

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Produção e otimização do processo de
obtenção de ácido γ -poliglutâmico através do
cultivo de *Bacillus subtilis* BL53**

Tese de Doutorado

Suse Botelho da Silva

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

**Produção e otimização do processo de
obtenção de ácido γ -poliglutâmico através do
cultivo de *Bacillus subtilis* BL53**

Suse Botelho da Silva

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do
título de Doutora em Engenharia Química

Área de Concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de
Processos

Orientador:

Prof. Dr. Marco Antonio Záchia Ayub

Porto Alegre

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese “Produção e otimização do processo de obtenção de ácido γ -poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53”, elaborada por Suse Botelho da Silva, como requisito parcial para obtenção do Grau de Doutora em Engenharia.

Comissão Examinadora:

Profa. Dra. Isabel Cristina Tessaro

Prof. Dr. Plinho Francisco Hertz

Profa. Dra. Claire Tondo Vendruscolo

A meu pai.

*A verdadeira viagem de descoberta
não consiste em procurar novas paisagens,
mas em ter novos olhos.*

Marcel Proust

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo suporte para o desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador Marco Antonio Záchia Ayub pela orientação, pelo apoio e pelo incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos professores Plinho Francisco Hertz, Julio Xandro Hech, Simone Hickmann Flôres, Keiko Wada e Nilo Cardozo pelas contribuições ao desenvolvimento deste trabalho.

Ao pesquisador Vlademir Vicente Cantarelli pela colaboração na etapa de identificação da linhagem utilizada neste estudo.

Aos bolsistas Letícia Yukie Okada, Carolina Montagner Schmaedecke, Nathalie de Richter Herrmann e Fabio Henrique Ferreira Antunes pela dedicação e valiosa colaboração na etapa experimental deste trabalho.

Aos colegas do Bioteclab, mas principalmente à Giandra Volpato, Débora Luvizetto, Nicole Sehnem, Priscila Souza Cruz e Graziela Brinques, pela cooperação e amizade.

Aos amigos da Unisinos, pela parceria e apoio durante a realização deste trabalho.

À minha família, em especial a minha mãe e minhas irmãs, pelo amor e carinho e, sobretudo por compreenderem a minha ausência. À minha irmã Thaís, pela amizade e pelo bom humor, importantes neste momento.

Ao Sandro, com quem tenho compartilhando meus sonhos, minhas realizações e também meus desafios. Agradeço por estar também presente no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço todo o apoio, carinho e incentivo.

Resumo

O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é um biopolímero solúvel em água, aniônico, atóxico, biodegradável e biocompatível, produzido por *Bacillus* e que possui aplicações nas áreas química, médica, ambiental e de alimentos. Este trabalho tem como objetivo estudar o processo de produção do γ -PGA a partir do cultivo de uma nova linhagem de *Bacillus* isolada de ambiente amazônico, o *Bacillus subtilis* BL53. Este estudo inclui a seleção de culturas, a otimização de condições de cultivo e a prospecção de substratos de produção alternativos. A habilidade de produção de γ -PGA por linhagens de *Bacillus* isoladas na região amazônica foi investigada. A linhagem BL53 foi a linhagem selecionada, sendo identificada como *Bacillus subtilis*, através da análise da seqüência do gene 16S DNAr e de suas características bioquímicas. A avaliação das condições de cultivo submerso foi conduzida em agitador orbital mediante delineamento composto central rotacional (DCCR) que apontou como ponto ótimo de produção de γ -PGA, a temperatura de 37 °C, o pH inicial de 6,9 e a concentração de 1,22 mM de Zn^{2+} suplementada ao Caldo E. Nas condições otimizadas, a produção de γ -PGA foi igual a 10,4 g/L, cerca de três vezes maior que a obtida em condições convencionais de cultivo em Caldo E, utilizando a mesma linhagem. A influência da disponibilidade de oxigênio sobre a produção de γ -PGA por *B. subtilis* BL53 foi avaliada em biorreator agitado de 5 L, com o emprego das velocidades de agitação de 500, 750 e 1000 rpm, sendo mantida fixa a taxa de aeração de 2 vvm. A produção de γ -PGA mostrou-se altamente dependente da transferência de oxigênio, sendo que o teor de oxigênio dissolvido decaiu rapidamente nas primeiras 15 horas de cultivo, como resultado da elevada demanda de oxigênio pelas bactérias. O aumento na velocidade de agitação no biorreator possibilitou uma maior transferência de oxigênio e induziu o aumento na taxa de consumo de oxigênio pelas bactérias, conduzindo a maior produção e maior produtividade de γ -PGA. A intensificação da agitação também influenciou os parâmetros cinéticos de crescimento do *Bacillus subtilis* BL53, provocando um aumento na velocidade específica de crescimento na fase logarítmica (μ_{max}) sem provocar a perda da viabilidade celular. Com a utilização da velocidade de agitação de 1000 rpm em biorreator, o tempo de cultivo pode ser reduzido para menos de 48 h, cerca de 50% do tempo necessário para operação a 500 rpm. A investigação de substratos alternativos para produção de γ -PGA mostrou o glicerol residual de biodiesel e o resíduo fibroso de soja como substratos promissores, apontando para a possibilidade de investigação em trabalhos futuros.

Palavras-chave: ácido γ -poliglutâmico, *Bacillus subtilis*, bioprocesso, otimização, transferência de oxigênio, resíduos industriais.

