

When employing an incubation temperature of 40°C and a penicillin

G concentration of 7% with 0,83 enzymes units per ml, a conversion of 90% of the penicillin into 6APA in 20 hours of incubation was achieved. Seventy % of the above yield was recuperated.

INTRODUÇÃO

Com a descoberta da penicilina G por Fleming, em 1928, e com sua aplicação terapêutica realizada por Florey, em 1941, numerosos estudos e investigações foram desenvolvidos, visando facilitar sua industrialização em larga escala.

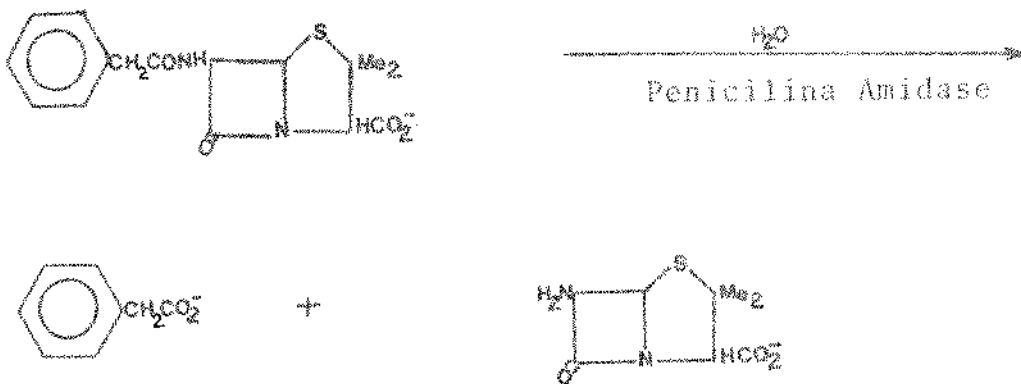
Embora esse objetivo tenha sido alcançado, a pesquisa de novos antibióticos foi determinada pela necessidade de solucionar alguns problemas surgidos quando do emprêgo da penicilina G para fins clínicos, entre os quais:

Espectro antibacteriano limitado; Instabilidade em meio gástrico; Rápida excreção renal; Inativação pela penicilinase; Hipersensibilidade.

Uma segunda alternativa na produção de novos antibióticos, foi a síntese de penicilina semi-sintética a partir da incorporação de uma cadeia lateral diferente daquela do ácido fenil acético ao ácido 6 aminopenicilânico; dessa forma obtem-se compostos com características diferentes e desejáveis. Existem atualmente, mais de uma centena de penicilina semi-sintética, de onde destacam-se como as mais importantes: fenoxietilpenicilina, oxacilina, ampicilina e

hetacilina.

O presente trabalho visa a seleção de microrganismos produtores da enzima penicilina aminohidrolase EC nº 3.5.1.11, comumente denominada penicilina amidase ou penicilina acilase que hidrolisa a penicilina G, dando como produtos da reação, ácido 6 amino penicilânico (6APA) e ácido fenil acético (AFA), segundo a reação:



Estes microrganismos serão, posteriormente, submetidos a estudos em diferentes: meios de cultura, pH, temperatura de incubação e diferentes níveis de indutor, procurando-se, desta forma, a otimização na produção da enzima penicilina amidase.

Com o microrganismo, maior produtor desta enzima, tratar-se-á de induzir mutação com N metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) , e raios ultravioletas para se obter mutante que apresente alta produtividade da mesma enzima.

Estudar-se-ão, também, algumas condições na produção de 6APA por penicilina amidase, a partir de várias concentrações de penicilina G e várias temperaturas de incubação, prosseguindo-se à recuperação e cristalização do 6APA.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

SAKAGUCHI e MURAO (1950), relataram a remoção do grupo ácido fenil acético, da penicilina G (PG), usando uma enzima produzida por *Penicillium chrysogenum* Q176. O produto da reação foi denominado como Penicilin, e a enzima penicilina amidase.

ROLINSON et al (1960), não confirmaram a remoção do grupo ácido fenil acético da PG, usando *Penicillium chrysogenum*, porém usando como substrato penicilina K ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{-CH}_2$), foi possível a remoção do grupo nHeptil. Foi proposta a classificação desta enzima, em dois tipos: enzima tipo (I) que hidrolisa mais rapidamente penicilina K e V (fenoximetil penicilina), do que a penicilina G, sendo esta enzima produzida em forma extra celular por alguns: Actinomicetos, fungos e leveduras, apresentando pH ótimo em torno de 9, e temperatura ótima ao redor de 50°C . A enzima tipo (II) produzida por algumas bactérias, pertencentes ao grupo *Escherichia* e *Alcaligenes*, que hidroliza mais rapidamente a penicilina G, que a penicilina V e K. Usando-se células de *E. coli*, foi possível usar 2% de penicilina G, que foi convertida em 95% de ácido 6 aminopenicilânico, em 4 horas de reação. Esta enzima *E. coli* apresentou pH ótimo entre 7,5 e 8,5, e temperatu-

ra ótima ao redor de 40^oC. Esta enzima de *E. coli* em pH em torno de 5,5, pode sintetizar a penicilina G, a partir de ácido 6 aminopenicilânico e ácido fenil acético.

CLARIDGE et al (1960), relataram a produção de ácido 6 aminopenicilânico (6APA) por enzimas microbianas de: *Alcaligenes faecalis*, *Aerobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus lysodeikticus* e *Mycobacterium phlei*, sendo o maior produtor da enzima penicilina amidase o *Alcaligenes faecalis*. A enzima de *A. faecalis* mostrou maior atividade em penicilina G, que em penicilina-V e K. A produção da enzima foi intracelular, e as células foram usadas como fonte de enzima, podendo-se usar até cinco vezes consecutivas, na produção de 6APA, obtendo-se um máximo de 6APA de 5,7 mg/ml. Com a enzima penicilina amidase de *A. faecalis*, foi possível a síntese da penicilina G em pH ácido 5,5, a partir de 6APA e ácido fenil acético.

HUANG et al (1960), relataram a produção de enzima penicilina-amidase microbiana de: *Escherichia*, *Bordetella*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* e *Nocardia*. Apresentou maior produção de enzima a *Nocardia* que foi usada na produção de 6APA. Foram usados 2 gramos de célula, como fonte de enzima, em um litro de uma solução de 0,5% de penicilina G, em tampão fosfato 0,1M pH 7,5, e foi incubado a 28^oC por 16 horas, obtendo-se 80% de conversão.

BATCHELOR et al (1961a), relataram a presença de ácido 6 aminopenicilânico no caldo de fermentação com *Penicillium chrysogenum*, na produção de penicilina G, quando não é adicionado o precursor ácido fenil acético.

COLE e ROLINSON (1961), relataram a produção de 6APA, pela incubação de miscelo de *Emericellopsis mínima* com penicilina V. Esta enzima penicilina amidase é igual às outras produzidas por fungos, apresentando maior atividade em penicilina V, do que em penicilina G.

BATCHELOR et al (1961c), relataram a produção extra-celular da penicilina amidase e intracelular da penicilinase, por *Streptomyces lavendulae*. A penicilina amidase apresentou maior atividade em penicilina G que em penicilina V. O pH ótimo da enzima penicilina amidase foi em torno de 9,0, e a sua temperatura ótima ao redor de 50°C. A enzima apresentou maior estabilidade em pH alcalino, mantendo 96% de atividade relativa quando incubada por 5 horas a pH 11, à temperatura ambiente. Na produção de 6APA pela incubação a 45°C, de 1% de fenoximetil penicilina e enzima penicilina amidase de *Streptomyces lavendulae*, a pH 8 por 5 horas, foi obtido 56% de conversão, sendo o restante 44% perdido pela presença da enzima penicilinase. O melhor meio de cultura encontrado para a produção da enzima foi: 3% de glicosa, 2,5% de fa-

rinha de soja, 0,5% de extrato de levedura, 0,5% de cloreto de sódio e 0,2% de carbonato de cálcio.








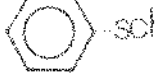




KAMEDA et al (1961), isolaram microrganismos produtores da penicilina amidase, usando meio de cultura que contém 0,1g de NH_4Cl , 0,1g de K_2HPO_4 , 0,05g de MgSO_4 , em 100 ml de água, pH ajustado a 7,0 - 7,2 e como fonte de energia foi usado somente penicilina G ou ácido fenil acético. No meio de cultura que contém penicilina G, os microrganismos cresceram em forma filamentosa. Foram encontrados 5 microrganismos produtores da penicilina amidase. Com o mais alto produtor da enzima, foi feita a incubação de massa celular com 2% de penicilina G, obtendo-se no máximo - 10% de conversão em 4 horas de incubação a 37°C , a pH 7,8.

HUANG et al (1963), de 392 microrganismos isolados, encontraram 60 produtores da penicilina amidase, apresentando maior produção de enzima, uma *Nocardia* e um *Proteus*. Foram usados como meio de cultura na fermentação submersa, (A) 20 g de água de maceração de milho, 20 g de melaço de beterraba, 10 g de glicerol, 1g de sulfato de magnésio para um litro, o pH foi ajustado a 7,5 com NH_4OH , (B) 4 g de extrato de levedura, 10 g de extrato de malte, 4 g de glicosa, o pH foi ajustado a 7,3. A presença de 6APA formada pela incubação de penicilina G e células de microrganismos, foi analisada qualitativamente, pelo método da cromat-

tografia de camada em papel, usando-se como sistema de solvente, butanol/ácido acético/água nas proporções de 5/4/1 v/v, obtendo-se um R_f para penicilina G e 6APA, de 0,9 e 0,5 respectivamente. A penicilina amidase apresentou pH ótimo de 8 para *Proteus* e *Nocardia*. Com a enzima penicilina amidase destes dois microrganismos foi estudada a especificidade com diferentes substratos:

Hidrólise da penicilina G e modificações estruturais



R	HIDRÓLISE	R	HIDRÓLISE
	+++		++
	++		<tr
	++		<tr
	++		±
	++		<tr
	±		<tr

+++ % de hidrólise 50-90
 ++ % de hidrólise 20-50

± % de hidrólise 1-5
 <tr % de hidrólise <1

CLARIDGE et al (1963), estudaram a especificidade da penicilina amidase, de *Penicillium chrisogenum*, *Cephalosporium*, *Alcaligenes faecalis* e *Escherichia coli*, com diferentes penicilinas. Com as bactérias foi feita a fermentação submersa por 18 horas, a 37°C, em meio de cultura de infusão de coração, e para fungos foi incubado por 120 horas a 21°C, em meio de cultura contendo hidrolizado de amido, farinha de amendoim, extrato de levedura e farinha de peixe. O 6APA produzido foi separado por cromatografia em papel, usando-se como sistema de solvente n butanol/ácido acético/água nas proporções de 60/15/25 v/v; posteriormente os papéis foram pulverizados com cloreto de fenil acetato, para transformar o 6APA em penicilina G, e assim os papéis foram usados - em antibiograma. Com os diferentes substratos usados, foi confirmado o trabalho de ROLINSON et al (1960), que a enzima penicilina amidase de fungo hidroliza mais rapidamente penicilina V que G, sendo que as enzimas das bactérias mostraram mais atividade para penicilina G do que para V.

COLE (1964), relatou a hidrólise de derivados de ácido fenil acético, por penicilina amidase de *E.coli* BRL 1040, sendo melhor - substrato que penicilina G, os compostos: fenil acetil-L- α -ácido amino fenil acético, fenil acetil-amina e fenil acetilglicina, apresentando neste último, 100% a mais de atividade. Pelo que se crê que a penicilina amidase, é uma enzima do tipo acilase não

específica para penicilina G, que hidrolisa penicilina G, pela sua especificidade no grupo ácido fenil acético.

KAUFMAN e BAUER (1964), relataram a hidrólise dos seguintes compostos, por enzima penicilina amidase de bactérias:

- 1) fenilacetil-L-ácido glutâmico $\xrightarrow{H_2O}$ ácido glutâmico + ácido fenil acético
- 2) aminofenil acetil glicina $\xrightarrow{H_2O}$ ácido α amino fenil acético + glicina
- 3) fenoxipropionil amida $\xrightarrow{H_2O}$ ácido α fenoxipropionico + amonio
- 4) α amino fenil acetil metil ester $\xrightarrow{H_2O}$ ácido α amino fenil acético + álcool metílico
- 5) ácido fenoxi acetil glicólico $\xrightarrow{H_2O}$ ácido fenoxi acético + ácido glicólico

Pelas reações de 1 a 5, constatou-se que não é necessário o grupo 6APA, para que ocorra a hidrólise, pois o nome da penicilina amidase ou penicilina acilase não estariam corretos.

SZENTIRMAI A. (1964), estudou a produção de penicilina amidase de E.coli Ny 1/3-67, e comprovou que o ácido fenil acético e o ácido fenoxi acético, servem de indutores na produção da penicilina acilase, obtendo-se um máximo de indução à concentração de 0,2% dos ácidos no meio de cultura. Sendo que o ácido fenil -

acético e ácido fenoxi acético , apresentaram uma forte inibição na atividade enzimática da penicilina amidase, de ordem de 45%, quando estes estão presentes no meio de reação entre penicilina G e massa celular, a uma concentração de 4%. Quando o meio de cultura contendo 1,5% de ácido glutâmico, 0,4% de extrato de levedura, 0,2% de ácido fenil acético, contém glicerol apresenta repressão na produção da enzima, e não foi devido ao pH baixo , porque este foi mantido em 8. Encontrou-se que a temperatura ótima para a fermentação é 28°C.

COLE (1966), relatou a presença da penicilina amidase nos seguintes fungos: *Penicillium* sp BRL 733, *Penicillium* sp BRL 736, *Penicillium* sp BRL 737, *P. chrysogenum* BRL 781, *P. chrysogenum* 803, *Aspergillus ochraceus* BRL 731, *Trichophyton mentagrophytes* BRL - 569, *Epidermophyton floccosum* BRL 772, *Cephalosporum* sp. CMI - 49.137, apresentando todos atividade em penicilina V, e somente *T. mentagrophytes* e *E. floccosum* apresentaram atividade em penicilina G.

ERICKSON et al (1965), estudaram a penicilina acilase produzida por dois *Penicillium chrysogenum*, um sendo alto produtor da penicilina G, quando é adicionado o precursor ácido fenil acético, e quando este é omitido, 6APA é liberado no meio de cultura; o outro *P. chrysogenum* não é produtor da penicilina G. O *Penicillium*-

não produtor da penicilina, apresentou três vezes mais atividade de penicilina amidase por miligrama de miscelo, que o produtor de penicilina. As enzimas de ambos *Penicillium* apresentaram mais atividade com penicilina V, que com penicilina G. A penicilina amidase apresentou pH ótimo de 9.

COLE e SUTHERLAND (1966), estudaram 148 microrganismos de origem clínica, das quais encontraram 10 produtores da penicilina-amidase, sendo 4 linhagens de *E. coli* e 6 linhagens de *Proteus* Rettgeri. Relataram que baixas temperaturas (26°C) de incubação, com alta aeração, em meio de cultura de caldo nutriente - contendo ácido fenil acético, favorecem a formação da penicilina amidase e em frascos sem aeração não há formação da mesma, pelo que se crê que a enzima penicilina amidase tem pouca influência na resistência à penicilina G "in vivo".

CHIANG e BENNET (1967), purificaram a penicilina amidase produzida em forma extracelular por *Bacillus Megaterium* ATCC 14.945. A enzima foi absorvida por celite do meio de cultura após separação da massa celular por centrifugação, eluída posteriormente com solução de 24% de sulfato de amônio. Após a eluição da enzima, o volume contendo a mesma foi concentrado a vácuo à 40°C, até aparecer os primeiros cristais de sulfato de amônio; o precipitado formado foi dialisado contra tampão fosfato pH 6,6-

(0.025M) e posteriormente passado por coluna de carboximetilcelulose. A enzima foi eluída usando-se tampão de fosfato pH 6,5 0,1M. O volume que contém a penicilina amidase foi tratado com celite e feita a eluição da enzima, concentração e diálise como foi descrita anteriormente, este último dialisado foi usado como enzima purificada, logrando-se uma purificação de 96 vezes. A enzima assim purificada apresentou um peso molecular determinado por ultracentrifugação de 120.000. Apresentou pH ótimo entre 8 e 9, apresentando a pH menor do que 5,5 e maior que 9,5, menor do que 10% de atividade relativa. Apresentando 100% de estabilidade a pH entre 6,5 e 10,05, por 9 horas de incubação a 24°C. A temperatura ótima da enzima foi de 45°C e foi totalmente inativada a 60°C. A especificidade de substrato desta penicilina amidase foi maior para penicilina G, mas apresentando atividade em outras penicilinas naturais, semi-sintéticas e amidas, tais como fenil acetil amida. Esta enzima apresentou inibição competitiva por ácido fenil acético e inibição não competitiva por 6APA. A constante de Michaelis foi $4,5 \times 10^{-3}$ M.

SINGH et al (1969), relataram a hidrólise de fenoxi-metil penicilina por esporos de *Fusarium* conglutinas e *Fusarium* muniliforme. A 50 ml de uma suspensão de esporo foi adicionado 100 mg de fenoximetil penicilina, obtendo-se em 48 horas de incubação, a 28°C, 80% de conversão. Esta enzima não apresentou atividade em

penicilina G.

COLE (1969), relatou a especificidade de penicilina amidase de *E. coli* NCIB 8743, com vários substratos, tais como: Penicilina G, α hidroxibenzil-penicilina, p-hidroxibenzil penicilina, α aminobenzil-penicilina, apresentando 100%, 156% e 49% de atividade relativa respectivamente, ou seja, apresentando mais de 50% de atividade em p-hidroxibenzil penicilina, que em penicilina G. O valor de Km obtido para esta penicilina amidase intracelular-foi 30.9 mM, quando foi usado como substrato penicilina G potássica. O pH ótimo foi 8,2 e temperatura ótima 40°C.

NARA T. et al (1971a), isolaram microrganismos produtores da enzima penicilina amidase, para a síntese de D α aminobenzil penicilina (ampicilina). Encontrou *Kluyvera citrophila* como produtora da enzima penicilina amidase, que é capaz de fazer a síntese de ampicilina, a partir de 6APA e ácido p-amino fenil acético.

NARA et al (1971b), relataram o isolamento de microrganismos produtores da penicilina amidase. De 519 microrganismos isolados, encontraram 8 produtores desta enzima.