Abstract

The poly-gamma-glutamic acid (γ -PGA) is a water-soluble biopolymer, anionic, non toxic, biodegradable and biocompatible, it is produced by *Bacillus* and it has applications in chemical, medical, environmental and food industries. This work aims to study the process of production of γ -PGA through cultivation of a new strain of *Bacillus* isolated from the Amazonian environment, *Bacillus subtilis* BL53. This study includes the screening of strains, the optimization of culture conditions and the investigation of alternative substrates. The ability of γ -PGA production by *Bacillus* strains isolated from Amazonian environment was investigated. The BL53 strain was selected and identified as *Bacillus subtilis*, through analysis of 16S rDNA gene sequence and its biochemical characteristics. Evaluation of culture conditions in submerged cultivation was conducted in shaker using central composite design (CCD), which showed the temperature of 37 °C, the initial pH 6.9 and concentration of 1.22 mM Zn²⁺ in Medium E as the optimal conditions to γ -PGA production. Under optimized conditions, the production of γ -PGA was 10.4 g/L, about threefold what was obtained using this strain under conventional cultivation in Medium E. The influence of oxygen availability on the production of γ -PGA by *B. subtilis* BL53 was evaluated in a 5 l stirred bioreactor with the use of stirring rates of 500, 750 and 1000 rpm, using a fixed aeration rate of 2 vvm. Production of γ -PGA was highly dependent on oxygen transfer, and the dissolved oxygen content decreased rapidly in the first 15 hours of culture as a result of high oxygen demand by bacteria. The increase in stirring rate in the bioreactor allowed a better oxygen transfer and induced a rise in the oxygen uptake rate by bacteria, leading to higher production and higher productivity of γ -PGA. The intensification of the stirring also influenced the kinetics growth parameters of *Bacillus subtilis* BL53, producing an increase in specific growth rate in the logarithmic phase (μ_{max}) without causing reduction of cell viability. Using the stirring rate of 1000 rpm in a bioreactor, the cultivation time can be reduced to less than 48 h, about 50% of the time required for operation at 500 rpm. The investigation of alternative substrates for the production of γ -PGA showed crude glycerol from biodiesel and soybean industrial fibrous residue as promising ones, pointing to research possibilities in future work.

Keywords: poly-gamma-glutamic acid, *Bacillus subtilis*, bioprocess, optimization, oxygen transfer, industrial residues.

Sumário

Introdução	1
Revisão Bibliográfica	5
2.1 O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA)	5
2.1.1 Propriedades físico-químicas	6
2.1.2 Aplicações tecnológicas.....	10
2.2 Biosíntese de ácido γ -poliglutâmico	14
2.2.1 A função do ácido γ -poliglutâmico nas bactérias.....	15
2.2.2 O mecanismo da síntese e degradação.....	16
2.2.3 Aspectos genéticos.....	20
2.3 Bioprocessos para obtenção de γ -PGA	22
2.3.1 Produção de γ -PGA em cultivo submerso	23
2.3.2 Produção γ -PGA em cultivo de estado sólido	27
2.4 Recuperação e quantificação do γ -PGA.....	29
2.5 Transferência de oxigênio em cultivo submerso para produção de biopolímeros	32
2.5.1 Respiração microbiana e transferência de oxigênio	32
2.5.2 Aeração e agitação em cultivo submerso para produção de biopolímeros.....	36
2.5.3 Determinação do k_{La} e Q_{O_2}	37
Metodologia	40
3.1 Microrganismos	40
3.1.1 Coleção de culturas de isolados da região amazônica.....	40
3.1.2 Isolados de Natto.....	41
3.1.3 Manutenção e reativação das culturas	41
3.2 Meios de cultivo	41
3.3 Métodos analíticos.....	42
3.3.1 Biomassa microbiana	42
3.3.2 Contagem total em placa - células viáveis	42
3.3.3 Ácido γ -poliglutâmico	43
3.3.4 Carboidratos totais.....	43
3.4 Estudo do inóculo	43
3.5 <i>Screening</i> de linhagens produtoras de ácido γ -poliglutâmico.....	44
3.6 Identificação filogenética e caracterização morfológica e bioquímica de linhagens produtoras de γ -PGA	44
3.7 Cultivo submerso em incubadora de agitação orbital (<i>shaker</i>).....	45
3.7.1 Condições de cultivo.....	45

3.7.2 Delineamento composto central rotacional para três fatores	45
3.7.3 Avaliação estatística	46
3.8 Cultivo submerso em biorretor.....	47
3.8.1 Condições de cultivo e amostragem	47
3.8.2 Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento microbiano.....	48
3.8.3 Aquisição de dados de oxigênio dissolvido	49
3.8.4 Determinação do OUR , Q_{O_2} e k_La	49
3.9 Estudo preliminar para produção de γ -PGA utilizando resíduos industriais..	51
3.9.1 Cultivo submerso em agitador orbital utilizando glicerol residual de biodiesel	51
3.9.2 Cultivo em estado sólido sobre resíduo fibroso de soja (RFS).....	51
Resultados e Discussões.....	54
4.1 Estudo do inóculo	54
4.2 Seleção das melhores linhagens produtoras de γ -PGA	57
4.3 Identificação de linhagens produtoras de γ -PGA	59
4.4 Otimização de parâmetros para produção de γ -PGA em cultivo submerso.....	61
4.5 Comparação da produção de γ -PGA em agitador orbital e em biorreator	68
4.6 Avaliação do efeito da agitação sobre a produção de γ -PGA.....	70
4.6.1 Velocidade de agitação e teor de oxigênio dissolvido	71
4.6.2 Velocidade de agitação, OUR e Q_{O_2}	74
4.6.3 Velocidade de agitação e k_La	78
4.6.4 Velocidade de agitação e viabilidade celular	81
4.6.5 Velocidade de agitação e produção do γ -PGA	84
4.7 Potencialidades para produção de γ -PGA utilizando resíduos industriais.	89
4.7.1 Cultivo submerso utilizando glicerol residual de biodiesel.....	89
4.7.2 Cultivo em estado sólido utilizando o resíduo fibroso de soja	91
4.7.3 Considerações sobre a utilização de resíduos industriais para a produção de γ -PGA.....	96
Conclusão	97
Perspectivas para continuidade do trabalho.....	101
Referências	103
Apêndice A	112
Apêndice B.....	114

Lista de Figuras

Figura 2.1 Estrutura química: (a) ácido α -poliglutâmico e (b) ácido γ -poliglutâmico	6
Figura 2.2 Modelo predito para o ácido γ -D-poliglutâmico (γ -D-PGA): hélice voltada no sentido anti-horário estabilizada por pontes de hidrogênio intramoleculares.....	9
Figura 2.3 Representação esquemática da biosíntese de γ -PGA	17
Figura 2.4 Via proposta para a síntese do γ -PGA em <i>Bacilli</i>	18
Figura 2.5 Representação dos genes que codificam o complexo responsável pela síntese e degradação do γ -PGA.	21
Figura 2.6 Variação da concentração de oxigênio dissolvido durante a medida de k_{La} e Q_{O_2} pelo método dinâmico.	38
Figura 2.7 Determinação do k_{La} pelo método dinâmico.	39
Figura 3.1 Biorreator Biostat B (B. Braun Biotech International).....	47
Figura 3.2 Gráfico representativo da determinação do k_{La} pelo método dinâmico	50
Figura 3.3 Biorreator para cultivo em estado sólido.....	53
Figura 4.1 Curvas de crescimento microbiano em Caldo LB em cultivos conduzidos a 37 °C e 180 rpm.	56
Figura 4.2 Curvas de crescimento microbiano em Caldo E em cultivos conduzidos a 37 °C e 180 rpm.	56
Figura 4.3 Produção de γ -PGA em Caldo E por linhagens isoladas na Amazônia, a 37 °C e 180 rpm.	57
Figura 4.4 Produção de carboidratos totais por linhagens isoladas na Amazônia, em Caldo E a 37°C e 180 rpm	58
Figura 4.5 Produção de γ -PGA por linhagens isoladas de Natto, em Caldo E a 37 °C e 180 rpm	59
Figura 4.6 Diagramas de contorno para a produção de γ -PGA em 72 horas de cultivo	67
Figura 4.7 Produção de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> BL53, sob condições otimizadas pelo DCCR em agitador orbital e biorreator agitado mecanicamente a 500 rpm e 2 vvm	69
Figura 4.8 Teor de oxigênio dissolvido durante o cultivo para produção de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> BL53 sob diferentes velocidades de agitação e aeração 2 vvm.....	73
Figura 4.9 Teor de oxigênio dissolvido durante as primeiras 15 de horas de cultivo para produção de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> BL53 sob diferentes velocidades de agitação e aeração 2 vvm.....	73

Figura 4.10 Gráfico experimental obtido durante realização do Método Dinâmico para determinação do OUR , Q_{O_2} e k_{La} para o cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> BL53.....	74
Figura 4.11 Gráfico típico para a determinação do k_{La} , obtido a partir dos dados experimentais do cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> BL53.....	79
Figura 4.12 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) para cultivos de <i>Bacillus subtilis</i> BL53	80
Figura 4.13 Teor de células viáveis durante a produção de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> BL 53 para cultivos conduzidos a 2 vvm e velocidades de agitação de 500 rpm, 750 rpm e 1000 rpm	82
Figura 4.14 Produção de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> BL53 para cultivos conduzidos a 2 vvm e velocidades de agitação de 500 rpm, 750 rpm e 1000 rpm	85
Figura 4.15 Produtividade de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> BL 53 para cultivos conduzidos a 2 vvm e velocidades de agitação de 500 rpm, 750 rpm e 1000 rpm	87
Figura 4.16 Produção de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> BL53, sob condições otimizadas pelo DCCR, conduzidos em agitador orbital a 180 rpm, utilizando meio de cultivo com glicerol P.A. e glicerol residual de biosiesel	91
Figura 4.17 Efeito da adição do meio Bushnell-Hass modificado na produção de γ -PGA a partir de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> BL53 sobre RFS, a 37°C, aeração de 250 mL/min.....	93

Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Produção de γ -PGA em cultivo submerso.....	25
Tabela 3.1 Caldo Luria Bertani (LB), pH 6,5.....	42
Tabela 3.2 Caldo E, pH 6,5.....	42
Tabela 3.3 Valores codificados e originais utilizados no DCCR para avaliar o efeito da temperatura, da concentração de Zn^{2+} e do pH inicial sobre a produção de γ -PGA em cultivo submerso.....	46
Tabela 3.4 Resíduo fibroso de soja (RFS) – composição típica	52
Tabela 3.5 Composição do meio Bushnell-Hass modificado.....	52
Tabela 4.1 Características morfológicas e bioquímicas da linhagem BL53.....	60
Tabela 4.2 Matriz do delineamento (DCCR) para 3 fatores e valores observados para a produção de γ -PGA em 72 h de cultivo.....	63
Tabela 4.3 Estimativa da significância dos efeitos	64
Tabela 4.4 Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para produção de γ -PGA (g/L) em 72 h, referente a matriz do delineamento (DCCR).....	65
Tabela 4.5 Taxa global de consumo de oxigênio para cultivos realizados a 500, 750 e 1000 rpm	75
Tabela 4.6 Taxa específica de consumo de oxigênio para cultivos realizados a 500, 750 e 1000 rpm	76
Tabela 4.7 Ajuste das curvas de crescimento ao Modelo Logístico e respectivos parâmetros	83

Capítulo 1

Introdução

A busca pela sustentabilidade ambiental tem como um de seus maiores problemas a utilização de materiais de origem petroquímica. Esses materiais possuem uma longa vida pós-utilização e geram resíduos não-biodegradáveis (oxi-degradáveis), que em sua maioria são descartados de forma inadequada causando graves problemas ao ambiente. O enfrentamento desse desafio orienta para a pesquisa de novos materiais ambientalmente seguros, que também precisam apresentar desempenho técnico igual ou superior aos materiais convencionais. Dentre esses novos materiais, os polímeros têm papel de destaque à medida que vêm em substituição a muitos dos materiais produzidos pela indústria petroquímica, como plásticos e adesivos. Assim, os biopolímeros obtidos a partir de recursos renováveis (e até mesmo de resíduos industriais) surgem como uma alternativa importante, principalmente se esses materiais forem biodegradáveis e biocompatíveis.