Microorganismos produtores da enzima penicilina amidase

	PG 33mg/ml ; massa celular 2 mg/ml
	6APA mg/ml/20 horas
Kluyvera citrophila KY 3641	5,5
K. noncitrophila KY 3642	1,5
Pseudomonas Aeruginosa KY 3951	3,2
P. Crusiviae KY 3960	4,2
Micrococcus Urea KY 3967	0,6
M.Luteus KY 3781	0,6
Rhodopseudomonas spheroides KY 4112	0,4
Streptomyces ambofaciens SPSL-15	1,5

A determinação qualitativa de 6APA foi feita pelo método da cromatografia de camada delgada em placas de sílica gel . Os sistemas de solvente usados foram:

a) Acetato de butila, n butanol, ácido acético e água nas propor

ções de 80/15/40/24.

b) Acetato de isoamila, metanol, ácido fórmico e água nas ,
ções de 65/20/5/10.

c) n butanol, éter, acetona e água nas proporções de 28/9/9/11 ,
sendo os R_f de penicilina G e 6APA:

	R_f		
	a	b	c
PG	0,69	0,71	0,55
6APA	0,14	0,12	0,24

A revelação foi feita pela exposição das placas em vapores de amônio por 20 minutos, e pulverizadas com 2% de amido em solução saturada de cloreto de sódio, seguida pela pulverização de uma solução de iodo.

O ácido fenil acético para *P. crusiviae* KY 3960 não foi indutor na formação de penicilina amidase, e a glicose não reprime a síntese desta enzima; para *K. citrophila* KY 3641, 0,2% de ácido fenil acético, aumenta em 60%, a produção da enzima, e 0,5% de glicose reprime a síntese desta enzima.

Com o maior produtor da penicilina amidase, *Kluyvera citrophila* KY 3641, fez-se a produção de 6APA, usando-se uma solução de 21,4mg/ml de penicilina G em uma suspensão que contém 9,9mg/ml de massa celular, obtendo-se em 16 horas de incubação 90% de conversão.

OKACHI et al (1972a), relataram algumas condições para a produção de penicilina amidase por *Kluyvera citrophila* KY 3641. Em meio de cultura de caldo nutriente se obteve máxima produção de enzima a 96 horas de fermentação, com uma produção de 2,9mg de 6APA/ml em 4 horas de incubação. No meio de cultura de caldo nutriente, que contém glicose, frutose, maltose e lactose, há repressão na síntese da enzima. Esta *Kluyvera citrophila* KY 3641, produz também enzima penicilinase em conjunto com penicilina amidase, sendo que em condições anaeróbicas de fermentação, somente produz penicilinase.

OKACHI et al (1972b), usaram a penicilina amidase de *Kluyvera citrophila* KY 3641, na produção de D α amido benzil penicilina (ampicilina).

TAKASAWA S. et al (1972), relataram a produção de penicilina amidase e penicilinase por *Kluyvera citrophila* KY 3641. A inativa -

ção da enzima penicilinase foi feita em meio alcalino pH 9 por 4 horas a 40°C, sendo que nestas condições não se tem inativação da penicilina amidase, permitindo posteriormente a produção de 6APA, sem perda de PG e de 6APA.

BALANSINGHAM K. et al (1972), purificaram a penicilina amidase-intracelular de E.coli ATCC 9637, obtendo-se atividade específica de 68 vezes a mais. Foi determinado o valor de Km $7,7 \times 10^{-4}$ M. O ácido fenil acético inibe a enzima penicilina amidase em forma competitiva e o 6APA, em não competitiva.

OKACHI et al (1973a), induziram mutação com alaranjado de acridina a Kluyvera KY 3641, que produz as enzimas penicilina amidase e penicilinase para obter mutante deficiente de penicilinase. De 7.850 colônias isoladas, após tratamento com alaranjado de acridina, foram encontradas 160 linhagens deficientes em penicilinase. Estas mutantes deficientes de penicilinase, produziram mais 6APA do que a linhagem selvagem, a tempo curto de incubação, por não apresentarem perdas de penicilina G e 6APA produzido.

OKACHI R. et al (1973b), estudaram a enzima penicilina acilase de Pseudomonas melanogenum KY 3987, sendo que esta enzima somente hidrolisa D (-) α - aminobenzil penicilina, e não hidrolisa-

penicilina ; fenoxietil penicilina e p-aminobenzil penicilina.

SHIMIZU et al (1975), purificaram a penicilina acilase de uma linhagem mutante de *K.citrophila* KY 3641, deficiente de penicilinaase. O peso molecular da penicilina amidase foi de 63.000 , sendo determinado pelo método da cromatografia em camada delgada em Sephadex G-100. O ponto isoelétrico foi 8,12. A enzima purificada apresentou uma atividade específica de 123 vezes a mais. Esta penicilina acilase apresentou maior atividade em cefaloridina que em penicilina G.

KHACHATOURIANS et al (1973), relataram algumas propriedades de mutante de *E.coli* termosensível, que quando incubado em meio caldo nutriente, e ao mudar a temperatura de incubação de 30°C para 42°C, é interrompida a divisão celular, crescendo em forma filamentosa. Quando é transferido novamente de 42°C para 30°C, ocorre divisão celular, ainda que o meio de cultura contenha cloranfenicol, o qual indica que as células nas condições não permissíveis, acumulam material potencial, para a divisão celular.

MATTHIEU e HIROTA (1973), relataram algumas propriedades de mutantes de *E.coli* termosensíveis, que quando incubadas em meio de cultura de caldo nutriente, e ao mudar a temperatura de incuba -

ção de 30°C para 41°C, não ocorre divisão celular, crescendo em forma filamentosa. Foram encontrados três tipos de mutantes termosensíveis, quando se muda novamente a temperatura de incubação de 41°C para 30°C, sendo os mutantes tipo I os que não precisam de nova síntese de proteína para ter novamente divisão celular e mutante tipo II os que precisam de síntese de proteína. Mutante tipo III os que em nenhuma condição voltam a apresentar divisão celular.

Quando o meio de cultura contém NaCl, e incubada a 41°C, a maioria dos mutantes apresentam divisão celular.

SMITH et al (1974), relataram algumas propriedades de três mutantes de E.coli termosensíveis, que quando incubado em meio de cultura de triptona e extrato de levedura, e ao mudar a temperatura de incubação de 28°C a 42°C, é interrompida a divisão celular, crescendo em forma filamentosa. Quando são transferidos novamente de 42°C a 28°C, ocorre divisão celular e, se adicionado ao meio de cultura cloranfenicol, em duas mutantes, ocorre lise, e na outra, não ocorre divisão celular. A síntese de DNA nas três mutantes a 42°C, ocorre aparentemente normal, estando os núcleos distribuídos no filamento.

SANTOS e ALMEIDA (1975), relataram algumas propriedades de E.co

lí mutante termosensível, que quando incubada em meio caldo nutriente, e ao mudar a temperatura de incubação de 30°C para 42°C, a divisão celular é interrompida, crescendo em forma filamentososa. Quando adenina é adicionada ao meio de cultura, existe divisão celular a 42°C, mas se é adicionado também citosina e guanidina, a proteção por adenina deixa de existir, crescendo novamente em forma filamentososa. Este mutante preservou a síntese de DNA nas condições de 42°C, estando os núcleos regularmente espaçados no filamento. Ao aumentar a pressão osmótica com 1% de NaCl e incubada a 42°C, não apresentou proteção, crescendo em forma filamentososa.

MASAMUNE (1975), relatou algumas propriedades de E.coli mutante termosensível, que quando incubada em meio caldo nutriente, e ao mudar a temperatura de incubação de 30°C para 42°C, é interrompida a divisão celular, crescendo em forma filamentososa. O número de colônias permanece constante, mas com um contínuo aumento de absorvância a 660 nm. Mudando novamente a temperatura de 42°C para 30°C, volta a apresentar divisão celular em forma normal de bastonete, e o número das colônias aumenta mais rapidamente que o esperado, pelo tempo de geração. Quando o meio de cultura contém 5 g/litro de NaCl, e a temperatura de incubação é mudada de 30°C para 42°C, a divisão celular continua em forma normal. A síntese de DNA foi normal a 42°C, quando a linhagem -

mutante não apresentou divisão celular. Foram analisadas as proteínas da membrana celular, pelo método da eletroforese em gel de poliacrilamida, da linhagem mutante e a selvagem, quando incubadas a 42°C, e foi verificado que pelo menos uma banda de proteína, está em menor concentração na mutante.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram puros pro-análises e obtidos das firmas:

Merck

Carlo Erba

Baker

Ecibra

e os meios de cultura da Difco.

3.2. Equipamentos utilizados:

Estufas bacteriológicas (Fabbe)

Estufas - Fanem Ltda.

Estufa a vácuo - Fanem Ltda.

Evaporador rotativo de vidro - Buchler Instruments, Inc.

Agitador rotatório - Fermentation Design Inc.

Agitador rotatório com temperatura controlada.

Espectrofotômetro Perkin-Elmer, Coleman 124 D.

Potenciômetro - Horiba

Centrifuga - Beckman J 21B

Autoclave

Agitador magnético - Metrohm

Balança analítica - Sauter - Modelo 414

Microscópio

Banho termostático (Fabbe)

Conjunto para cromatografia de camada delgada (Desaga)

Materiais de vidro.

3.3. Métodos

3.3.1. Isolamento de Microrganismos do Solo

Os microrganismos foram isolados do solo, suspendendo-se em 10 ml de água destilada e esterilizada, 1 gramo de terra previamente obtida dos arredores de Campinas. A seguir inoculou-se com alça em placas de petri contendo, nutriente Agar e Czapek Agar, incubando-se por 24 horas a 30°C as placas de nutriente Agar, e por 72 horas as de Czapek. Após o crescimento das colônias, estas foram transferidas para tubos de ensaio contendo os seus respectivos meios de cultura.

3.3.2. Microrganismos de Origem Clínica

Foram fornecidos microrganismos de origem fecal, pelo Hospital Vera Cruz de Campinas.

3.3.3. Seleção de Microrganismos Produtores da Enzima

Cada um dos microrganismos isolados como está descrito nos itens 3.3.1. e 3.3.2 , foi inoculado com alça em frascos-Erlenmeyer contendo 20 ml de meio de cultura de caldo nutriente com 0,10% de ácido fenil acético, preparados como está indicado no item 3.3.8. Após 24 horas de incubação com agitação a 200 rpm à temperatura ambiente (26^o-30^oC) para bactérias, e 72 horas para fungos, foi verificada a produção de enzima penicilina amidase, da seguinte forma: um mililitro de meio de cultura após incubação, adicionou-se a um mililitro de 2% de penicilina G potássica PG(K), em tampão borato pH=8,0 (0.1M), e incubou-se aproximadamente por 14 horas a 40^oC. A presença de ácido 6 aminopenicilânico (6APA) formado pela hidrólise da PG(K) foi detectada qualitativamente pelo método da cromatografia de camada delgada, como está descrito no item 3.3.4.

3.3.4. Método da Cromatografia de Camada Delgada

Foram preparadas placas de cromatografia de camada delgada com sílica Gel Nach Stahl 60 de 0,25 mm de espessura como está descrito no livro de Stahl (1969).

Aplicou-se como substância padrão um microlitro de uma solução de: PG(K) a 1%, 6APA a 0,1%, meio de cultura caldo nutri-

ente em conjunto com 6APA e as amostras em análise. Usou-se como sistema de solvente acetato de etila/ácido acético/butanol/clorofórmio nas proporções de 20/20/70/15 respectivamente, deixou-se correr o fronte por 10 centímetros; após secagem das placas, a revelação foi feita com uma solução de ninidrina a 0,1% em uma mistura de etanol/ácido acético nas proporções de 95/5 em volume, e posteriormente as placas foram colocadas em estufa a 120-130°C durante 10 a 15 minutos.

3.3.5. Determinação Quantitativa de Atividade da Penicilina Amidase

Após incubação, 5 ml de meio de cultura (item 3.3.3.) e 5 ml de uma solução de PG(K) a 4% em tampão borato pH 8.2 (0.1M), foram incubados a 40°C por 20 minutos, e imediatamente adicionou-se ácido sulfúrico 5 N suficiente para atingir pH=2 (aproximadamente 0,25 ml) e em seguida, centrifugou-se à uma rotação de 10.000 rpm, para separar a massa celular e PG(K) precipitada. Após centrifugação fez-se duas vezes a extração da PG(K) ainda presente em solução, com um volume de acetato de butila. Ajustou-se a fase aquosa a pH=7,0, com Na(OH) 2N e completou-se a um volume conhecido. Aplicou-se o método da hidroxilamina como está indicado no item 3.3.7., para determinar o 6APA presente.

3.3.6. Definição de Unidade de Enzima

Uma unidade de enzima penicilina amidase significa a produção de um micromol de 6APA em um minuto, pela incubação de enzima e PG(K) a 40°C por 20 minutos, como está indicado no item 3.3.5.

3.3.7. Método da Hidroxilamina, segundo Bachelor (1961b)

Preparar as seguintes soluções:

- Solução Hidroxilamina: Pesar 347.6 g de hidroxilamina HCl e completar a um litro em balão volumétrico.

- Solução Acetato: Pesar 173 g de hidróxido de sódio e 20,6 g de acetato de sódio e dissolvê-los a um litro, em balão volumétrico.

- Solução Sulfato de Amonio Fêrrico: Pesar 200 g de sulfato de amonio fêrrico e adicionar 93,4 ml de ácido sulfúrico - concentrado, transferir e completar a um litro em balão volumétrico.

- Reagente Hidroxilamina: Preparar a seguinte solução, só na hora de fazer a análise: misturar solução de hidroxilamina, solução acetato e álcool etílico, nas proporções 1/1/4, verificar o pH desta solução, que deve ser 7,0.

Em dois tubos de ensaio pipetam-se 2 ml de amostra (da fase -

aquosa após extração de PG(K) do item 3.3.5., ou outra amostra. No branco pipetam-se 0,25 ml de hidróxido de sódio 5 N, seguido após 10 minutos por 0,25 ml de ácido sulfúrico 5 N. No outro tubo, o teste, pipetam-se 0,5 ml de água destilada. Em ambos os tubos pipetam-se 6 ml de reagente hidroxilamina, e após 10 minutos, pipetam-se 2 ml da solução de sulfato de amônio férrico. - Após 5 minutos ler no espectrofotômetro a absorvância a 490 nm.

Com a curva padrão estabelecida para diferentes concentrações de 6APA (de 0,1 mg/ml a 1 mg/ml), obtém-se a concentração de 6APA na amostra.

3.3.8. Fermentação Submersa

Colocaram-se 20 ml de meio de cultura em estudo, em frascos Erlenmeyer de 250 ml, devidamente fechados com tampões de algodão, em autoclaves a 121°C por 15 minutos. Após esterilização, fez-se a inoculação com 1 ml da cultura em estudo, prévia resuspensão da massa celular de um tubo de Agar inclinado, ajustando-se para ter uma concentração de aproximadamente 10^8 células por mililitro. Também a inoculação foi feita com uma alça, dependendo do estudo a ser feito. Incubou-se em agitador rotatório a 200 rpm na temperatura de estudo. Posteriormente mediu-se a atividade enzimática como está citado no item 3.3.5., a massa

celular como no item 3.3.9. e o pH.

3.3.9. Determinação da Massa Celular

Após crescimento, a massa celular foi obtida por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos e, o precipitado obtido, foi resuspenso em água destilada. Este procedimento foi repetido - três vezes. As células assim lavadas, foram resuspensas em água destilada ao volume original, e foi medida a absorvância a 660 nm.

Correlacionou-se também a medida de absorvância com o peso seco da massa celular, secando-se a suspensão da massa celular em estufa à vácuo a 80°C por 6 a 8 horas.

3.3.10. Localização da Enzima

Com os microrganismos produtores da penicilina amidase, inocularam-se e incubaram-se frascos Erlenmeyer, como está descrito no item 3.3.8. Após incubação, o meio de cultura foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos. A massa celular foi lavada três vezes com centrifugação nas condições descritas, e resuspensa ao volume original. Com a resuspensão da massa celular e o primeiro sobrenadante, mediu-se a atividade enzimática como está indicado no item 3.3.5. e verificou-se se a atividade da enzima estava na resuspensão da massa celular ou no primeiro

sobrenadante.

3.3.11. Cinética de Fermentação

Colocou-se 20 ml de meio de cultura em estudo, em frascos Erlenmeyer como está indicado no item 3.3.8. Inoculou-se com uma suspensão de massa celular do microrganismo em estudo, e a cada duas horas foram retirados dois frascos Erlenmeyer para se analisar a atividade enzimática (item 3.3.5.), a massa celular (3.3.9.) e o pH.

3.3.12. Efeito da Aeração

Foram preparados frascos Erlenmeyer como está indicado no item 3.3.8., contendo 10, 20, 40, 60, 80 e 100 ml de meio de cultura de 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,15% de ácido fenil acético. Foram inoculados com o microrganismo em estudo, e incubados a 25°C em agitador rotatório a 200 rpm. Retiraram-se 2 frascos Erlenmeyer de cada um, às 18, 20 e 24 horas de incubação, medindo-se a atividade enzimática (3.3.5.), massa celular (3.3.9) e pH.

3.3.13. Efeito de Indutor Ácido Fenil Acético no Início da Fermentação

Prepararam-se frascos Erlenmeyer como está indicado no item 3.3.8., com meio de cultura de 1% de peptona, 0,5% de ex-

trato de levedura e diferentes concentrações de ácido fenil acético, tais como: 0,05%, 0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,30% e 0,40%. Após inoculação e incubação a 25°C por 24 horas, com o microrganismo em estudo, foi analisada a atividade da penicilina amidase (item 3.3.5.), massa celular (3.3.9) e pH.

3.3.14. Efeito do Ácido Fenil Acético a Diferentes Tempos

Foram preparados frascos Erlenmeyer como está indicado no item 3.3.8., com meio de cultura, de 1% de peptona, 0,50% de extrato de levedura. Com uma solução esterilizada de 10% de ácido fenil acético pH=7, foram adicionados após inoculação, diferentes quantidades de AFA, a diferentes tempos. Após 24 horas de incubação a 200 rpm, a 25°C, foi medida a atividade enzimática, massa celular e pH.