O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é um biopolímero aniônico, solúvel em água, biodegradável, biocompatível, comestível e não tóxico para humanos e para o ambiente. Em função dessas características especiais, diversas aplicações têm sido desenvolvidas para esta poliamida nas áreas química, médica, ambiental e de alimentos. O γ -PGA é

produzido por microrganismos do gênero *Bacillus*, sendo que as aplicações desse biopolímero e de seus derivados incluem usos como geleificante, floculante, espessante, umectante, absorvedor de metais pesados, bioplástico, veículo para medicamentos, nanocompósito, agente de contraste, adesivo biológico, crioprotetor, ingrediente funcional e aditivo para alimentação animal.

A temática da Tese insere-se neste contexto à medida que pretende estudar a produção de ácido γ -poliglutâmico a partir do cultivo de uma nova linhagem de *Bacillus* isolada de ambiente amazônico. Com esse objetivo, uma linhagem foi selecionada e caracterizada e foram definidas condições operacionais de processo. Especial atenção foi concedida ao estudo da transferência de oxigênio em cultivo submerso, por ser este um aspecto fundamental para a compreensão e a otimização do processo de produção de biopolímeros. O potencial de utilização de resíduos industriais como substratos alternativos para a produção de γ -PGA também foi investigada.

Em cultivo submerso, o glicerol é o componente majoritário dos meios para produção de γ -PGA. O glicerol também é o principal subproduto da produção do biodiesel, sendo gerado numa proporção de cerca de 10% do total produzido em biodiesel. Segundo previsões de especialistas, o volume desse resíduo tende a aumentar no Brasil nos próximos anos, principalmente em decorrência dos incentivos para a produção de combustíveis de origem alternativa ao petróleo.

O γ -PGA está presente naturalmente na mucilagem de produtos fermentados de soja consumidos nos países asiáticos, sendo a soja e seus derivados, portanto, substratos potenciais para a produção desse biopolímero. O Brasil é o segundo produtor mundial de soja, ficando somente atrás dos Estados Unidos. Parte dessa soja é processada no país, gerando uma grande quantidade de resíduos fibrosos. O resíduo fibroso de soja (RFS) é constituído principalmente por proteína insolúvel, hemicelulose e celulose, representando um substrato promissor para cultivos de estado sólido.

Mesmo com a grande disponibilidade de resíduos potencialmente favoráveis à produção de γ -PGA no Brasil, pesquisas brasileiras visando o desenvolvimento de processo tecnológico para produção desse biopolímero são escassas. Em apenas dois grupos de pesquisa que atuam no Brasil na área de biopolímeros foram identificados estudos relativos ao γ -PGA, sendo um grupo da Universidade Estadual de Londrina, no Paraná e o outro da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, onde o presente trabalho foi desenvolvido.

Deste modo, este trabalho tem como **objetivo geral** estudar o processo de produção de ácido γ -poliglutâmico a partir do cultivo de uma nova linhagem de *Bacillus* isolada de ambiente amazônico, o *Bacillus subtilis* BL53.

São **objetivos específicos**:

- verificar a habilidade de linhagens de *Bacillus* isoladas de água e de solo da região Amazônica em produzirem o γ -PGA;
- identificar e caracterizar uma nova linhagem de *Bacillus* com competência para produzir o γ -PGA;
- otimizar parâmetros de processo para produção do γ -PGA em cultivo submerso da nova linhagem, através de planejamento de experimentos e modelagem do processo;
- avaliar a influência da velocidade de agitação em biorreator sobre a transferência de oxigênio, a viabilidade celular, a produção e a produtividade de γ -PGA;
- avaliar o potencial para produção de γ -PGA a partir de resíduos industriais.

As etapas experimentais deste trabalho foram realizadas, na sua maioria, no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todas as metodologias empregadas foram fundamentadas em pesquisa bibliográfica em bases de referência internacionais.

Este trabalho está estruturado em seis capítulos, sendo o **Capítulo 1** a Introdução. O **Capítulo 2** é o capítulo da Revisão Bibliográfica, onde são reportados os pressupostos teóricos que orientaram todo o desenvolvimento experimental deste trabalho. No **Capítulo 3** estão descritas as metodologias empregadas para o delineamento experimental, identificação microbiana, condução dos cultivos, quantificação de espécies químicas e avaliação estatística. Os principais resultados são apresentados no **Capítulo 4**, bem como as discussões pertinentes a cada caso. No **Capítulo 5** são apresentadas as Conclusões e no **Capítulo 6** são apontadas perspectivas para continuidade de trabalhos na área.

Capítulo 2

Revisão Bibliográfica

2.1 O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA)

O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é um biopolímero aniônico que ocorre naturalmente na forma de uma homopoliamida composta por unidades de D- e L-ácido glutâmico. O γ -PGA é solúvel em água, biodegradável, comestível e não-tóxico para seres humanos e para o meio ambiente. Esse biopolímero pode ser utilizado na indústria de alimentos como agente geleificante, ingrediente funcional, espessante, umectante e crioprotetor. Na indústria química, pode ser utilizado como absorvedor de metais pesados e floculante e na indústria farmacêutica, como veículo para medicamentos (SHIH; VAN, 2001).