3.3.15. Influência de Cations na Produção de Enzima

Prepararam-se frascos Erlenmeyer como está indicado no item 3.3.8., contendo 20 mililitros de meio de cultura de 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,15% de AFA, contendo os seguintes cations: CaCl_2 , CoCl_2 , CuSO_4 , FeSO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 , NaCl , KCl e ZnCl_2 , nas concentrações de 0,01 M e 0,001 M, respectivamente.

3.3.16. Efeito do pH Inicial na Produção de Enzima

Foram preparados frascos Erlenmeyer como está indicado-

no item 3.3.8., com meio de cultura de 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,15% de AFA, e ajustados os pHs a 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0, 9,0 e 10,0 com ácido sulfúrico 5 N ou hidróxido de sódio 5 N. Inoculou-se com o microrganismo em estudo e incubou-se a 200 rpm, a 25°C, por 20 horas. Mediu-se a atividade enzimática, massa celular e pH.

3.3.17. Efeito da Temperatura na Produção da Enzima

Foram preparados frascos Erlenmeyer como está indicado no item 3.3.8., com meio de cultura de 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,15% de AFA, pH=7,0. Inoculou-se com o microrganismo em estudo, e foram incubados às temperaturas de 30°C, 27°C, 25°C e 23°C, a 200 rpm. A cada 2 horas após inoculação, foram feitas as análises de atividade enzimática (item 3.3.5.), de crescimento de massa celular (item 3.3.9.) e pH.

3.3.18. Meios de Cultura Usados

a) Meio mínimo: Usou-se como meio mínimo: 15 g KH_2PO_4 , 2,0 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25 g MgSO_4 para um litro de água destilada, prévia neutralização a pH=7, com Na (OH) 5 N, e para meio sólido adicionou-se 15 g de Agar.

b) Meio Farelo de Soja (F.S.D.) Farelo de Soja Desengor

durado (F.S.D.) passado por moinho de martelo e peneirado em malha de 0,5 mm de diâmetro, foi mergulhado em água nas proporções de 5 g de F.S.D. em 100 ml de água, e posteriormente foi usado como meio de cultura.

c) Sobrenadante de Farelo de Soja (S.F.S.D.). O meio de farelo de soja indicado no item 3.3.18b, foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante usado como meio de cultura.

d) Hidrolizado Alcalino de Farelo de Soja (H.A.F.S.). Deixou-se em refluxo por 1 hora, 5% de farelo de soja desengordurado em 0,2% de uma solução de hidróxido de sódio, seguida de centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi usado como meio de cultura após ser neutralizado com ácido sulfúrico 1 N.

e) Hidrolizado Enzimático de Farelo de Soja (H.E.F.S.). Incubou-se por 24 horas à 45°C, 5% de farelo de soja em água a pH=6, com 0,2% de enzima papaina (com relação a F.S.D.), seguida por centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos: o sobrenadante obtido foi usado como meio de cultura.

f) Sobrenadante Água de Maceração de Milho (S.A.M.M.).

A água de maceração de milho (da Refinações de Milho, de Mogi-Guaçu) foi centrifugada a 3.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi usado.

g) Hidrolizado Alcalino de Isolado Proteico de Soja.

(H.A.I.P.S.). O isolado proteico de soja (I.P.S.) - Proteimax 90 (elaborado pela SAMBRA S/A) foi processado como o F.S.D. indicado no item 3.3.18.d.

h) Hidrolizado Enzimático de Isolado Proteico de Soja.

O isolado proteico de soja Proteimax 90, foi processado como o F.S.D. indicado no item 3.3.18.e.

i) Hidrolizado Alcalino de Caseína. (H.A.C.). A caseína

elaborada pela LECO foi processada como o F.S.D., indicado no item 3.3.18.d.

j) Hidrolizado Enzimático de Caseína (H.E.C.). A ca-

seína foi processada como o F.S.D., indicado no item 3.3.18.e.

k) Extrato de Levedura de Laboratório. Resuspenderam-

se 100 g de levedura usada na panificação, em um litro de água. O pH foi ajustado a 5, e manteve-se à 30⁰C por 14 horas aproxi

madamente, seguida por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos; o sobrenadante obtido, foi usado como meio de cultura.

3.3.19. Efeito do pH sobre a Atividade da Penicilina Amidase

Usando-se o processo indicado no item 3.3.5., verificou-se o efeito do pH na atividade enzimática. Foi usada como substrato a penicilina G, em solução fosfato na faixa de pH 6,0 a 8,0, e tampão borato entre pH de 7,6 e 10,0.

3.3.20. Influência da Temperatura na Atividade da Penicilina Amidase

A influência da temperatura na atividade de penicilina amidase foi verificada, usando-se o método citado no item 3.3.5. pela incubação, às temperaturas entre 25°C e 50°C.

3.3.21. Produção de 6APA

Frascos Erlenmeyer de 500 ml, contendo 100 ml de meio de cultura de 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,15% de ácido fenil acético, foram inoculados com E.coli FEA 30 MQ₁ e incubados a 23°C, a 200 rpm, por 20 horas, seguido por 1 ml de acetato de butila, e continuou-se a incubação por mais 15 minutos.

Após a incubação, a massa celular foi obtida por centrifugação

a 10.000 rpm por 15 minutos, e seguida de três lavagens nas mesmas condições. A massa celular foi resuspendida a um volume dado, para se obter a atividade por mililitro desejada.

Posteriormente adicionou-se PG(K) até obter a concentração em estudo, e incubou-se na temperatura em estudo, mantendo-se sob agitação constante. O pH da reação manteve-se constante em 8,2, adicionando-se hidróxido de sódio 2 N. Usou-se o volume gasto de hidróxido de sódio 2 N com o tempo de reação, para se obter o 6APA produzido a diferentes tempos. Considerou-se a reação terminada se em meia hora não existisse mudança do pH, obtendo-se desta maneira a máxima conversão de 6APA produzida nestas condições de reação. Prosseguiu-se posteriormente à recuperação do 6APA.

3.3.22. Recuperação do 6APA e Cristalização

Após conversão máxima de PG(K) em 6APA, como está indicado no item 3.3.21., centrifugou-se a mistura de reação, a 10.000 rpm por 15 minutos, recuperando-se assim a massa celular (que pode ser usada novamente, na produção de 6APA, item 3.3.21).

Após centrifugação, ajustou-se no sobrenadante o pH a 2,0, com ácido sulfúrico 5,0 N, e a PG(K) residual é extraída duas vezes, usando-se um volume de acetato de butila, por volume de

reação. Após separação da fase aquosa, ajustou-se esta a pH=7,0, com hidróxido de sódio 5,0 N. Prosseguiu-se a concentração a vácuo em evaporador rotativo, a um quarto do volume original aproximadamente; em seguida adicionou-se um volume de etanol. O precipitado formado foi separado por centrifugação a 5.000 rpm por 15 minutos, e com o sobrenadante continuou-se a concentração a um quinto do volume original aproximadamente. Em seguida ajustou-se o pH ao ponto isoelétrico de 4,3. Deixou-se repousar à temperatura de 5°C - 10°C por aproximadamente 12 horas.

Os cristais formados de 6APA foram recuperados por centrifugação a 5.000 rpm por 15 minutos, e lavados com acetona. A secagem foi feita em estufa a vácuo à 60°C por 5 horas.

3.3.23. Indução de Mutação com Nmetil-N'-nitro-N-nitroguanidina (MNNG), segundo o Método de Adelberg (1965), modificado

A partir de uma cultura de 24 horas, de um tubo de nutriente - Agar de superfície inclinada, do microrganismo a ser tratado, prepararam-se 20 mililitros aproximadamente de uma suspensão de massa celular e foi seguida de três lavagens com centrifugação a 10.000 rpm por 15 minutos. Resuspendeu-se a massa celular a uma população de aproximadamente 10^8 microrganismos por mililitro. Pipetou-se um mililitro desta suspensão de massa celular a

12 tubos de centrifuga prèviamente esterilizados, e em seguida pipetou-se em cada um dos tubos, três mililitros de uma solução contendo 4 miligramas por mililitro de MNNG dissolvidos em tampão citrato 0,2 M, pH=5,0, esterilizado por filtração em membrana de 0,22 microns.

A cada 10 minutos, centrifugaram-se 2 tubos a 10.000 rpm por 5 minutos, e foram seguidos de três lavagens com centrifugação, nas condições descritas. Resuspendeu-se a massa celular em 10 mililitros com água destilada. Com cada uma das resuspensões de massa celular, fizeram-se diluições sucessivas e foram inoculadas em placas de petri contendo nutriente Agar, e incubadas por 24 horas a 30°C. Após a contagem do número de sobreviventes, das placas correspondentes ao tempo no qual se causou uma mortalidade de aproximadamente 99,9%, foram isoladas e transferidas as colonias a tubo de nutriente Agar inclinado.

3.3.24. Mutação ultravioleta

Preparou-se uma suspensão de massa celular como está indicado no item 3.3.23. Em uma placa de petri esterilizada pipetaram-se 20 mililitros desta suspensão, que foi exposta a 20 cm de uma luz ultravioleta de uma lampada de 15w. Cada 20 segundos até 100 segundos, retirou-se 1 mililitro e fez-se diluição sucessiva, contagem e isolamento, como está indicado -

no item 3.3.23.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Seleção de Microrganismos Produtores da Enzima Penicilina

Amidase

De 670 microrganismos isolados como está indicado no item 3.3.1., foi feita a análise como está indicado no item 3.3.3., estando o resultado da cromatografia de camada delgada 3.3.4., para as substâncias padrões mostradas na Figura 1. Desta forma encontraram-se três microrganismos produtores da penicilina amidase. De 25 microrganismos de origem clínica, como está indicado no item 3.3.2., encontrou-se um produtor da penicilina amidase.

Todos os microrganismos isolados produtores da penicilina amidase, não apresentaram atividade da penicilinase, uma vez que os microrganismos produtores da penicilinase, apresentam na cromatografia de camada delgada item 3.3.4., um produto da reação com PG(K) o ácido penicilinilóico, de R_f de 0,70, como se pode observar na Figura 2.

4.2. Taxonomia

A taxonomia dos quatro microrganismos produtores da penicilina amidase foi baseada na oitava edição do Manual Bergey-

de Taxonomia Bacteriológica (1975), sendo os resultados os seguintes:

4.2.1. Linhagem I:

- a) Morfologia e GRAM
bastonete GRAM negativo
- b) Catalase +
- c) β galactosidase +
- d) Gás de glicose +
- e) Crescimento em KCN -
- f) Redução de nitrato +
- g) Hidrólise de uréia -
- h) Crescimento em citrato +
- i) H_2S em meio TSI -
- j) Indole +
- k) Arabinose +

Sumarizando todos os dados citados acima, o diagnóstico da linhagem foi feito como Escherichia Coli.

4.2.2. Linhagem II:

- a) Morfologia e GRAM
bastonete, GRAM positivo

- b) Esporulado
- c) Facultativo anaeróbico

Sumarizando os dados citados acima, o diagnóstico da linhagem - foi Bacillus Sp.

4.2.3. Linhagem III:

- a) Morfologia e GRAM
bastonete, GRAM positivo
- b) Não esporulado
- c) Facultativo anaeróbico
- d) Catalase +
- e) Pigmentação amarela

Sumarizando os dados citados acima, o diagnóstico da linhagem - foi Corynebacterium Sp.

4.2.4. Linhagem IV:

- a) Morfologia e GRAM
microesferas (0,5 microns), GRAM positivo
- b) Aeróbico
- c) Catalase positivo

Sumarizando os dados acima citados, o diagnóstico da linhagem-

foi micrococcus Sp.

A taxonomia da linhagem I, foi confirmada pelo Hospital Vera Cruz de Campinas.

4.3. Localização da Enzima

Fazendo-se o estudo da localização da enzima como está indicado no item 3.3.10., constatou-se que os 4 microrganismos-produtores da penicilina amidase, fazem-no em forma intracelular.

4.4. Efeito do Indutor

Foram usados como possíveis indutores da penicilina amidase, ácido fenil acético, fenilacetilamida, fenilacetato de etila e 1-fenilacetato-3-palmitato de glicerol. Constatou-se que somente o ácido fenil acético induz a produção desta enzima.

Inocularam-se os microrganismos isolados produtores da penicilina amidase, E.coli FEA 30, Bacillus Sp. FEA 31, Corynebacterium Sp. FEA 32, e Micrococcus Sp. FEA 33, nas condições descritas no item 3.3.13. Os resultados obtidos estão mostrados na Figura 3. Pode-se observar que o microrganismo que apresenta maior produção de enzima (3.3.5.) é E. coli- FEA 30, seguida por Bacillus Sp. FEA 31, Micrococcus Sp. FEA 33, e Corynebacterium Sp. FEA 32. O nível de ácido fenil acéti

co para máxima indução da enzima, assim como o efeito do mesmo, variam em cada microorganismo. Constatou-se que E.coli FEA 30 , precisa de 0,15% de AFA para se obter máxima indução, aumentando a produção de enzima em 7 vezes; para o Bacillus Sp. FEA 31, é necessário 0,05% de AFA aumentando a enzima em uma vez; para o Micrococcus Sp. FEA 33, é necessário 0,30% de AFA, aumentando a enzima em 5 vezes; para o Corynebacterium Sp. FEA 32 se precisa 0,05% de AFA, porém aumenta a produção da enzima somente 0,5 vezes.

Sendo portanto, a enzima penicilina amidase na E.coli FEA 30 e Micrococcus Sp. FEA 33 induzível, e parcialmente induzível no Bacillus Sp. FEA 31 e Corynebacterium Sp. 32.

4.5. Efeito do Ácido Fenil Acético, Adicionado à Diferentes Tempos

Foram preparados frascos Erlenmeyer como está indicado no item 3.3.14., com meio de cultura de 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, e diferentes quantidades de ácido fenil acético adicionados a diferentes tempos. Os frascos Erlenmeyer foram inoculados com E.coli FEA 30, e após 20 horas de incubação foram medidos: atividade enzimática (item 3.3.5.), massa celular (item 3.3.9.) e pH, estando os resultados apresentados no Quadro nº 1. Pelos resultados obtidos, o ácido fenil acético de

ve ser adicionado em partes de 0,05% após duas, quatro e oito horas de incubação, aumentando assim a produção de enzima em nove vezes, contra sete, quando se adiciona 0,15% de ácido fenil acético no início da fermentação. O ácido fenil acético - quando adicionado após 8 horas de incubação aumenta a produção da enzima em uma vez, e após 12 horas aumenta em só meia vez, quando comparado com a adição de ácido fenil acético no início da fermentação.

4.6. Efeito do pH na Atividade de Penicilina Amidase

Foi feito o estudo do efeito do pH na atividade da penicilina amidase intracelular da E.coli FEA 30, pelo método citado no item 3.3.19., estando os resultados na Figura 4. Constatou-se que o pH ótimo da enzima está entre 8,0 e 8,5.

4.7. Temperatura Ótima na Atividade de Penicilina Amidase

Foi feito o estudo da temperatura ótima da atividade da penicilina amidase intracelular da E.coli FEA 30, pelo método descrito no item 3.3.20., estando os resultados mostrados na Figura 5. Constatou-se que a temperatura ótima foi de 40°C, sendo que a 50°C, apresentou somente 10% da atividade máxima, pelo que esta enzima é termolábil.

4.8. Cinética de Reação de Penicilina Amidase

A atividade da penicilina amidase intracelular da E.coli-FEA 30, foi examinada pelo método descrito no item 3.3.5., usando-se várias concentrações de PG(K). O valor da constante de Michaelis (Km), foi calculado a partir da Figura nº 6, sendo o valor obtido $37 \times 10^{-3} M$, e Vm foi de 1 $\mu mol/min/ml$.

4.9. Influência do Meio de Cultura na Produção de Enzima em E. coli FEA 30

Usou-se como meio de cultura na produção da penicilina - amidase, diferentes concentrações de peptona, extrato de levedura, extrato de carne e glicose. Fez-se a fermentação submersa com E.coli FEA 30, como está indicado no item 3.3.8., e analisou-se a atividade da enzima como está indicado no item 3.3.5., massa celular como está indicado no item 3.3.9. e pH após 20 horas de incubação.

Os resultados obtidos estão no Quadro 2. Constatou-se que o melhor meio de cultura é o nº 13, constituído de 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,15% de AFA, pH inicial antes de autoclavagem 7,0.

Pela produção de enzima no melhor meio de cultura (nº 13), com tendo diferentes concentrações de glicose tais como 0,5%, 1% e

2%, constatou-se a repressão da glicose na síntese da enzima. Esta repressão não foi devida à queda do pH, já que os meios que contêm glicose foram tamponados também em pH=7, mostrando ainda assim baixa atividade de penicilina amidase.

Nakada e Magasanik (1964) relataram a repressão da síntese de enzimas induzíveis pela glicose sendo este efeito conhecido como repressão catabólita ou efeito da glicose. Aparentemente o indutor estimula a síntese de RNA mensageiro, sendo este muito instável, e os catabólitos da glicose ou a mesma, apresentam o efeito contrário, inibindo a síntese de RNA mensageiro.

Crombruggh et al (1969) relataram que a glicose abaixa o nível de AMP-cíclico nas células de E.coli e ao adicionar este composto no meio de cultura que contém glicose, a repressão pela glicose na síntese de algumas enzimas, tais como: β galactosidase, triptofanase, D-serina de aminase, é removida. Pelo que se crê que o AMP-cíclico regula a síntese de algumas enzimas induzíveis.

Assim, possivelmente a repressão da glicose, na síntese da penicilina amidase, é um efeito semelhante a outras enzimas induzíveis. Sendo que o efeito de repressão pela glicose é maior - que o efeito do indutor ácido fenil acético.

Em meio mínimo (3.3.18a) a produção da penicilina amidase não foi detectável.

4.10. Efeito do pH Inicial na Produção de Enzima

Foram preparados frascos Erlenmeyer como está citado no item 3.3.16, com meios de cultura de 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,15% de AFA, a diferentes pH inicial, e inoculados com E.coli FEA 30. Os resultados estão mostrados no Quadro nº 3.

Constatou-se que no pH inicial de 4,0 e 10,0, a E.coli FEA 30 não apresentou crescimento, sendo que a máxima produção da enzima foi obtida em pH 7,0. Em pH 6,0 e 8,0 apresentou 90% e 95% da sua produção máxima, respectivamente.

4.11. Efeito da Aeração na Produção da Enzima

Foram preparados frascos Erlenmeyer contendo diferentes volumes de meio de cultura como está indicado no item 3.3.12, e foram inoculados com E.coli FEA 30, estando os resultados no Quadro nº 4.