Inicialmente, é necessário que se faça uma distinção entre o γ -PGA e o α -PGA. Ambos polímeros são formados por unidades de ácido D- e L-glutâmico, no entanto a ligação entre os monômeros é diversa. Enquanto que no γ -PGA as unidades monoméricas estão conectadas por uma ligação amida entre o grupo α -amino e o grupo γ -ácido carboxílico (SHIH; VAN, 2001), no α -PGA, a união se dá com o grupo

α -ácido carboxílico (BUESCHER; MARGARITIS, 2007), conforme pode ser observado na Figura 2.1.

Em algumas publicações ainda é possível observar o uso da terminologia “ácido poliglutâmico” ou “PGA” de forma indistinta, como ocorre em Oppermann-Sanio e Steinbüchel (2002) e Soliman, Berekaa e Abdel-Fattah (2005), no entanto essa prática tem sido cada vez menos freqüente.

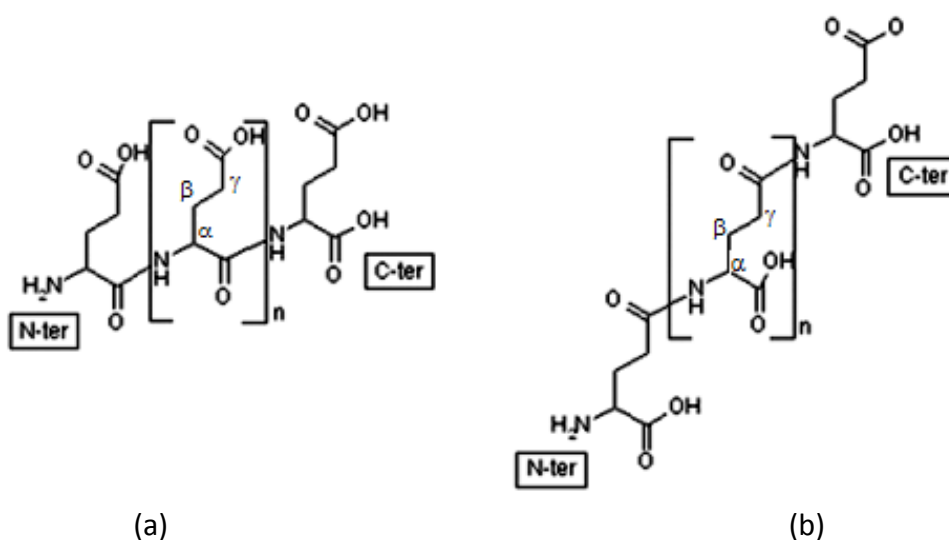


Figura 2.1 Estrutura química: (a) ácido α -poliglutâmico e (b) ácido γ -poliglutâmico
FONTE: Adaptado de Candela e Fouet (2006)

2.1.1 Propriedades físico-químicas

O γ -PGA é um polímero composto unicamente por uma das formas ou pelas duas formas enantioméricas (D- e L-) do ácido glutâmico. O γ -PGA é altamente solúvel e é sequestrante de moléculas de água. Ao contrário das proteínas, onde os aminoácidos são ligados por ligações peptídicas (α -amino), no γ -PGA as ligações são do tipo γ -amino, deste modo este polímero é resistente à ação das proteases, capazes de clivar apenas as ligações α -amino. (CANDELA; FOUET, 2006).

O γ -PGA produzido por *Bacillus* geralmente apresenta massa molecular elevada, na faixa entre 10^5 a 10^8 Da e polidispersividade¹ entre 2 e 5 (DO; CHANG; LEE, 2001; SHIH; VAN, 2001). Oppermann-Sanio e Steinbüchel (2002) referem uma faixa mais estreita de massa molecular para o γ -PGA produzido por *Bacillus licheniformis*, com valores entre 10^5 e 10^6 Da. Sung et al. (2005) utilizando a linhagem *Bacillus subtilis* chungkookjang, obtiveram um γ -PGA de elevada massa molecular ($> 2 \cdot 10^6$ Da) quando usaram uma concentração baixa de cloreto de sódio no meio de cultivo e uma massa molecular mais baixa ($10^4 - 2 \cdot 10^6$ Da) para concentrações superiores a 10 % de cloreto de sódio.

De acordo com Ashiuchi et al. (2001b), a adição de ácido glutâmico ao meio de cultura ou de outro aminoácido da família do ácido glutâmico, como a glutamina ou a arginina, é essencial para a produção de filamentos longos de γ -PGA (acima de 10^6 Da).

A massa molecular e a polidispersividade são características importantes que se refletem nas propriedades funcionais de um polímero. A massa molecular e a estrutura química dos materiais poliméricos são as principais responsáveis pelas suas propriedades e, conseqüentemente, pela sua utilização em inúmeras aplicações (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

Segundo Shih e Van (2001), a massa molecular dos filamentos de γ -PGA e sua polidispersividade podem variar de acordo com o microrganismo e com as condições de cultivo utilizadas. No entanto Candela e Fouet (2006) atribuem essa variação

¹ Polidispersividade ou índice de polidispersividade ou índice de polidispersão é uma medida do grau de dispersão da massa molecular de um dado polímero ou mistura polimérica. Este índice corresponde à razão entre a massa molecular ponderal média da mistura polimérica dividida pela massa molecular numérica média (número médio de filamentos com diferentes massas moleculares). Métodos baseados na análise do grupo terminal e nas propriedades coligativas do polímero fornecem o número de moléculas por grama do material, portanto permitem determinar a massa molecular numérica média (LUCAS, SOARES; MONTEIRO, 2001).

principalmente à degradação do γ -PGA por γ -glutamil hidrolases secretadas no meio de cultivo no final da fase estacionária e também às diferenças nos métodos de quantificação e purificação utilizados nas determinações analíticas desse polímero.

Os polímeros com massa molecular elevada são úteis como espessantes, no entanto, podem não ser aplicáveis a outros usos nos quais uma alta viscosidade os tornaria inadequados. A massa molecular do polímero definirá, portanto, em grande parte, a sua aplicação. Por exemplo, em sistemas utilizados para veiculação de medicamentos, polímeros de diferentes massas moleculares são requeridos para controlar a liberação da droga através dos tecidos (SHIH; VAN, 2001). A conformação da molécula de γ -PGA também pode influenciar a viscosidade das suspensões, assim como a capacidade do polímero em complexar metais (HE; NEU; VANDERBERG, 2000). O filamento de γ -PGA pode adotar uma conformação estrutural específica dependendo da sua concentração e do pH do meio (HE; NEU; VANDERBERG, 2000; DO; CHANG; LEE, 2001). A estrutura do ácido γ -D-poliglutâmico (γ -D-PGA) foi predita por Zanuy e Aleman (2001) através de um modelo teórico calculado para uma molécula composta por 10 a 20 unidades monoméricas de ácido D-glutâmico. Em solução aquosa essa molécula consistiria de uma hélice no sentido anti-horário, estabilizada por pontes de hidrogênio intramoleculares, conforme mostrado na Figura 2.2.

A forma não ionizada do γ -PGA (pHs baixos) é frequentemente relacionada a uma conformação helicoidal, enquanto o polímero ionizado apresenta-se na forma desordenada de novelo randômico (*random coil*) (SHIH; VAN, 2001). Segundo He, Neu e Vanderberg (2000), em baixas concentrações (0,1 % p/v) e quando o pH é menor do que 7,0, o γ -PGA adota uma conformação de α -hélice, enquanto uma conformação de folha pregueada (β -*sheet*) predomina em valores elevados de pH. A conformação de β -*sheet* expõe as cargas negativas do γ -PGA mais eficientemente. Do, Chang e Lee (2001) sugeriram que ocorre uma mudança conformacional do γ -PGA em valores de

pH abaixo de 5,0. A mudança de conformação de randômica para helicoidal, em baixos valores de pH, induziria à redução no raio hidrodinâmico do γ -PGA e propiciaria a diminuição da viscosidade das suspensões e o aumento da permeabilidade do polímero em processos de separação por membranas.

Sung et al. (2005) também apontam a atividade ótica do γ -PGA como uma característica importante para algumas aplicações deste polímero na área médica. No entanto, segundo Buescher e Margaritis (2007), para as demais aplicações, a razão entre as duas formas enantioméricas (D- e L-) é indiferente, o que simplifica grandemente a produção do γ -PGA.

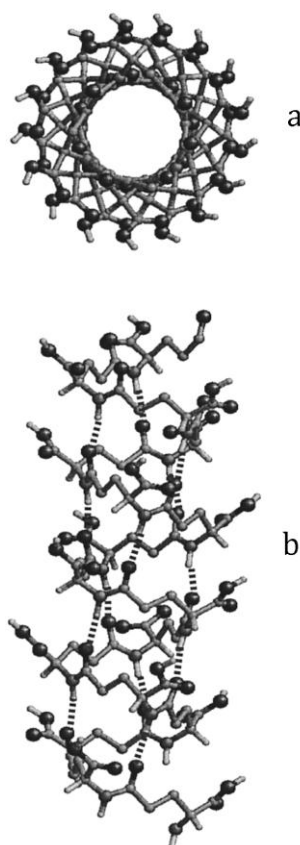


Figura 2.2 Modelo predito para o ácido γ -D-poliglutâmico (γ -D-PGA): hélice voltada no sentido anti-horário estabilizada por pontes de hidrogênio intramoleculares. (a): vista superior, (b) vista lateral.

FONTE: Zanuy e Aleman (2001)

2.1.2 Aplicações tecnológicas

Uma característica importante do γ -PGA que desperta muito interesse no desenvolvimento de novas aplicações é sua biodegradabilidade. Segundo Kunioka (2004), os polímeros biodegradáveis são úteis principalmente para aquelas aplicações onde os produtos plásticos convencionais são impossíveis ou difíceis de reciclar, como no caso de filmes protetores de sementes ou brotos vegetais, fraldas descartáveis e embalagens de alimentos contaminadas. O mesmo autor cita o número cada vez maior de polímeros absorvedores de água utilizados em fraldas descartáveis para bebês e idosos, enfatizando que neste caso, os polímeros convencionais não poderiam ser reciclados após seu uso.

Para aplicações específicas nas áreas médica, farmacêutica ou alimentar, outras características exibidas pelo γ -PGA são desejadas, como a atoxidade, a biocompatibilidade e a não-imunogenicidade (MANOCHA; MARGARITIS, 2008). Em função das características especiais do γ -PGA, diversas aplicações têm sido desenvolvidas e encontram-se amplamente descritas na literatura. Neste item são apresentadas algumas dessas aplicações, contudo uma maior quantidade de exemplos pode ser encontrada em revisões como aquelas realizadas por Buescher e Margaritis (2007), Sung et al. (2005), Schallmey, Singh e Ward (2004), Oppermann-Sanio e Steinbüchel (2002) e Shih e Van (2001).

a) Tratamento de águas – agente floculante

O uso do γ -PGA no tratamento de águas tem sido descrito por diversos pesquisadores. Nestes estudos, um incremento da atividade floculante ocorreu quando cátions multivalentes, como Ca^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} , foram adicionados ao sistema (MAHMOUD, 2006; SHIH et al., 2001; YOKOI et al, 1996, 1995).