Constatou-se que o aumento de volume do meio de cultura entre 20 e 60 ml nos frascos Erlenmeyer de 250 ml, não tem efeito na atividade da enzima, e na produção de massa celular, obtendo-se

a máxima atividade e produção de massa celular às 20 horas de incubação. Com um volume de 80 e 100 ml a atividade da enzima diminui para 80% e 60% respectivamente. Porém obtém-se a mesma produção de massa celular às 24 horas de incubação.

4.12. Influência de Cation na Produção de Enzima

Foram preparados frascos Erlenmeyer como está citado no item 3.3.15 e inoculados com E.coli FEA 30, contendo diferentes cations, estando os resultados apresentados no Quadro nº 5.

Dos cations estudados, CaCl_2 , NaCl , KCl não apresentaram influência na atividade enzimática da penicilina amidase, e CoCl_2 , $(\text{Fe})_2(\text{SO}_4)_3$, MnSO_4 e ZnCl_2 , inibiram o crescimento de E.coli à concentração de 0,01 molar. À concentração de 0.001 molar, apresentaram crescimento, mas a produção da enzima foi 50%, 70%, 80% e 50% de atividade relativa quando comparada com o meio de control sem cations. O CuSO_4 apresentou uma atividade de 50% e 80%, à concentração de 0.01 molar e de 0.001 molar respectivamente. O MgSO_4 apresentou 60% e 80% de atividade relativa à concentração de 0.01 molar e 0.001 molar, respectivamente.

4.13. Indução de Mutação de E.coli FEA 30 com MNNG

Foi feita a mutação de E.coli FEA 30, como está descrito no item 3.3.23. O número de microrganismos sobreviventes com o

tempo de exposição em MNNG, é mostrado à Figura nº 7. Obteve-se uma mortalidade de 99,9% entre os tempos de 40 e 50 minutos de exposição.

Isolaram-se das placas correspondentes a 50 minutos de exposição, 800 linhagens. Com estas 800 linhagens, foi feita fermentação submersa como está citado no item 3.3.8 a 25°C. Usou-se meio de cultura 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,15% de ácido fenil acético, e foi feita a análise da atividade como está descrito no item 3.3.5. Dentre estas 800 linhagens, encontrou-se uma linhagem E.coli FEA 30 MQ1, que produziu 100% a mais de enzima que a linhagem selvagem. E.coli FEA 30, como está mostrado na Figura nº 12 e Tabela nº 7. Dentre as 800 linhagens, 82 não cresceram em meio mínimo (item 3.3.18a), apresentando a menor atividade enzimática de penicilina amidase que a selvagem, e 20 foram β galactosidase negativa quando testadas em meio EMB Agar, apresentando também todos estes microrganismos menor atividade que a selvagem. Esta linhagem mutante E.coli FEA 30 MQ1, quando inoculada em meio mínimo (item 3.3.18a) não apresenta divisão celular, crescendo em forma filamentosa (Figura nº 8), e não apresentando atividade de enzima penicilina amidase neste meio mínimo.

Ueda (1970): os agentes mutagênicos químicos agem modificando -

as bases do DNA, assim: o HNO_2 , transforma a adenina em hipoxantina, a guanina em xantina, e a citosina em uracila. A hidroxilamina reage especificamente com citosina. O MNNG age metilando as bases nitrogenadas. Na indústria, os agentes mutagênicos mais empregados são: irradiação ultravioleta e MNNG.

4.14. Algumas Propriedades de E.coli FEA 30 MQ1

A linhagem E.coli FEA 30 MQ1:

- a) Quando inoculada em nutriente Agar e incubada a 42°C , apresenta divisão celular.
- b) Quando inoculada em meio mínimo (item 3.3.18a) e incubada a 25°C , 30°C e 37°C , não apresenta divisão celular, crescendo em forma filamentosa.
- c) Quando inoculada em meio mínimo (item 3.3.18a) e incubada a 42°C , não apresenta crescimento.
- d) Quando inoculada em meio mínimo (item 3.3.18a) contendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de adenina, citosina, guanidina e timina, cada uma separadamente, e com a mistura das quatro bases, não apresenta divisão celular, quando incubadas a 37°C .
- e) Quando inoculada em meio mínimo (item 3.3.18a) contendo 1% de peptona e incubada a 37°C , não apresenta divisão celular.
- f) Quando inoculada em meio mínimo (item 3.3.18a) modificado - contendo somente 0.10% de fosfato, e incubado a 37°C , apresenta divisão celular.

- g) Quando inoculada em meio nutriente Agar, contendo cloreto de sódio entre 3% e 5%, não apresenta divisão celular.
- h) Quando inoculada em meio nutriente Agar contendo glicose entre 10% e 15%, não apresenta divisão celular.
- i) Quando inoculada em meio de 1% de peptona e incubada à 37°C, apresenta divisão celular.
- j) Foram replicadas 7 vezes consecutivas em tubo de Agar inclinado de meio mínimo (item 3.3.18a) e incubadas à 37°C por 24 horas e sempre manteve a forma filamentosa de crescimento. A oitava replicação foi feita em nutriente Agar, voltando a ter novamente divisão celular, e mais uma vez foi inoculada em meio mínimo, voltando a não apresentar divisão celular.

Algumas linhagens mutantes de E.coli foram relatadas como sendo sensíveis à altas temperaturas de incubação. Não apresentando divisão celular e crescendo em forma filamentosa quando incubada a 42°C, sendo que mudando a temperatura de incubação para 30°C, estes voltam a apresentar divisão celular. Khachatourians et al (1973) relataram que um mutante termosensível, que cresce em forma filamentosa à temperatura de incubação de 42°C, ao mudar a temperatura para 30°C, não precisa de nova síntese de proteína, para ter divisão celular. Matthieu e Hirota (1973) relataram as características de três tipos de mutantes termosensíveis: a) os que precisam de síntese de nova proteína; b) os que

não precisam de nova síntese de proteína; c) os que em nenhuma condição não apresentam divisão celular, ao mudar a temperatura de incubação de 42°C para 30°C. A síntese de DNA foi normal a 42°C. Quando 1% de NaCl é adicionado no meio de cultura, e a incubação é feita a 42°C, ocorre divisão celular.

Smith et al (1974) relataram que a síntese de DNA à temperatura de incubação de 42°C foi normal, em três mutantes de E.coli termosensíveis, mas ao mudar a temperatura de incubação para 30°C, na presença de cloranfenicol, um apresentou divisão celular e dois apresentaram lise .

Santos e Almeida (1974) relataram a recuperação da divisão celular, de um mutante termosensível quando incubado à 42°C e ao adicionar adenina no meio de cultura, mas adicionando-se também guanidina e citosina, a proteção pela adenina é perdida, crescendo novamente em forma filamentosa.

Masamune (1975) relatou que pelo menos uma proteína da membrana celular está em menor concentração na mutante termosensível, quando incubada à 42°C e comparada com a selvagem. Ao adicionar 0,5% de NaCl no meio de cultura, e incubando na temperatura de 42°C, esta mutante apresenta divisão celular.

Porém a mutante de E.coli produtora de penicilina amidase, apresentou divisão celular a 42°C em meio nutriente Agar, mas em meio mínimo contendo 1,5% de fosfato; não apresentou divisão celular entre a faixa de temperatura de 25°C e 37°C. Portanto esta mutante é bastante diferente das outras já relatadas, que não apresentaram divisão celular a 42°C.

A mutação que causa a não divisão celular a temperatura de incubação de 42°C, parece ser que não é uma mutação pontual no DNA, pelo que está acompanhado de várias modificações no mecanismo-regulatório das células.

4.15. Meios de Cultura para Fins Industriais

Usou-se como possíveis meios de cultura na produção da penicilina amidase por E.coli FEA 30 MQ1, a nível industrial, diferentes concentrações de Farelo de Soja Desengordurado (FSD, item 3.3.18), extrato de levedura (ELI, item 3.3.18), sobrenadante farelo de soja desengordurado (SFSD, item 3.3.18), hidrolizado ácido de farelo de soja desengordurado (HAFSD, item 3.3.18), hidrolizado enzimático de farelo de soja desengordurado (HEFSD, item 3.3.18), hidrolizado ácido de caseína (HAC, item 3.3.18) hidrolizado enzimático de caseína (HEC, item 3.3.18) hidrolizado ácido de isolado proteico de soja (HAIPS, item 3.3.18) hidrolizado enzimático de isolado proteico de soja (HEIPS, item

3.3.18 água de maceração de milho (AMM, item 3.3.18) sobrenadante de água de maceração de milho (SAMM, item 3.3.18).

Fez-se fermentação submersa a 25°C, como está indicado no item 3.3.8., e analisou-se a atividade da enzima como está indicado - no item 3.3.5.

Estando os resultados no Quadro nº 6, apresentou o meio de cultura nº 4 de 2% de FSD, 1% de ELL, 0,15% de ácido fenil acético, 90% de atividade relativa quando comparado com o meio de cultura control (1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura da Difco, 0,15% ácido fenil acético), e o meio de cultura nº 12, de 2% - SFSD, 1% ELL, 0,15% AFA, apresentou 87% de atividade relativa, tendo por conseguinte, o meio de cultura nº 4 e 12, possibilidades de serem usados como meio industrial.

4.16. Influência do Ácido Fenil Acético na Linhagem de E.coli

FEA 30 MQ1

Foi feito o estudo da influência do ácido fenil acético no início da fermentação como está indicado no item 3.3.13, para a linhagem E.coli FEA 30 MQ1. Estando os resultados mostrados na Figura 9. O máximo de indução foi entre 0,15% e 0,20% de AFA, obtendo-se assim 15 vezes mais produção de enzima do que sem indutor, sendo que concentrações maiores que 0,20% fazem diminuir-

a atividade enzimática.

4.17. Cinética de Fermentação, para E.coli FEA 30 e E.coli FEA 30 MQ1, à Diferentes Temperaturas

Foi feito o estudo de cinética de fermentação, como está - descrito no item 3.3.11, com E.coli FEA 30 e E.coli FEA 30 MQ1 , em meio de cultura de 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,15% de ácido fenil acético, pH=7,0. As temperaturas de incubação foram 30°C, 27°C, 25°C e 23°C estando os resultados mostrados nas Figuras nº 10, 11, 12, 13, e no Quadro nº 7. Da Figura nº- 12, observa-se que a produção de enzima acompanha o crescimento de massa celular, pelo que a produção de enzima está associada à produção de nova massa celular. Nas Figuras nº 10, 11, 12 e 13, constatou-se que a maior temperatura de incubação, menor é a produção de enzima, assim, à 30°C tanto E.coli FEA 30 como E.coli FEA 30 MQ1 apresentam a mesma atividade enzimática de 0,2 unidades por mililitro; à 27°C de incubação a E.coli selvagem e mutantes apresentaram uma atividade de 0,3 e 0,4 unidades por mililitro respectivamente; à 25°C a atividade foi de 0,4 e 0,8 unidades por mililitro, ou seja 100% a mais de produção pela mutante; e a 23°C a atividade foi de 0,7 e 0,9 unidades por mililitro para a selvagem e mutante respectivamente.

Do Quadro nº 7, se constata que a maior produção de penicilina -

amidase por mililitro do mutante, com respeito a selvagem entre 23°C e 27°C, não se deve a uma maior produção de massa celular, mas a uma maior produção de enzima por miligrama de massa celular. Assim, à 25°C, temos uma atividade enzimática de 0,19 unidades por miligrama de massa celular para a linhagem mutante, e 0,09 unidades por miligrama para a selvagem, ou seja 110% a mais que a selvagem.

4.18. Indução de Mutação com MNNG de E.coli FEA 30 MQ1

Foi feita a indução de mutação de E.coli FEA 30 MQ1 como está descrito no item 3.3.23. Foram isoladas 1.000 linhagens, das placas correspondentes a 50 minutos de exposição em MNNG. Com estas 1.000 linhagens foi feita a fermentação submersa como está indicado no item 3.3.8, a 25°C. Usou-se meio de cultura de 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 0,15% de ácido fenil acético. A análise da atividade foi feita como está indicado no item 3.3.5. Dentre estas 1.000 linhagens, foi encontrada uma, a E.coli FEA 30 MQ2, que apresentou 120% a mais de atividade que E.coli FEA 30. Esta mutante E.coli FEA 30 MQ2, quando inoculada em meio mínimo (3.3.18a) não apresentou divisão celular, crescendo em forma filamentosa.

Dentre estas 1.000 linhagens, 150 não cresceram em meio mínimo, e 20 foram β galactosidase negativa, apresentando todas estas mutan

tes menor atividade que E.coli FEA 30 MQ1.

Com esta penicilina amidase intracelular de E.coli FEA 30 MQ1 e MQ2, foram estudadas a temperatura e pH ótimo, assim como a constante Km de Michaelis. Constatou-se que seus valores são os mesmos para a penicilina amidase intracelular da linhagem selvagem.

4.19. Isolamento de mutante de E.coli FEA 30, que cresce em Forma Filamentosa

Foi feita a indução de mutação de E.coli FEA 30 como está descrito no item 3.3.23, mas a contagem foi feita em placas de petri contendo meio mínimo (3.3.18a) e a transferência das colônias foi feita a tubos de meio mínimo (3.3.18a). Com cada uma das 950 linhagens assim isoladas correspondentes a 50 minutos de exposição em MNNG, foi feita a coloração de GRAM, e observadas no microscópio, na busca de E.coli FEA 30 mutante que cresça em forma filamentosa. Por este método foram encontradas duas linhagens, que crescem em forma filamentosa; E.coli FEA 30 MQ3 e MQ4.

Foi feita a fermentação submersa como está indicado no item 3.3.8, a 25°C. Usou-se meio de cultura de 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura e 0,15% de ácido fenil acético. Desta maneira a E.coli FEA 30 MQ3 e MQ4, apresentaram 80% e 60% de atividade a mais que E.coli FEA 30.

4.20. Indução de mutação com raios de U.V. de E.coli FEA 30

Foi feita a mutação de E.coli FEA 30, como está descrito no item 3.3.24. Foram isoladas das placas correspondentes a 40 segundos de exposição com luz ultravioleta, 1.000 linhagens e foi feita fermentação com cada uma, como está citado no item - 3.3.8, à 25°C. Usou-se meio de cultura de 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,15% de ácido fenil acético e foi feita a análise de atividade como está descrito no item 3.3.5. Dentre as linhagens analisadas não foi encontrada nenhuma mutante que apresente maior produção de enzima que a selvagem, mas foram encontradas 71 que não cresceram em meio mínimo (item 3.3.18a), e 18 que apresentaram β galactosidase negativa, quando inoculadas em meio EMB Agar.

Ueda (1970) relatou que a ação mutagênica por irradiação ultravioleta, é devida à forte absorção do DNA a 260 nm, que leva a uma dimerização de duas timinas adjacentes, de duas citosinas ou de timina-citosina.

4.21. Produção de 6APA

A produção de 6APA foi feita para diferentes concentrações de penicilina G(K) e diferentes temperaturas de incubação.

a) Efeito da Concentração de PG(K)

A produção de 6APA foi feita como está indicado no item 3.3.21, ajustando-se a atividade enzimática a 0,83 U/ml e diferentes concentrações de penicilina G(K) foram usadas, tais como 10%, 7% e 5%, estando os resultados mostrados na Figura nº 14 . Obteve-se uma conversão de 63%, 90% e 95%, respectivamente , às 20 horas de incubação. Sendo por conseguinte a concentração de 7% de PG(K), a mais adequada, nas condições experimentadas, na produção de 6APA.

b) Efeito da Temperatura

A produção de 6APA foi feita como está indicado no item 3.3.21, ajustando-se a atividade enzimática a 0,83 U/ml, e a concentração de PG(K) foi ajustada a 7%. A incubação foi feita às temperaturas de 40°C, 35°C e 30°C, estando os resultados mostrados na Figura nº 15, obtendo-se uma conversão de 90%, 77% e 63%, respectivamente às 20 horas de incubação, sendo por conseguinte a temperatura à 40°C, a mais adequada na produção de 6APA.

Esta penicilina amidase intracelular de E.coli PEA 30 MQ1 com alta atividade, facilita a produção de 6APA. Não sendo necessária a purificação da penicilina amidase.

Pelos resultados obtidos, acreditamos que seja possível a utilização desta enzima, na produção de 6APA em grande escala.

4.22. Recuperação e Cristalização de 6APA

A recuperação e cristalização de 6APA foi feita como está descrito no item 3.3.22, após a produção de 6APA como está descrito no item 3.3.21, usando-se 0,83 U/ml de atividade enzimática, 7% de PG(K) e temperatura de incubação de 40°C. Nestas condições, a recuperação do 6APA produzido foi de 70%, ou seja, uma recuperação total de 63%, com respeito ao possível teórico. Estando os cristais de 6APA mostrados na Figura nº 16.

4.23. Pureza do 6APA Obtido

O 6APA que foi produzido como está no item 3.3.22, foi examinado pelo método de hidroxilamina e comparado com 6APA obtido da Zigma, obtendo-se assim uma pureza de 99%.

CONCLUSÕES

1. De 695 microrganismos isolados, foram encontrados os seguintes microrganismos produtores da penicilina amidase: um *Bacillus* sp, um *Corynebacterium* sp, uma *E.coli* e um *Micrococcus* sp. Em todos estes microrganismos a produção da penicilina amidase é intracelular, sendo o ácido fenil acético, indutor na produção da mesma. O maior produtor da penicilina amidase foi a linhagem *E.coli*, denominada *E.coli* FEA 30.
2. Foi feita a indução de mutação com N-metil-N'-Nitro-N-Nitroguanidina para *E.coli* FEA 30, e foram encontradas duas mutantes com alta atividade da penicilina amidase, a *E.coli* FEA - MQ1, e MQ2, as quais apresentaram 100% e 120% a mais de produção da mesma, que a selvagem, à temperatura de incubação de 25°C. Estas duas mutantes não apresentaram divisão celular, crescendo em forma filamentosa, quando inoculada em meio mínimo.
3. Foi feita a indução de mutação da *E.coli* FEA 30, com raios ultravioletas. Nas condições efetuadas não foi possível encontrar mutantes hiperprodutivos da penicilina amidase, ainda que foram encontradas mutantes auxótrofos e β galactosida

se negativa.

4. A atividade da penicilina amidase intracelular da E.coli FEA apresentou temperatura ótima de 40^oC, e pH ótimo entre 8,0 e 8,5.
5. Estudou-se a cinética da reação da penicilina amidase intracelular da E.coli FEA, e constatou-se que a constante Km de Michaelis foi 37 mM/min/ml e Vmax de 1µmol/min/ml.
6. O melhor meio de cultura na produção da penicilina amidase - por E.coli FEA, foi: 1% de peptona, 0,5% de extrato de levedura, 0,15% de ácido fenil acético, pH inicial antes de autoclavagem 7. Sendo um meio de cultura com possibilidades de ser usado a nível industrial: 2% de farelo de soja desengordurado, 1% de extrato preparado pela autólise de levedura da Fleischmann, 0,15% de ácido fenil acético, com pH inicial de 7, antes da autoclavagem.
7. A melhor temperatura de incubação na produção da penicilina-amidase, com as linhagens de E.coli FEA foi de 23^oC.
8. Com uma suspensão de massa celular de E.coli FEA 30 MQ1 ajustada a 0.83 unidades da penicilina amidase, usou-se 7% de pe

nicilina G, obtendo-se em 20 horas de incubação à 40°C, uma conversão de 90%. Após recuperação e cristalização foi obtido 70% do 6APA produzido.

QUADRO Nº 1. Relação entre a atividade de enzima, massa celular e pH, quando se adiciona ácido fenil acético a diferentes tempos de fermentação, para E.coli FEA 30.

Tempo após Incubação	1	2	3	4	5	6	7	8
	Experiência nº							
0		0,15	0,05					0,05
2			0,05	0,05				
4			0,05	0,05	0,05			0,05
8				0,05	0,05	0,05		
12					0,05	0,10	0,15	0,05
Total de APA	0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15	0,15
% AR	10	80	90	100	80	20	15	80
Massa Celular mg/ml	4,5	4,6	4,6	4,5	4,3	4,3	4,3	4,5

100 AR = 0,4 u/ml

QUADRO Nº 2. Relação entre a composição de diferentes meios de cultura e a atividade enzimática, massa celular e pH. Todos os meios de cultura tiveram 0,15% de AFA, e a temperatura de incubação foi de 25°C.

Meio	Composição em %	AR	M	pH _F .
1	0,5% Peptona (P)	25	1,5	8,5
2	1,0% P	45	4,0	8,7
3	1,5% P	50	4,5	9,0
4	2,0% P	50	4,5	9,0
5	3,0% P	50	5,0	9,0
6	4,0% P	40	5,0	9,0
7	0,50% Extrato de Levedura (EL)	0,20	1,5	8,0
8	1,0% EL	0,40	3,8	8,5
9	2,0% EL	0,45	4,5	9,0
10	3,0% EL	0,40	4,5	9,0
11	4,0% EL	0,30	4,5	9,0
12	1,0% P, 0,25% EL	70	4,5	8,7
13	1,0% P, 0,50% EL	100	4,5	9,0
14	1,0% P, 1,0% EL	100	4,5	9,0
15	1,0% P, 2,0% EL	70	4,5	9,0
16	1,0% P, 3,0% EL	60	4,5	9,0
17	2,0% P, 0,50% EL	100	4,5	9,0
18	3,0% P, 0,50% EL	80	4,5	9,2
19	1,0% P, 0,25% Extrato de Carne (EC)	60	4,5	8,7
20	1,0% P, 0,50% EC	70	4,2	9,0
21	1,0% P, 1,00% EC	70	4,5	9,2
22	1,0% P, 2,00% EC	70	4,5	9,2
23	1,0% P, 3,00% EC	60	4,2	9,0
24	1,0% P, 0,50% EL, 0,50% EC	80	4,5	9,0
25	1,0% P, 0,50% EF, 1,0% EC	80	4,5	9,0
26	1,0% P, 0,50% EL em tampão fosfato pH=7,0, 0,1M	90	4,5	7,5
27	1,0% P, 0,50% EL, 0,50% glicose	15	4,0	5,0
28	1,0% P, 0,50% EL, 1,0% glicose	10	4,0	4,5
29	1,0% P, 0,50% EL, 2,0% glicose	10	4,0	4,5
30	meio 27, em tampão fosfato pH=7,0, 0,1M	30	5,0	6,5
31	meio 28, em tampão fosfato pH=7,0, 0,1M	20	5,0	6,5
32	meio 28, em tampão fosfato pH=7,0, 0,1M	20	5,0	6,5
33	meio mínimo item 3.3.18a	ND	5,0	6,2

100%AR, corresponde a 0,4 u/ml

M=massa celular em mg/ml

ND=não detectável

QUADRO Nº 3. Relação entre a atividade enzimática, massa celular e pH final, após fermentação de E.coli - FEA 30, com o meio de cultura de 1% de peptona, 0,5% de ácido fenil acético, a diferentes pH inicial.

pH inicial	% AR	massa celular mg/ml
4	-	S.C.
5	70	0,40
6	90	0,45
7	100	0,45
8	95	0,42
9	90	0,42
10	-	S.C.

AR = Atividade relativa

100% AR = 0,4 u/ml

SC = Sem crescimento

QUADRO Nº 4. Relação entre a atividade de enzima, massa celular e pH após fermentação com E. coli PEA 30, em frascos Erlenmeyer de 250 ml, contendo diferentes volumes de meio de cultura de 14 de peptona, 0.5% de extrato de levedura e 0.15% de ácido fenil acético.

Tempo	20ml			40ml			60ml			80ml			100ml		
	VAR	MC	pH _f	VAR	MC	pH _f	VAR	MC	pH _f	VAR	MC	pH _f	VAR	MC	pH _f
18	100	4.5	9.0	100	4.5	9.0	80	3.8	8.8	60	3.2	8.5	50	3.0	8.2
20	100	4.6	9.2	100	4.4	9.3	100	4.5	9.1	80	4.0	9.0	60	4.0	9.0
24	100	4.5	9.2	100	4.5	9.2	100	4.6	9.2	80	4.5	9.2	60	4.5	9.2

AR = Atividade relativa

100% AR = 0,4 u/ml

MC = Massa celular em mg/ml

pH_f = pH final

QUADRO Nº 5. Relação entre a atividade enzimática, diferentes cations, e E.coli FEA 30, em meio de cultura 1% de peptona, 0,5% extrato de levedura e 0,15% AFA.

Cations	Concentração de Cations	
	0,01M % AR	0,001M % AR
CaCl ₂	100	100
CoCl ₂	SC	50
CuSO ₄	50	80
(Fe) ₂ (SO ₄) ₃	SC	70
MgSO ₄	60	80
MnSO ₄	SC	80
NaCl	100	100
KCl	100	100
ZnCl ₂	SC	50
Control	100	

100% AR = 0.4 u/ml

QUADRO Nº 6. Relação entre a composição de diferentes meios de cultura, e a atividade enzimática, massa celular e pH, quando inoculados com E.coli FEA 30 MQ1. Todos os meios de cultura tiveram 0,15 % de ácido fenil acético e pH inicial de 7,0. A temperatura de incubação foi de 25°C.

Meio	Composição em %	AR
Control	1 peptona, 0,5 extrato de levedura	100
1	1% FSD	SC
2	2% FSD	10
3	3% FSD	30
4	2% FSD, 1% ELL	90
5	2% FSD, 2% ELL	90
6	2% FSD, 3% ELL	80
7	3% FSD, 1% ELL	90
8	4% FSD, 1% ELL	80
9	1% SFSD	SC
10	2% SFSD	10
11	3% SFSD	30
12	2% SFSD, 1% ELL	87
13	2% SFSD, 2% ELL	87
14	2% SFSD, 3% ELL	80
15	3% SFSD, 1% ELL	85
16	4% SFSD, 1% ELL	85
17	1% HAFSD	40
18	2% HAFSD	45
19	3% HAFSD	45
20	2% HAFSD, 1% ELL	85
21	2% HAFSD, 2% ELL	85
22	2% HAFSD, 3% ELL	80
23	3% HAFSD, 1% ELL	85
24	4% HAFSD, 1% ELL	80
25	1% HEFSD	40

26	2% HEFSD	45
27	3% HEFSD	45
28	2% HEFSD, 1% ELL	85
29	2% HEFSD, 2% ELL	85
30	2% HEFSD, 3% ELL	80
31	3% HEFSD, 1% ELL	85
32	4% HEFSD, 1% ELL	80
33	1% HAC	40
34	2% HAC	45
35	3% HAC	45
36	2% HAC, 1% ELL	85
37	2% HAC, 2% ELL	85
38	2% HAC, 3% ELL	80
39	3% HAC, 1% ELL	85
40	4% HAC, 1% ELL	80
41	1% HEC	35
42	2% HEC	40
43	3% HEC	45
44	2% HEC, 1% ELL	80
45	2% HEC, 2% ELL	85
46	2% HEC, 3% ELL	80
47	3% HEC, 1% ELL	80
48	4% HEC, 1% ELL	75
49	1% HAIPS	35
50	2% HAIPS	40
51	3% HAIPS	40
52	2% HAIPS, 1% ELL	80
53	2% HAIPS, 2% ELL	80
54	2% HAIPS, 3% ELL	75
55	3% HAIPS, 1% ELL	80
56	4% HAIPS, 1% ELL	75
57	1% HEIPS	30
58	2% HEIPS	35
59	3% HEIPS	35
60	2% HEIPS, 1% ELL	65
61	2% HEIPS, 2% ELL	65
62	2% HEIPS, 3% ELL	60
63	3% HEIPS, 1% ELL	65
64	4% HEIPS, 1% ELL	60
65	2% AMM	20

66	5%	AMM	15		
67	10%	AMM	10		
68	5%	AMM, 1%	ELL	25	
69	5%	AMM, 2%	ELL	25	
70	2%	SAMM	15		
71	5%	SAMM	15		
72	10%	SAMM	10		
73	5%	SAMM, 1%	ELL	20	
74	5%	SAMM, 2%	ELL	20	
75	5%	SAMM, 1%	FSD, 1%	ELL	25
76	5%	SAMM, 2%	FSD, 1%	ELL	25

100% AR = 0,80 u/ml

Todos os meios de cultura estão descritos no item 3.3.18.

QUADRO N° 7. Relação entre massa celular, atividade e temperatura de incubação, para E.coli FEA 30 e E.coli FEA 30 MQ1.

T°C	Atividade					
	MCS	MCM	S (u/ml)	M (u/ml)	S u/mg	M u/mg
30	4,05	4,05	0,20	0,20	0,05	0,05
27	4,20	4,05	0,30	0,40	0,07	0,10
25	4,35	4,10	0,40	0,80	0,09	0,19
23	4,40	4,20	0,70	0,90	0,16	0,21

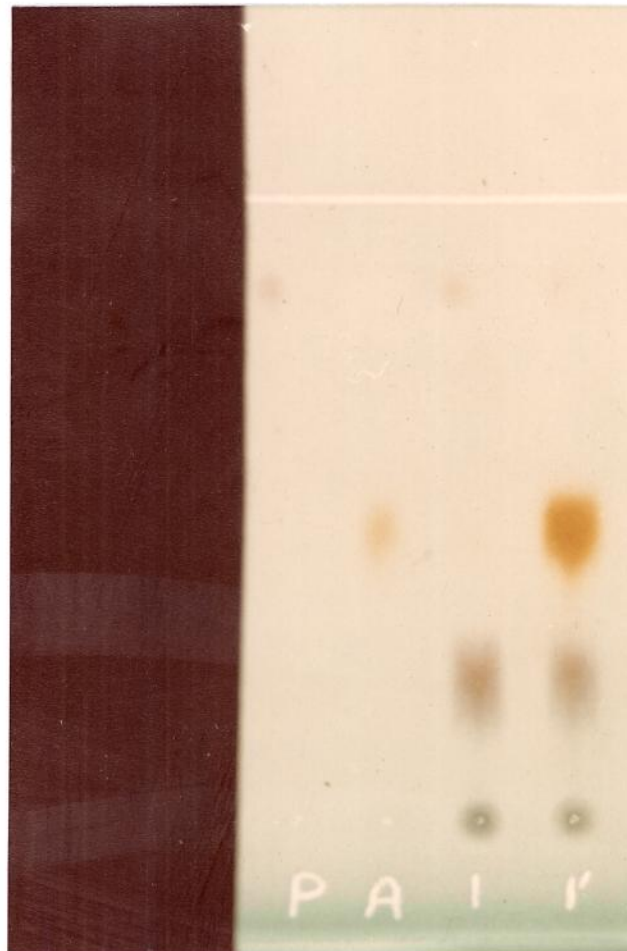
S = E.coli FEA 30

M = E.coli FEA 30 MQ1

MCS = Massa celular selvagem em mg/ml

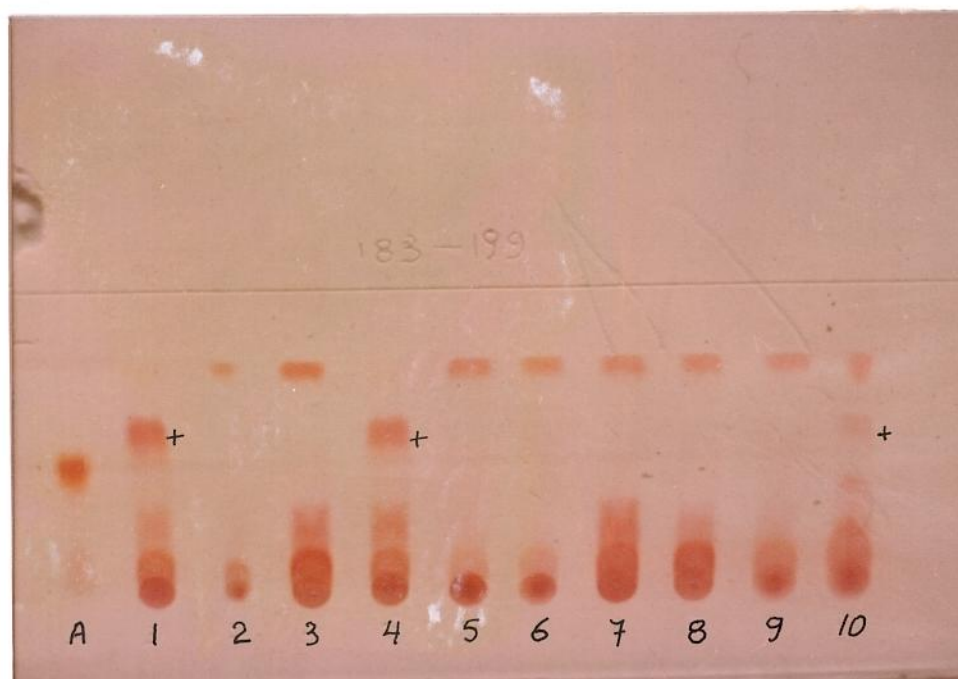
MCM = Massa celular mutante em mg/ml

Figura 1. Fotografia da cromatografia de camada delgada.



P = Penicilina G(K); A = Ácido 6 amino-penicilânico
1 = Meio de cultura de 1% de peptona, 0,5% de extrato de leve
dura, 0,15% de ácido fenil acético, PG
1' = Meio de cultura 1, e mais ácido 6 aminopenicilânico

Figura 2. Fotografia da cromatografia de camada delgada ,
mostrando alguns microrganismos produtores da
enzima penicilinase.



A = 6APA; 1, 4, são linhagens que apresentaram alta produ-
ção da penicilinase e a linhagem 10 apresentou
baixa atividade de penicilinase;

+ = Ácido penicilinilóico

Figura 3. Relação entre atividade da penicilina amidase, e concentração de ácido fenil acético.

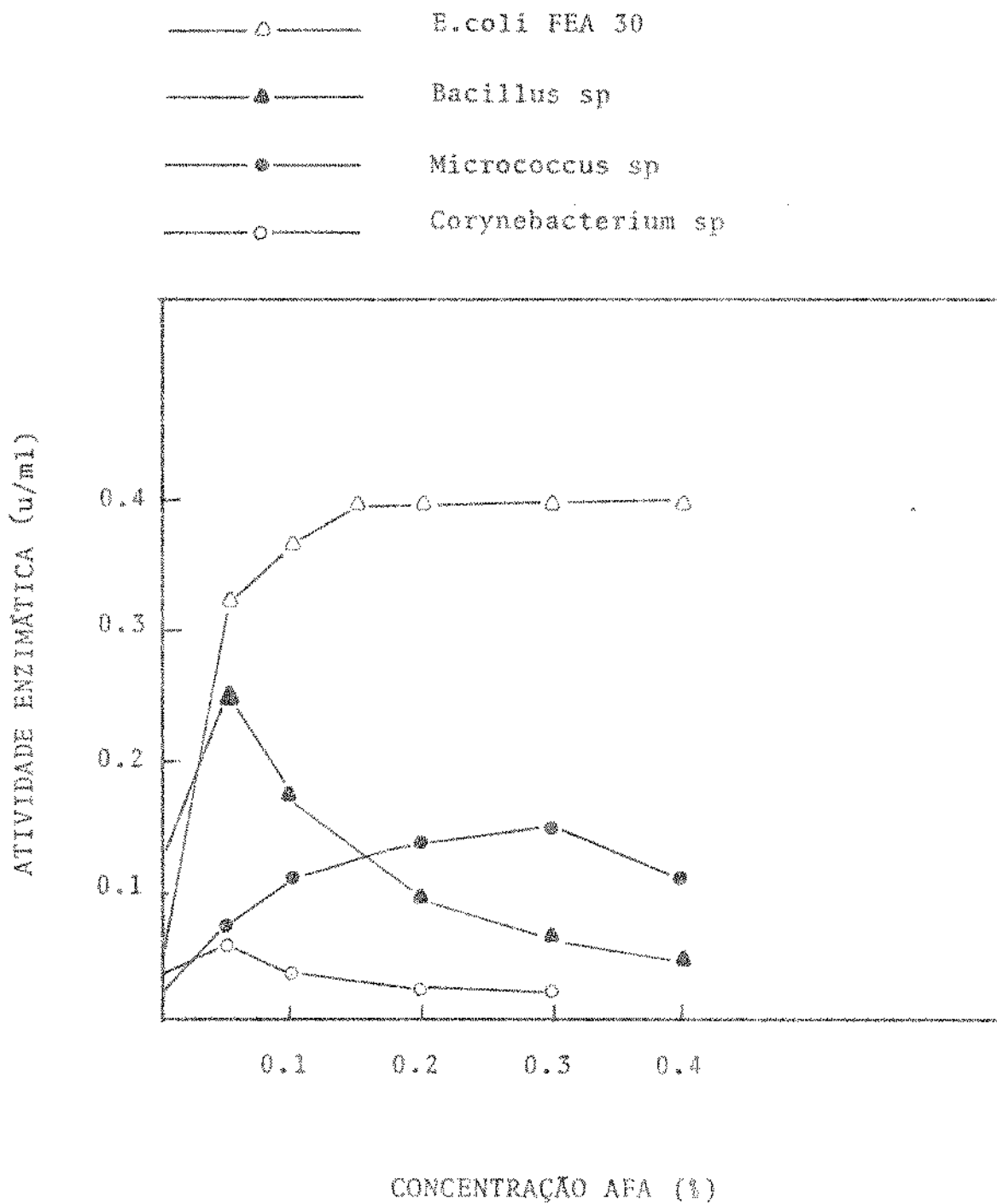


Figura 4. Efeito do pH na atividade da penicilina amidase de E.coli FEA 30.