A modificação na molécula de γ -PGA também pode aumentar a atividade desse polímero como agente floculante (KUNIOKA, 2004; TANIGUCHI et al., 2005a,b,c). A partir do uso de reagentes indutores de ligações cruzadas (p. ex. dihaloetanos) ou uso de radiação gama é possível sintetizar hidrogéis de γ -PGA com maior atividade floculante (OPPERMANN-SANIO; STEINBÜCHEL, 2002).

Um hidrogel de γ -PGA obtido a partir de *B. subtilis*, modificado pela ação de radiação gama e adicionado de cloreto de poli-alumínio (PAC) foi desenvolvido por Kunioka (2004). Este hidrogel foi capaz de remover a turbidez de águas quando utilizado em concentrações da ordem de 2 mg/L. Taniguchi et al. (2005a) também produziram um hidrogel de γ -PGA modificado pela ação de radiação gama, produzindo um γ -poliglutâmico com ligações cruzadas (*cross-linked poly- γ -glutamic acid* ou C-L γ -PGA). Esses autores também observaram um marcante aumento da atividade floculante quando adicionaram PAC e cátions trivalentes ao meio.

Taniguchi et al. (2005c) testaram a atividade floculante de um outro C-L γ -PGA (Yakult Pharmaceutical Ind.), através da medida da turbidez de suspensões de bentonita e *Escherichia coli*. A adição de cloreto de poli-alumínio (PAC) ou a adição de FeCl_3 ao C-L γ -PGA mostraram-se eficazes na redução da turbidez em suspensões de bentonita, enquanto para as suspensões de *E. coli*, a adição combinada de PAC e FeCl_3 ao C-L γ -PGA foi a que mostrou maior eficácia. A análise elementar e a espectroscopia de plasma mostraram que não apenas o Fe^{3+} do FeCl_3 e o COO^- do C-L γ -PGA formaram um complexo, mas que também Fe_2O_3 e $\text{Fe}(\text{OH})_3$ estariam incluídos neste complexo. Este resultado sugere a possibilidade de utilização do γ -PGA para remoção íons metálicos de águas.

b) Alimentos

Segundo SUNG et al. (2005), as características de multifuncionalidade, biodegradabilidade, atoxicidade, biocompatibilidade e comestibilidade têm feito do

γ -PGA um dos biopolímeros promissores para o uso como ingrediente na indústria de alimentos e de cosméticos, bem como uso como alimento funcional, por exemplo, como fator de prevenção da osteoporose quando associado ao íon Cálcio.

Uma grande variedade de aplicações para o γ -PGA e seus derivados tem sido apresentada na área de alimentos e patentes japonesas e norte-americanas nesta área são citadas por Buescher e Margaritis (2007) e Shih e Van (2001). Em sucos e bebidas, por exemplo, baixas concentrações de γ -PGA têm melhorado o sabor e a textura dos produtos (YAMANAKA, 1991). Em panificação, a adição de γ -PGA tem promovido melhoria na textura, retardado o envelhecimento e a perda de volume em pães e massas (KONNO; TAGUCHI; YAMAGUCHI, 1989).

Mitsuiki et al. (1998) investigaram a atividade crioprotetora de ácidos oligo e poliglutâmico de diferentes massas moleculares utilizando um calorímetro diferencial de varredura (DSC). Os resultados mostraram que o γ -PGA com massa molecular abaixo de 20.000 Da tinha atividade crioprotetora maior do que a glicose, que é reconhecida como uma substância altamente crioprotetora. Esses resultados apontam para a aplicação do γ -PGA como agente crioprotetor em alimentos, enzimas ou microrganismos.

Sung et al. (2007) comprovaram a hipótese de que as diferenças na massa molecular dos filamentos de γ -PGA também poderiam influenciar de forma diferenciada no controle da absorção intestinal de certos nutrientes. Park et al. (2005b) reportaram um acréscimo da solubilidade do Ca^{2+} *in vitro* à medida que a concentração de γ -PGA era acrescida, especialmente quando o polímero apresentava massa molecular elevada. Os autores atribuíram esse resultado à inibição da formação de um complexo insolúvel do Ca^{2+} com o fosfato. Sung et al. (2005) realizaram estudos *in vivo* e observaram que quando o Ca^{2+} era administrado com

γ -PGA, maior era a solubilidade do cátion no intestino de ratos e que essa solubilidade era maior à medida que aumentava a massa molecular do polímero.

Os resultados obtidos sobre a solubilidade do Ca^{2+} em presença de γ -PGA sugerem que novos métodos para suplementação deste nutriente em alimentos e bebidas poderiam ser utilizados. Em alimentos funcionais, sais de cálcio do γ -PGA poderiam ser adicionados para aumentar a concentração de Ca^{2+} nestes produtos, que poderiam ser administrados na prevenção da osteoporose (SUNG et al, 2005). De fato, alimentos funcionais deste tipo já existem no mercado japonês. A Ajinomoto Co. oferece dois produtos funcionais a base de γ -PGA e sais de cálcio, o Calvital e o Caltake (AJINOMOTO, 2006), enquanto que a Nippon Poly-glu Co. comercializa um suplemento funcional de γ -PGA com extrato de malte (NIPPON POLY-GLU, 2006).

c) Outras aplicações

Existem diversas outras aplicações para o γ -PGA descritas na literatura. Essa ampla gama de possibilidades é decorrente das características especiais desse biopolímero, que vem ao encontro da conscientização crescente em relação ao ambiente e da busca por materiais seguros ambientalmente (SUNG et al. 2005).

Além das aplicações do γ -PGA já mencionadas na área de alimentos e de tratamento de águas, pode-se citar seu uso como hidratante em cosméticos, como gel super-absorvente em aplicações biomédicas e ambientais, fertilizante na agricultura, material biodegradável para embalagens, dispersante, imobilizante de enzimas e agente seletivo em processos de separação por membranas (BUESCHER; MARGARITIS, 2007; SHIH; VAN, 2001).