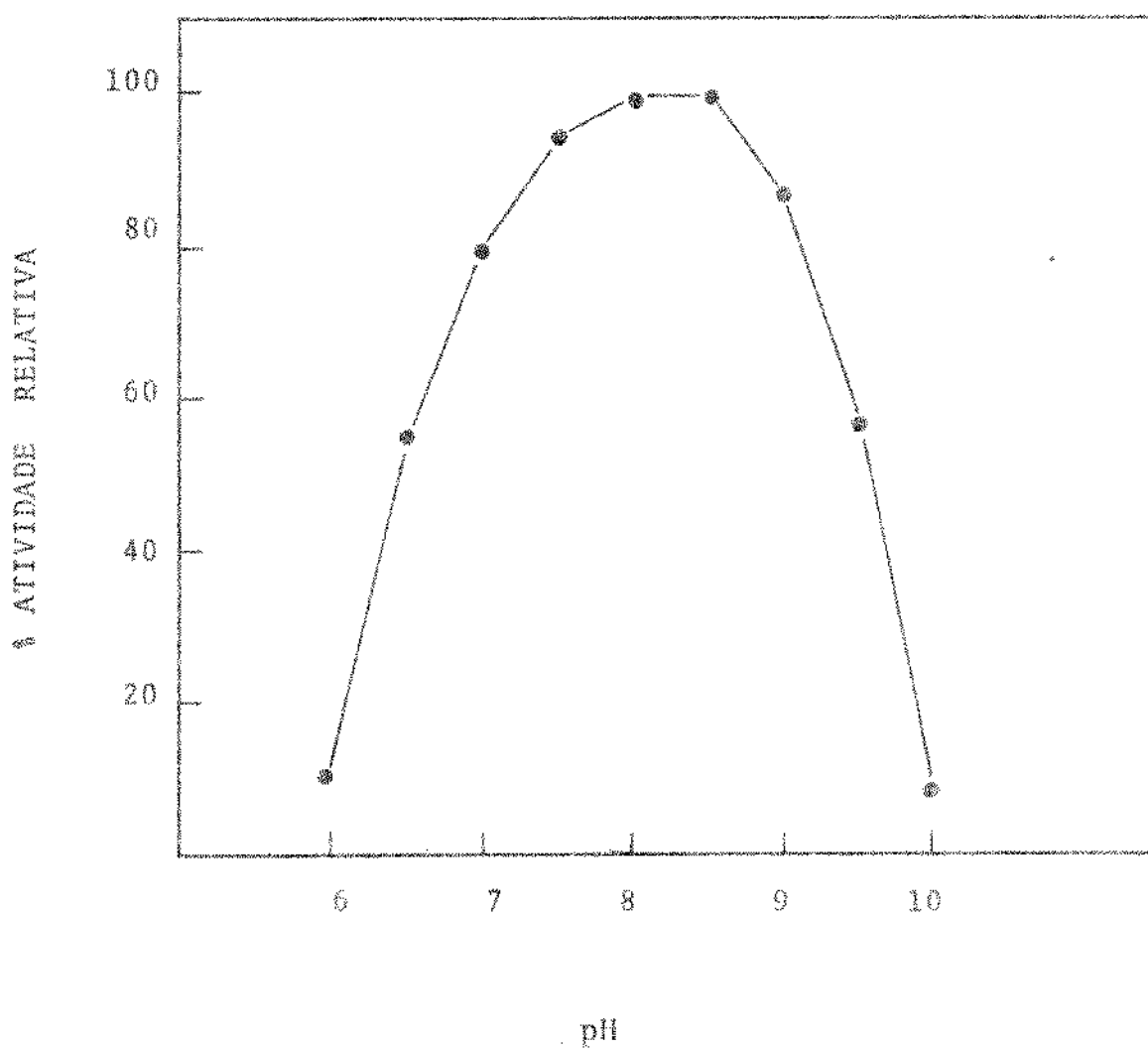


Figura 5. Efeito da temperatura na atividade da penicilina na amidase de E.coli FEA 30.

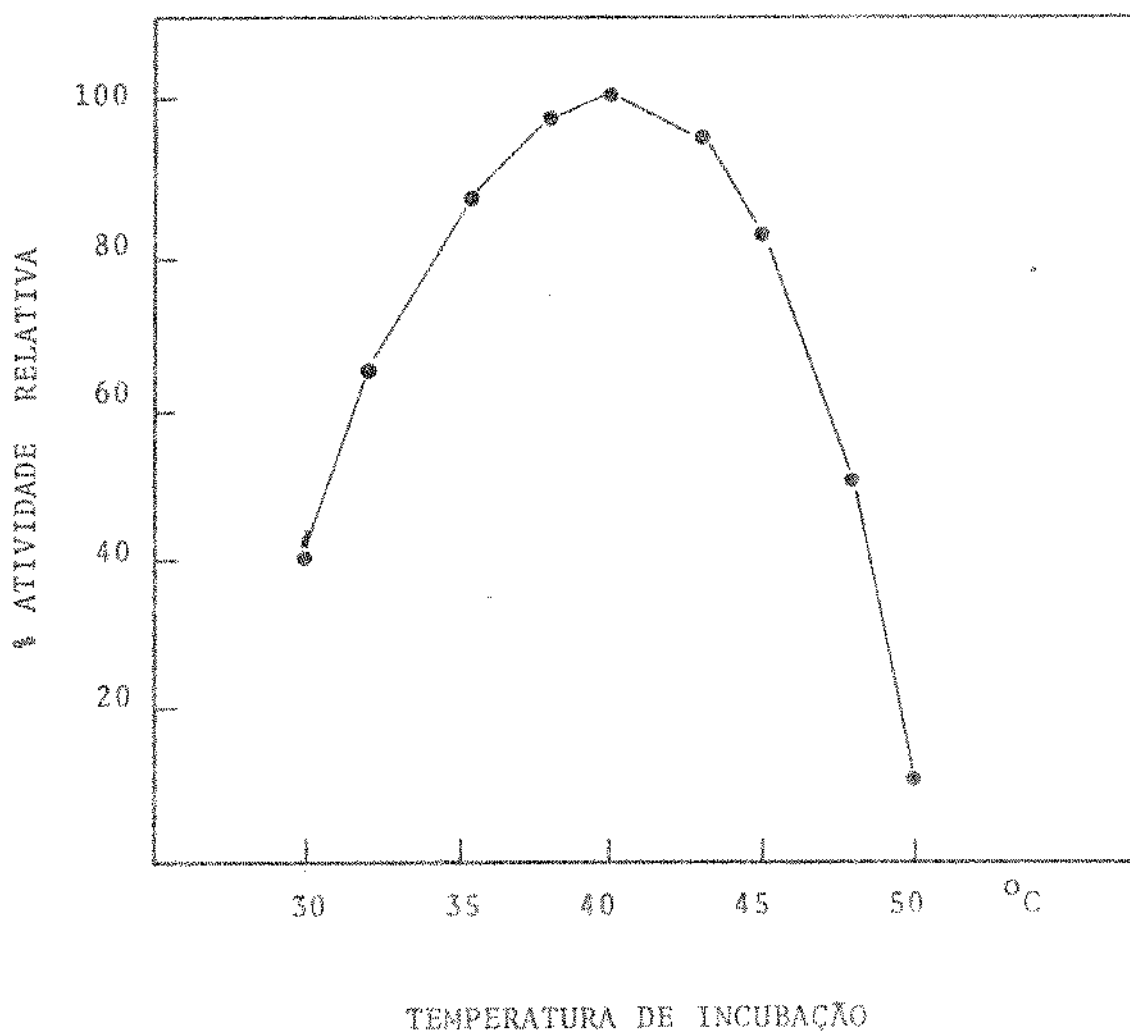


Figura 6. Efeito da concentração da penicilina G na velocidade de reação da penicilina amidase.

$K_m = 37 \text{ mM}$

S = Concentração de substrato

V = Velocidade de reação

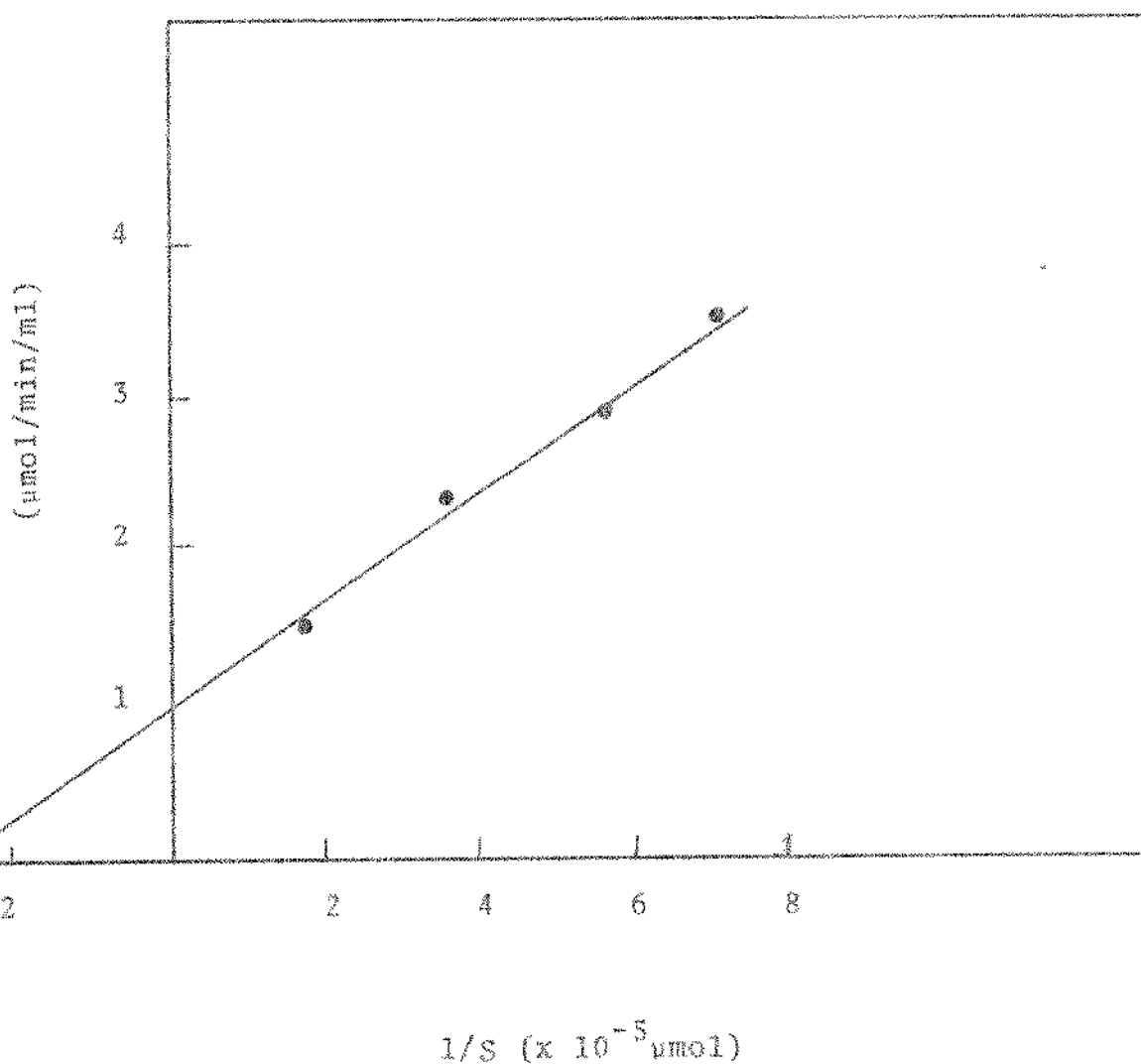


Figura 7. Relação entre mortalidade de E.coli FEA 30 e tempo de exposição em MNNG.

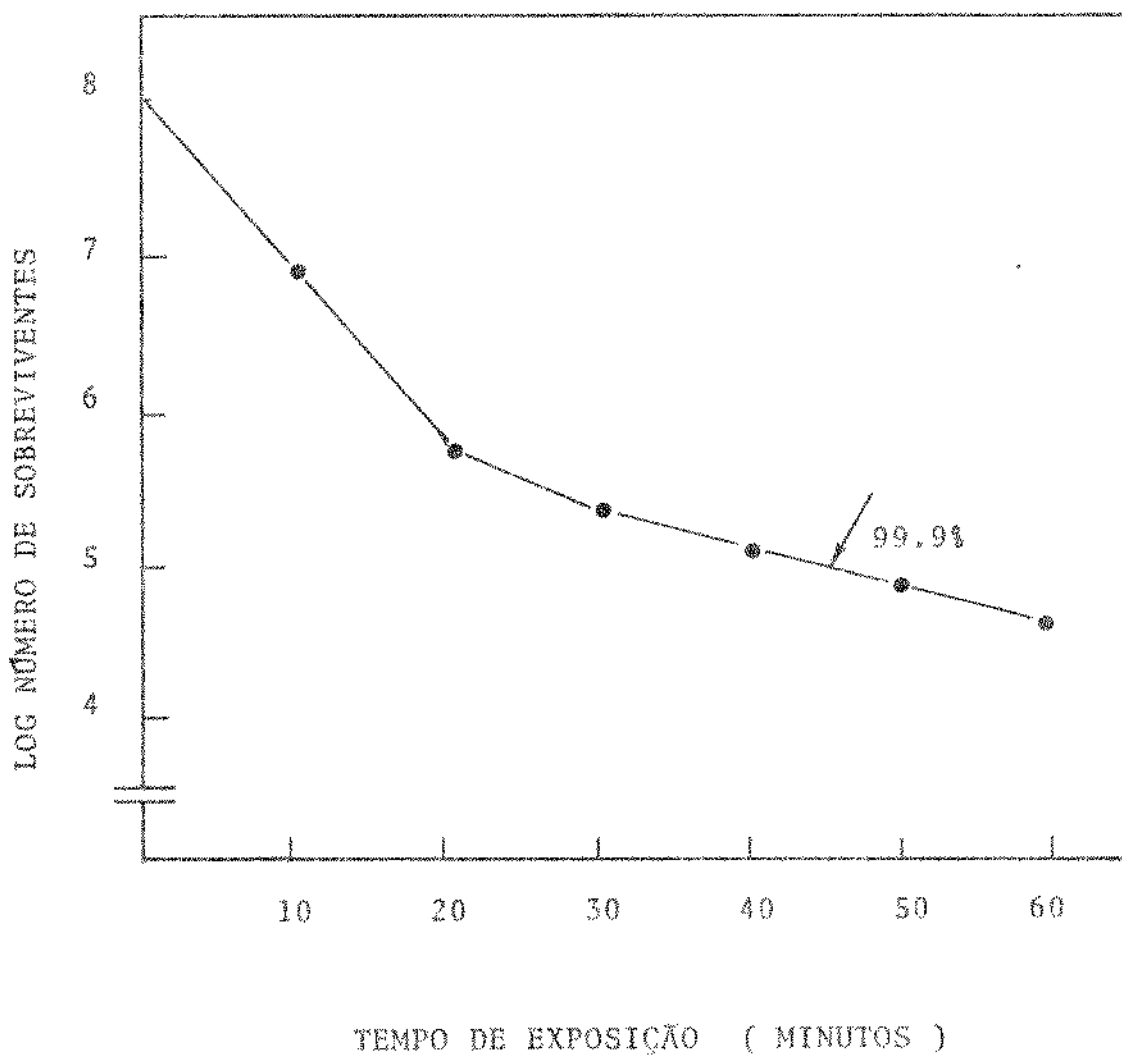
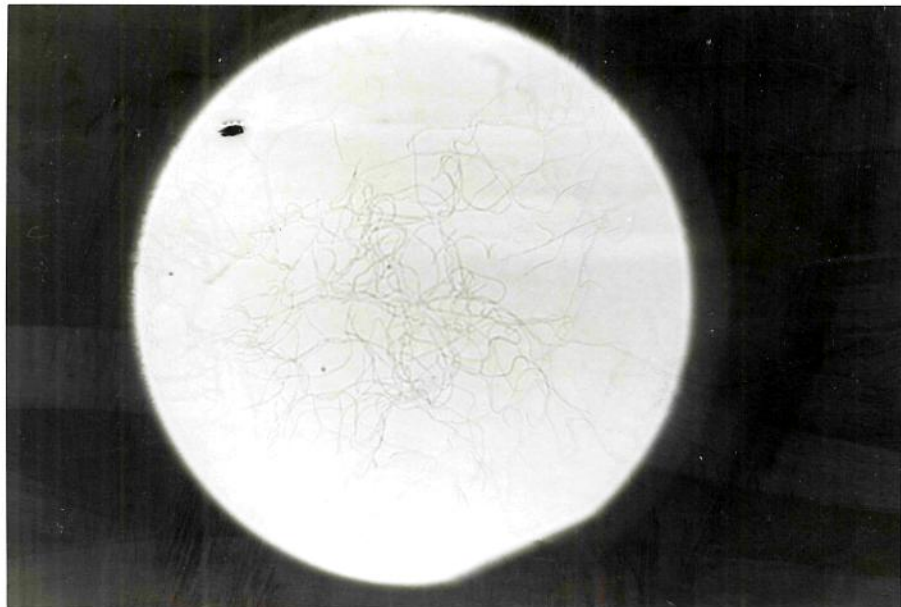


Figura 8. Microfotografia de E.coli FEA 30 MQ1 que não apresenta divisão celular.



E.coli FEA 30 MQ1, inoculada em meio mínimo (3.3.18a) e incubada por 24 horas a 30°C.

Aumento: x 900

Figura 9. Relação entre atividade da penicilina amidase e concentração de ácido fenil acético, para E.coli FEA 30 MQL.

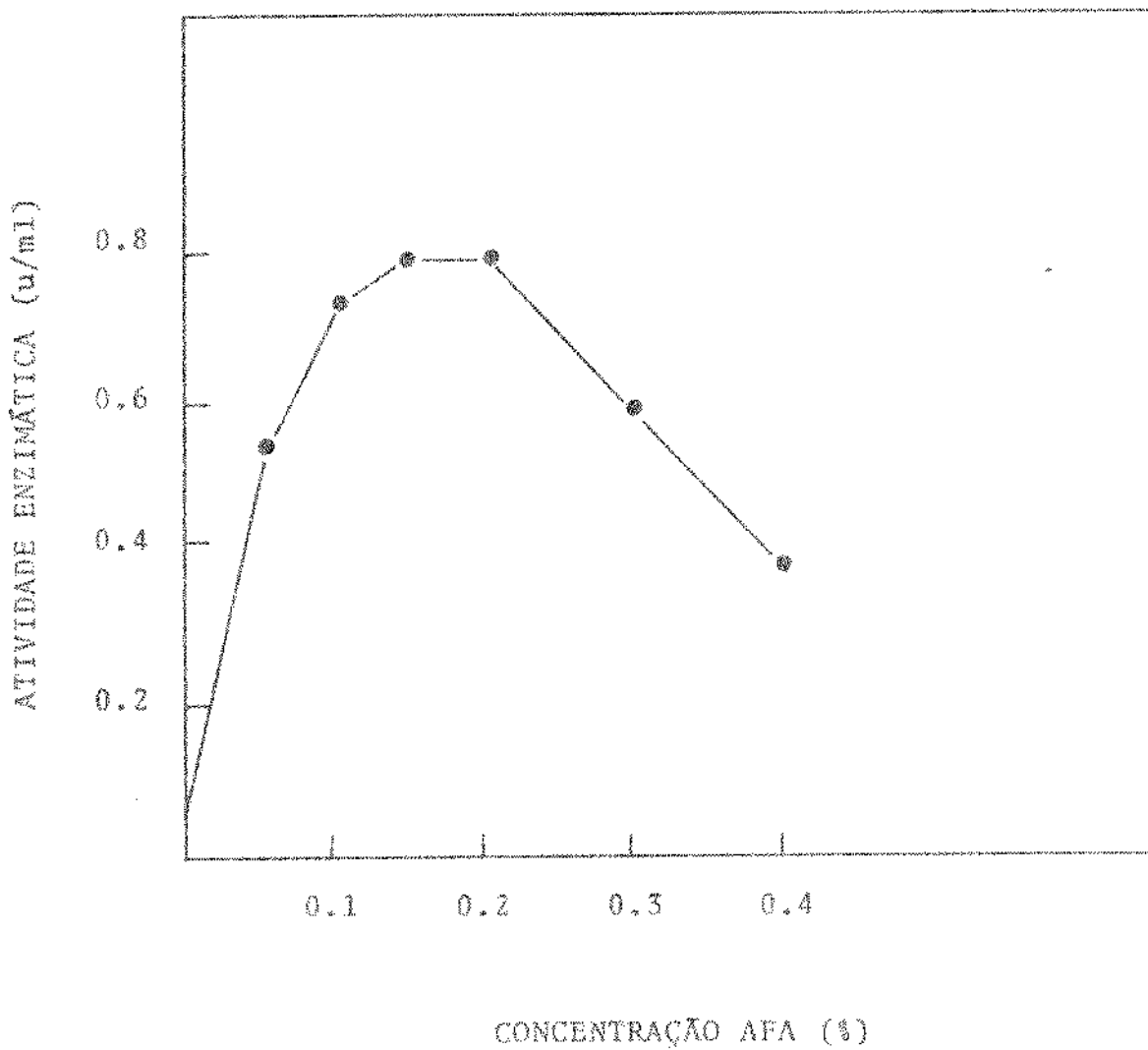


Figura 10. Relação entre tempo, crescimento de células, atividade da penicilina amidase e pH.

TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO 30°C

	E.coli FEA 30	E.coli FEA 30 MQ1
pH	—●—	—△—
Massa celular	—●—	—○—
Atividade	- - ● - -	- - ○ - -

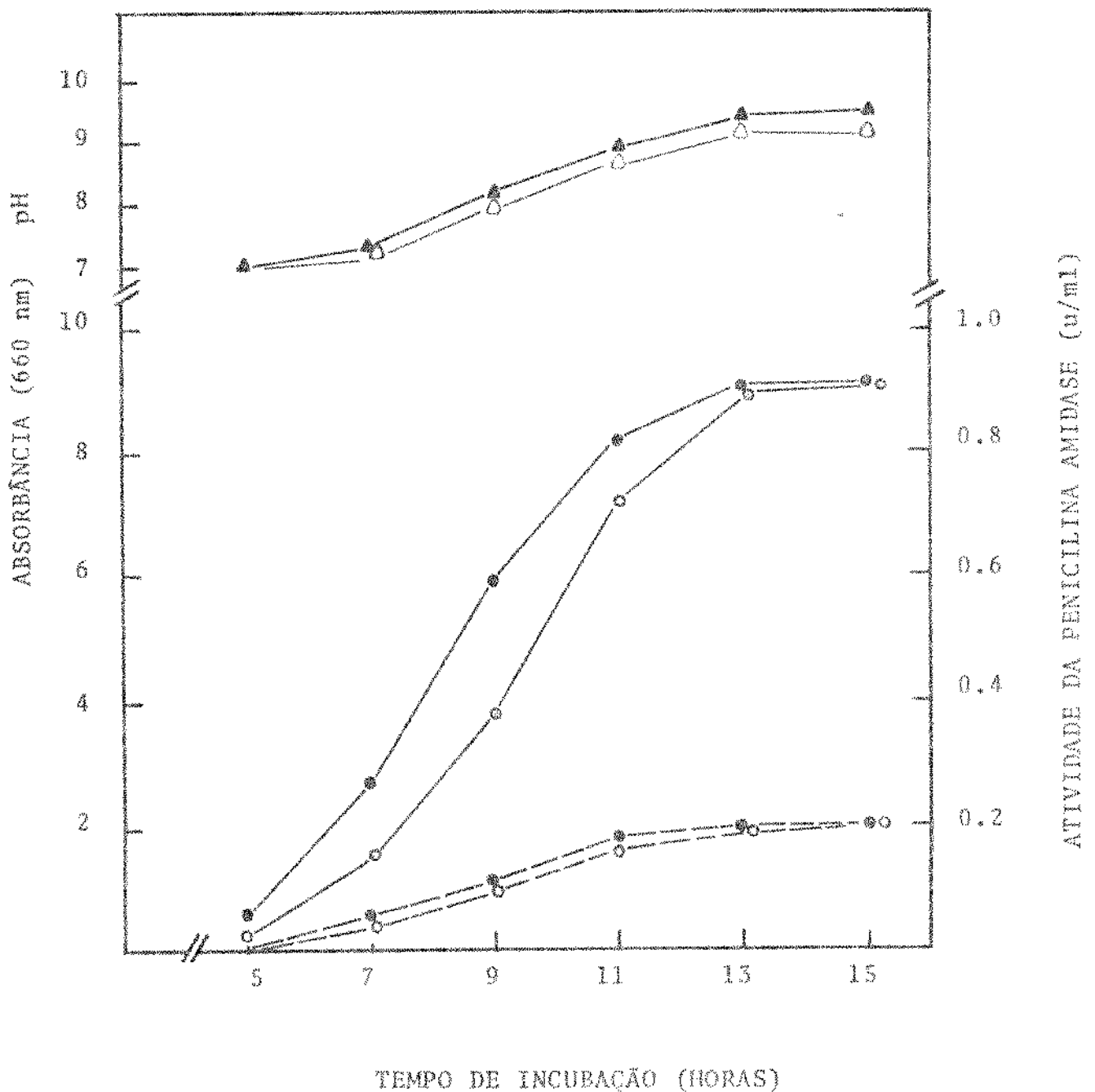


Figura 11. Relação entre tempo, crescimento de células, e atividade da penicilina amidase e pH.

TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO 27°C

	E.coli FEA 30	E.coli FEA 30 MQI
pH	—●—	—△—
Massa celular	—●—	—○—
Atividade	- - ● - -	- - ○ - -

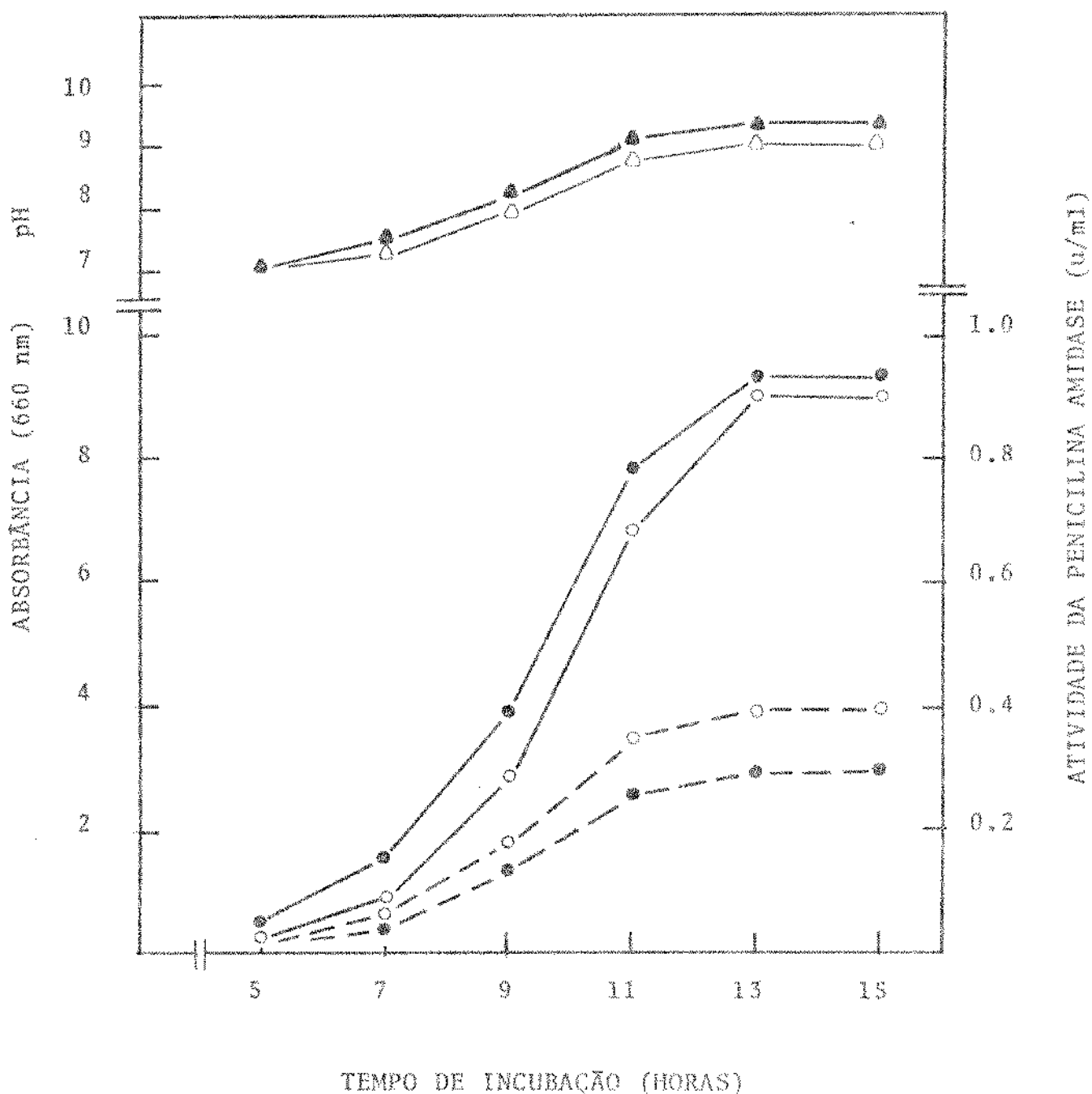


Figura 12. Relação entre tempo, crescimento de células, atividade da penicilina amidase e pH.

TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO 25°C

	E.coli FEA 30	E.coli FEA 30 MQ1
pH	—●—	—△—
Massa celular	—●—	—○—
Atividade	—●—	—○—

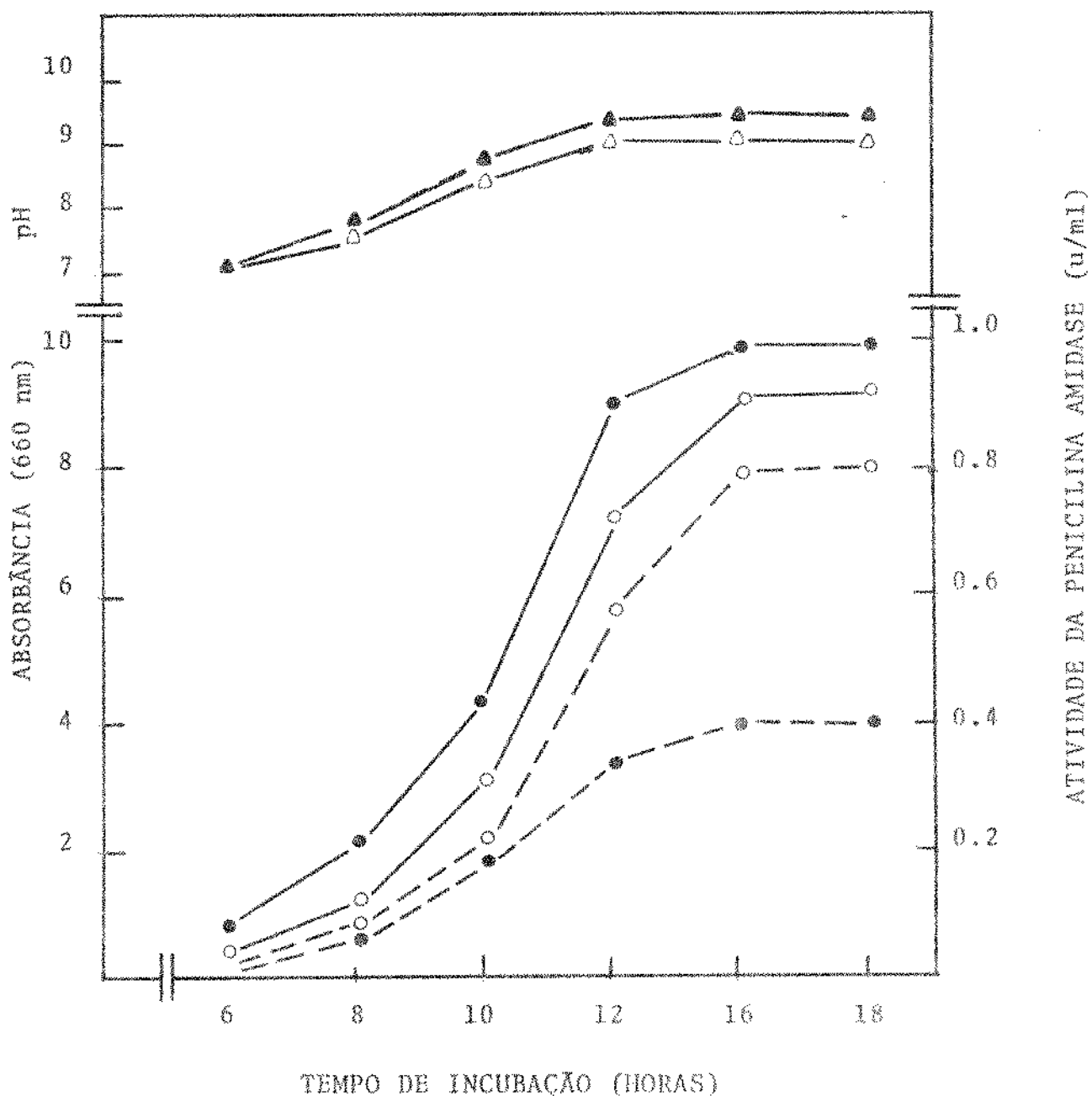


Figura 13. Relação entre tempo, crescimento de células, atividade da penicilina amidase e pH.

TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO 23°C

	E.coli FEA 30	E.coli FEA 30 MQ1
pH	—●—	—△—
Massa celular	—●—	—○—
Atividade	- -●- -	- -○- -

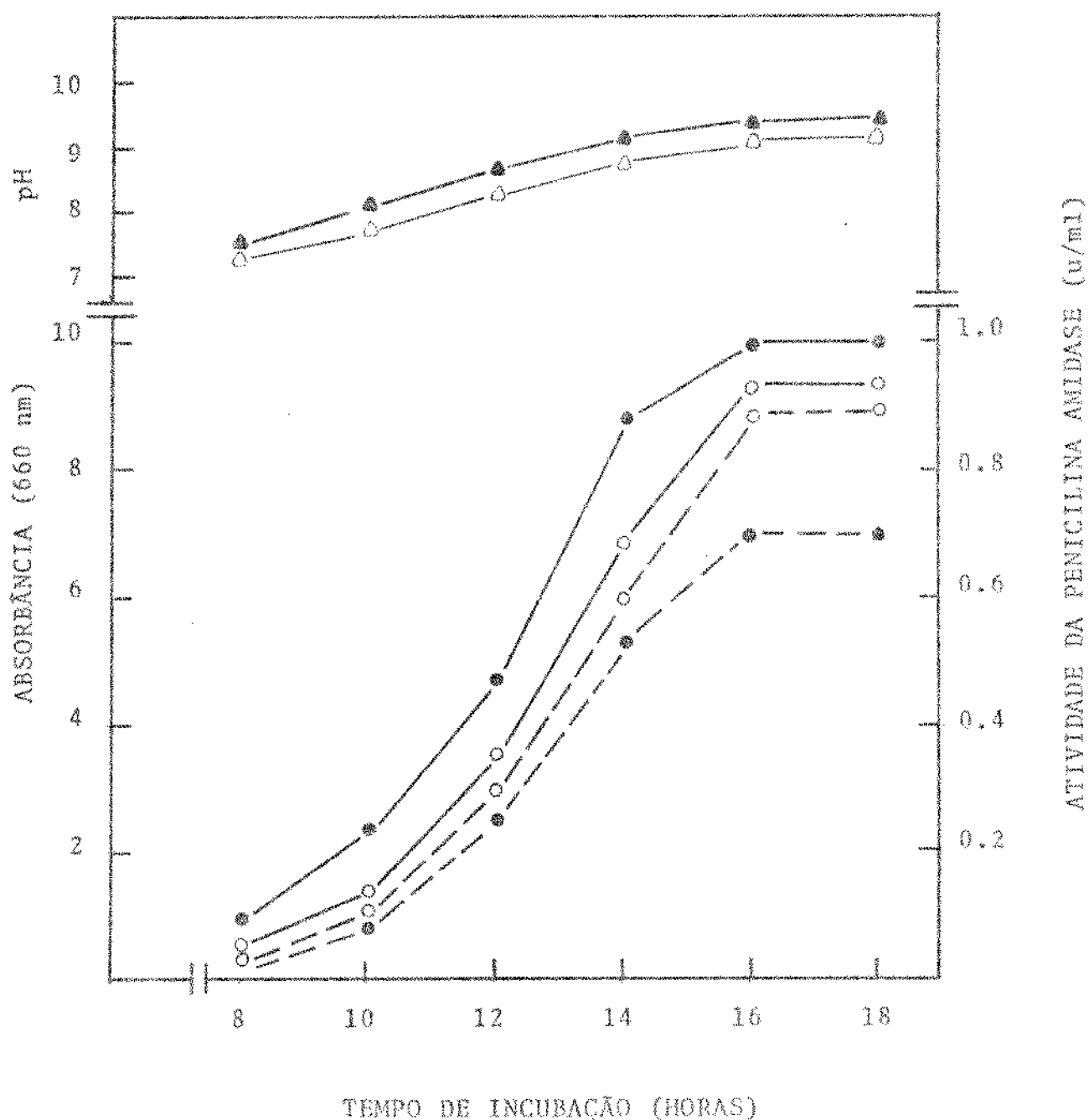


Figura 14. Efeito da concentração da penicilina G na produção de 6APA, por penicilina amídase intracelular de E.coli FEA 30 MQ1.

- 5% Penicilina G
- 7% Penicilina G
- ▲ 10% Penicilina G

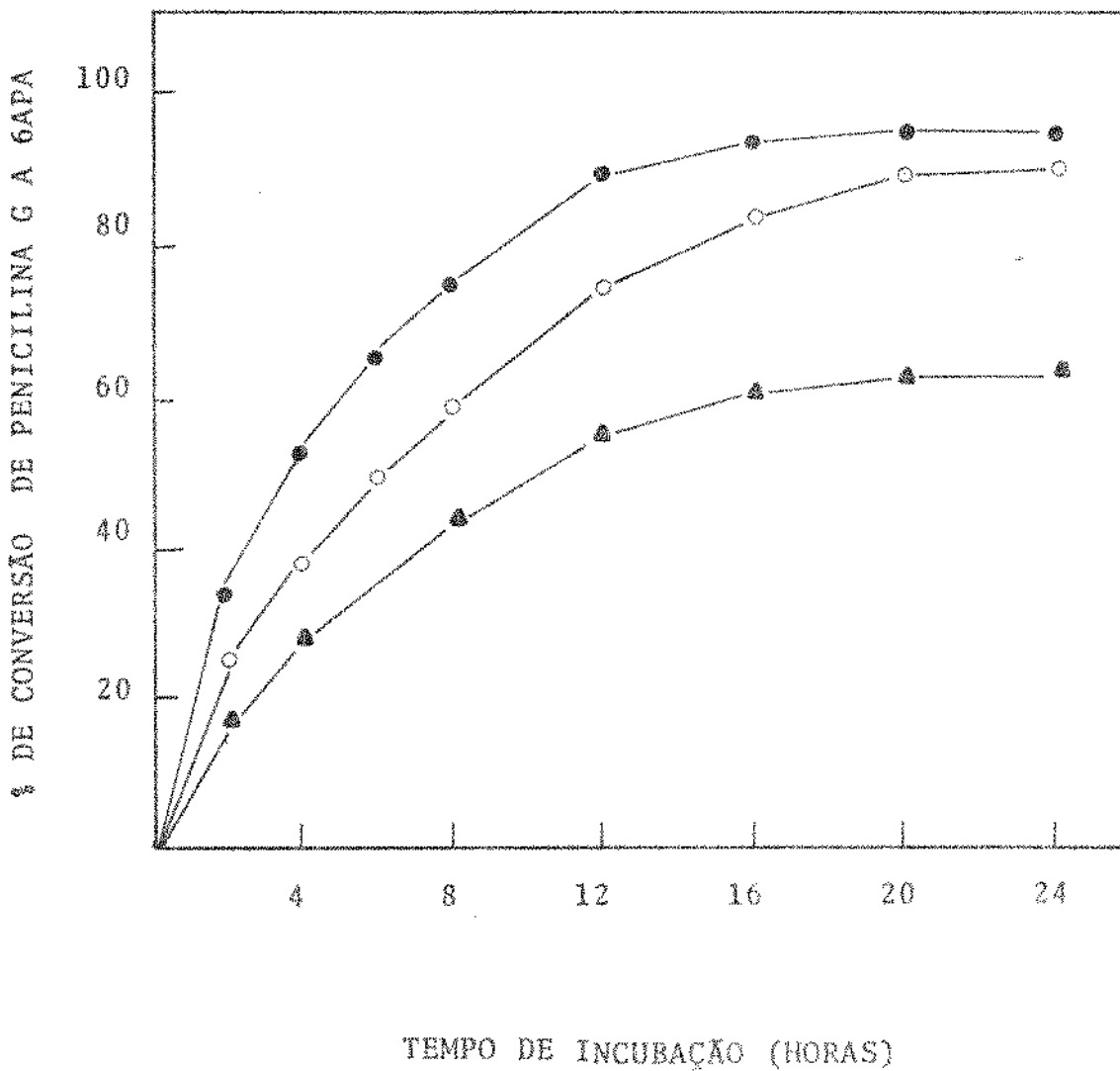


Figura 15. Efeito da temperatura na produção de 6APA por penicilina G e penicilina amidase intracelular de E.coli FEA 30 MQL.

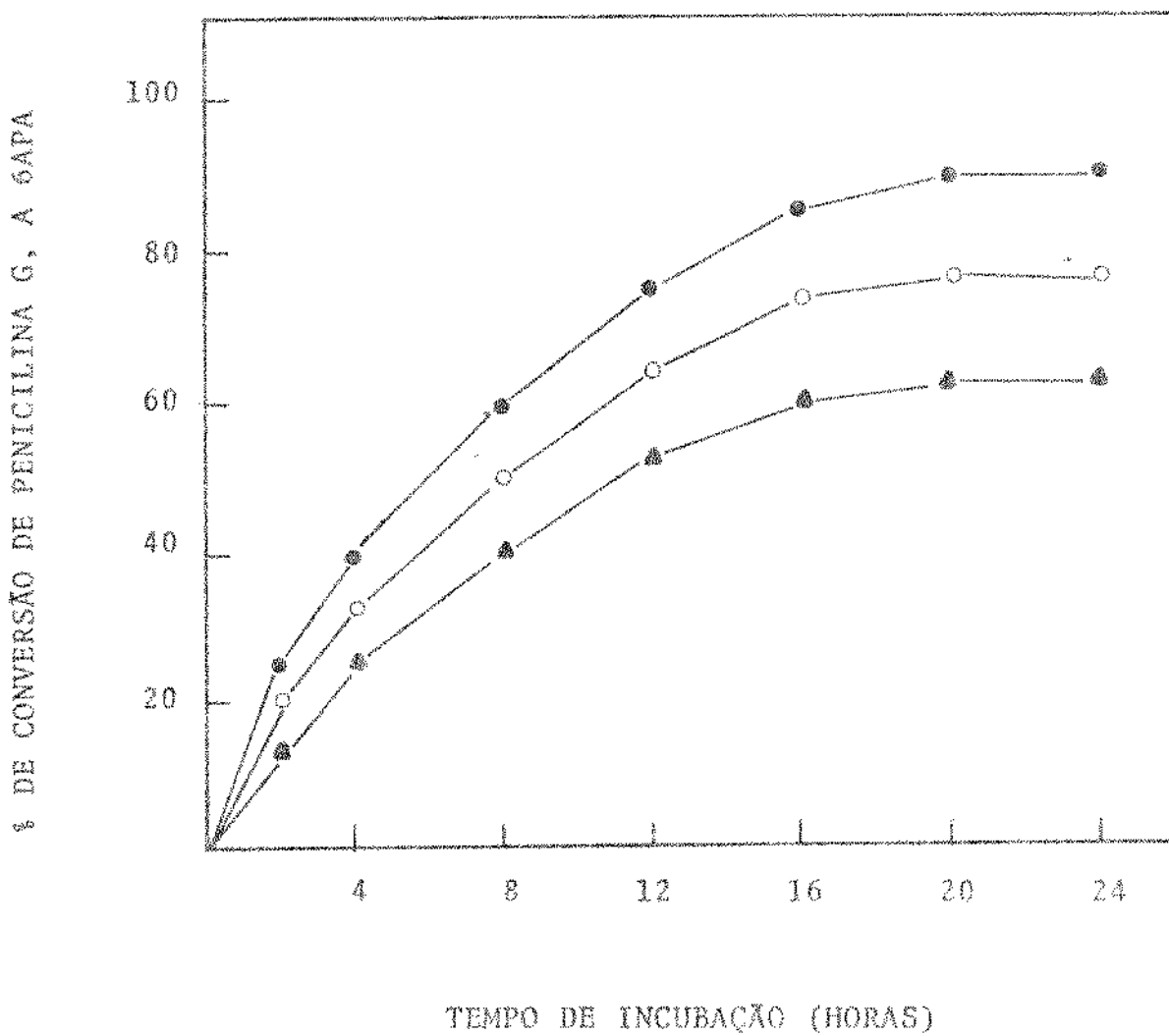
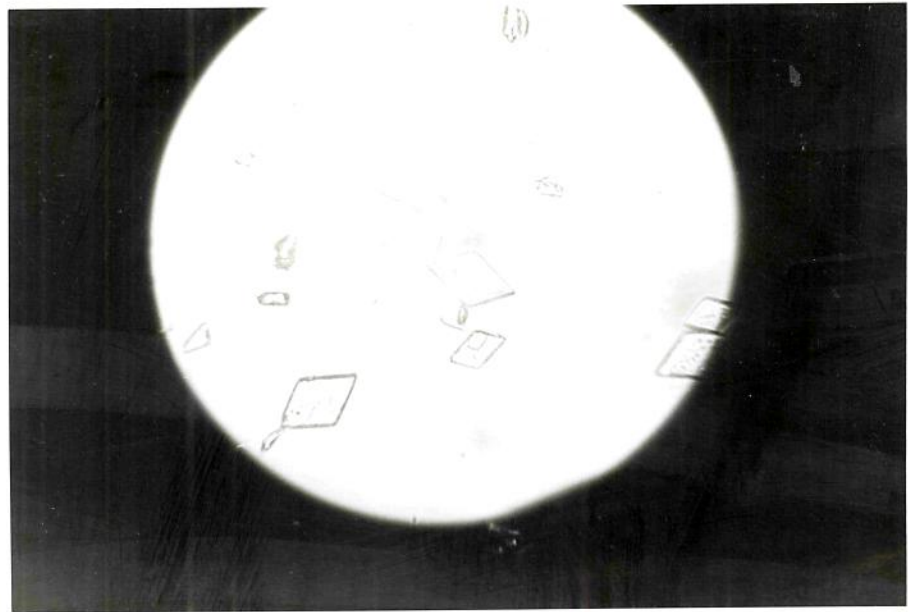


Figura 16. Microfotografia de cristais de 6APA.



Aumento: x 900

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. ADELBERG, E.A. et al. Optimal Conditions For Mutagenesis By N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine in Escherichia Coli K 12. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 18, 788, 1965.
2. BALASINGHAM, K. et al. The Isolation and Kinetics of Penicillin Amidase from Escherichia Coli. *Biochim. Biophys. Acta* 276, 250, 1972.
3. BATCHELOR, F.R. et al. 6-Aminopenicillanic acid in penicillin fermentation. *Proc. Roy. Soc. B.*154, 478, 1961a.
4. ————— . 6-Aminopenicillanic Acid Isolation and Purification. *Proc. Roy. Soc. B.*154, 498, 1961b.
5. ————— . Formation of 6-Aminopenicillanic Acid from Penicillin by Enzymic Hidrolysis. *Proc. Roy. Soc. B.*154, 522, 1961c.
6. BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY. The William & Wilkins Company/Baltimore. Eight Edition, 1975.

7. CHIANG, C., BENNETT, R.E. Purification and Properties of Penicillin Amidase from *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 93, 302, 1967.
8. CLARIDGE, C.A. et al. Bacterial Penicillin Amidase. *Nature.* 187, 237, 1960.
9. CLARIDGE, C.A. et al. Specificity of Penicillin Amidases. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 113, 1008, 1963.
10. CROMBRUGGHE, B. et al. Regulation of Inducible Enzymes Synthesis in *Escherichia Coli* by Adenosine 3', 5' Monophosphate. *J. Biol. Chem.* 21, 5828, 1969.
11. COLE, M., ROLINSON, G.N. Formation of 6-Aminopenicillanic Acid by *Emericellopsis Minima* (Stolk) and Related Fungi. *Proc. Roy. Soc. B.* 154, 490, 1961.
12. COLE M. Properties of the Penicillin Deacylase Enzymes of *Escherichia Coli*. *Nature.* 203, 519, 1964.
13. ————— . Formation of 6-Aminopenicillanic Acid, Penicillins, and Penicillin Acylase by Various Fungi. *Appl. Microbiol.* 14, 98, 1966 .

14. COLE, M., SUTHERLAND. The role of Penicillin Acylase in the Resistance of GRAM-Negative Bacteria to Penicillins. *J. Gen. Microbiol.* 42, 345, 1966.
15. COLE, M. Hydrolysis of penicillins and related compounds by the cell-bound penicillin acylase of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 115, 733, 1969.
16. ERICKSON, R.C. et al. Penicillin Acylase Activity of *Penicillium Chrysogenum*. *Appl. Microbiol.* 13, 738, 1965.
17. HUANG, R.T. et al. Enzymatic Hidrolysis of the Side Chain of Penicillins. *J. Am. Chem. Soc.* 82, 3790, 1960.
18. ————— . Distribution and Substrate Specificity of Benzylpenicillin Acylase. *Appl. Microbiol.* 11, 1, 1963.
19. KAUFMANN, W., BAUER, K. Variety of Substrate for a Bacterial Benzyl Penicillin-splitting Enzyme. *Nature.* 203, 520, 1964.
20. KAMEDA, Y. et al. A method for isolating bacteria capable of producing 6-aminopenicillanic acid from benzyl-penicillin. *Nature.* 191, 1122, 1961.

21. KHACHATOURIANS, G. et al. Cell growth and division in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 116, 226, 1973.
22. MASUMUNE, Y. A thermosensitive mutant of *Escherichia coli* with a defect in the process of cell division. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 21, 135, 1975.
23. MATHIEU, R., HIROTA, Y. Process of Cellular Division in *Escherichia coli*: Physiological Study on Thermosensitive Mutants Defective in Cell Division. *J. Bacteriol.* 116, 314, 1973.
24. NAKADA, D., MAGASANIK, B. The roles of inducer and catabolite repressor in the synthesis of β -galactosidase by *Escherichia coli*. *Mol. Biol.* 8, 105, 1964.
25. NARA, T. et al. Enzymatic Synthesis of D(-) α -aminobenzyl Penicillin by *Kluyvera citrophila*. *J. Antibiotics.* 24, 321, 1971a.
26. NARA, T. et al. Enzymatic synthesis of D(-)- α -aminobenzylpenicillin. Selection of Penicillin Acylase-producing Bacteria. *Agr. Biol. Chem.* 35, 1676, 1971b.

27. OKACHI, R. et al. Production of 6-aminopenicillanic Acid by *Kluyvera citrophila* KY3641. *Agr. Biol. Chem.* 36, 925, 1972a.
28. ————— . Production of D(-)- α -aminobenzyl-penicillin by *Kluyvera citrophila* KY3641. *Agr. Biol. Chem.* 36, 1193, 1972b.
29. ————— . Isolation of Penicillinase-deficient Mutants of *Kluyvera citrophila* KY3641. *Agr. Biol. Chem.* 37, 335, 1973a.
30. ————— . Selection of *Pseudomonas Melanogenum* KY3987 as a New Ampicillin-producing Bacteria. *Agr. Biol. Chem.* 37, 1953, 1973b.
31. ROLINSON, G.N. et al. Formation of 6-Aminopenicillanic Acid from Penicillin by Enzymatic Hydrolysis. *Nature.* 187, 256, 1960.
32. SAKAGUCHI, K., MURAO, S. A new enzyme penicillin amidase. *J. Agr. Chem. Soc. Japan.* 23, 411, 1950.
33. SANTOS, D., ALMEIDA, D. Isolation and Characterization of

a New Temperature-Sensitive Cell Division Mutant of
Escherichia coli K-12. *J. Bacteriol.* 124, 1502, 1975.

34. SHIMIZU, M. et al. Purification and Properties of Penicillin
Acylase from *Kluyvera citrophila*. *Agr. Biol. Chem.* 39,
1655, 1975.
35. SINGH, K. et al. Hydrolysis of Phenoxymethyl Penicillin
into 6-Aminopenicillanic Acid with Spores of *Fusaria*.
Appl. Microbiol. 17, 643, 1969.
36. SMITH, A.J. et al. Regulation of Bacterial Cell Division:
Genetic and Phenotypic Analysis of Temperature-Sensitive.
J. Bacteriol. 117, 978, 1974.
37. STAHL, E. Thin Layer Chromatography. Springer-Verlag. 2^a
ed., 1969.
38. SZENTIRMAI, A. Production of Penicillin Amidase. *Appl.*
Microbiol. 12, 185, 1964.
39. TAKASAWA, S. et al. Some Problems Involved in Ampicillin
Acylase. *Agr. Biol. Chem.* 36, 1701, 1972.

40. UEDA, S. Fermentation and Microorganism. Asakura Co. 1970.
p.87.