Ainda outras aplicações bem específicas têm sido relatadas na área médica, como seu uso como veículo para medicamentos, material para adesivos biológicos, agente anti-tumoral, agente de contraste, terapia gênica, vacinas e engenharia de

tecidos (MANOCHA; MARGARITIS, 2008; BUESCHER; MARGARITIS, 2007; SHIH; VAN; SHEN, 2004; HOSTEA; SCHACHTA; SEYMOURC, 2000).

2.2 Biosíntese de ácido γ -poliglutâmico

Enquanto o α -PGA pode ser facilmente obtido através da polimerização por adição nucleofílica do N-carboxianidrido do ácido L-glutâmico (BUESCHER; MARGARITIS, 2007), a síntese química do γ -PGA é praticamente impossível (SHIH; VAN, 2001). No entanto, o γ -PGA pode ser obtido através de cultivo microbiano, sendo o *Bacillus subtilis* o microrganismo geralmente utilizado. O *B. subtilis* é o microrganismo utilizado no Japão para a produção do Natto, produto que possui consistência mucilaginoso, decorrente de sua composição que é uma mistura de γ -PGA e levana (SHIH; VAN, 2001).

Além de linhagens do *B. subtilis*, também são citadas como produtoras de γ -PGA, linhagens de *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus halodurans*, conforme revisado por Ashiuchi e Misono (2002), Oppermann-Sanio e Steinbüchel (2002) e Shih e Van (2001). De acordo com Schallmey, Singh e Ward (2004), as espécies do gênero *Bacillus* são microrganismos atrativos do ponto de vista industrial por apresentarem altas taxas de crescimento que resultam em ciclos curtos de fermentação, por serem capazes de secretar proteínas no meio extracelular e por possuírem o status de GRAS (*generally regarded as safe*) para espécies como o *B. subtilis* e o *B. licheniformis*.

2.2.1 A função do ácido γ -poliglutâmico nas bactérias

O γ -PGA foi detectado pela primeira vez há mais de 70 anos, como componente da cápsula celular do *Bacillus anthracis*², (IVANOVICS; BRUCKNER, 1937 apud BUESCHER; MARGARITIS, 2007), sendo mais tarde também detectado em outros *Bacillus* não-patogênicos conforme reportado por Schallmey , Singh e Ward (2004), Ashiuchi e Misono (2002), Oppermann-Sanio e Steinbüchel (2002) e Shih e Van (2001). Há registro anterior do isolamento de uma linhagem de um *Bacillus* capaz de produzir grandes quantidades de γ -PGA, presente na matriz viscosa do Natto, tradicional alimento fermentado japonês à base de soja (SAWAMURA, 1913 apud OPPERMAN-SANIO; STEINBÜCHEL, 2002).

Além da presença do γ -PGA em *Bacillus*, este polímero também pode ser sintetizado por diversas outras bactérias (todas gram-positivas) e também por algumas poucas arqueobactérias e um eucarioto. Uma vez que o γ -PGA apresenta diferentes propriedades bioquímicas, este polímero pode desempenhar diferentes funções, dependendo do organismo e do ambiente (BUESCHER; MARGARITIS, 2007; CANDELA; FOUET; 2006).

Nas bactérias, o γ -PGA pode permitir que esses microrganismos sobrevivam em condições ambientais adversas ou pode estar envolvido na sua virulência (CANDELA; FOUET, 2006). De acordo com Ashiuchi et al. (2001a), existe uma relação estreita entre a síntese do γ -PGA e a esporulação das bactérias.

² O *Bacillus anthracis* é o agente causador do antraz. O antraz é essencialmente uma doença de herbívoros, mas todos os mamíferos, incluindo humanos são sensíveis. A doença é iniciada pela entrada de esporos do *Bacillus anthracis* no corpo do hospedeiro, que pode ocorrer através de um simples arranhão, através da picada de um inseto ou por ingestão de carne contaminada ou inalação de esporos. O antraz cutâneo é o mais comum, mais facilmente diagnosticado e mais facilmente tratado. O antraz na forma gastrointestinal e pulmonar são de mais difícil diagnóstico e tratamento e pode evoluir rapidamente a quadros fatais (MOCK; FOUET, 2001).

Quando o γ -PGA encontra-se associado (*anchored* γ -PGA) à superfície da bactéria, contribui como um fator de virulência, protegendo o patógeno do sistema imunológico do hospedeiro. Por outro lado, quando o polímero é liberado (*released* γ -PGA), pode ser considerado como um fator de persistência, pois garante a sobrevivência da bactéria em um ambiente hostil. O γ -PGA pode ser considerado também como um composto de reserva para precursores de carbono e de nitrogênio ou fonte de energia (SCHREIER, 1993 apud CANDELA; FOUET, 2006).

As bactérias do solo (a maioria pertencente ao gênero *Bacillus*) liberam o γ -PGA para sequestrar íons metálicos tóxicos, aumentando dessa maneira sua viabilidade em ambientes adversos (MCLEAN et al., 1990). No *B. anthracis*, a virulência está correlacionada com a presença de cápsula formada unicamente por γ -PGA (TOMCSIK; SZONGOTT, 1933 apud CANDELA; FOUET, 2006). O *Staphylococcus epidermis*, que causa severa infecção após penetrar a epiderme do corpo humano, também sintetiza γ -PGA, que permite que essa bactéria escape de fagocitose (KOCIANOVA et al., 2005).

2.2.2 O mecanismo da síntese e degradação

A síntese do γ -PGA é um processo associado à membrana celular e utiliza o ácido glutâmico e o ATP como substratos. Esquemáticamente, a reação pode ser dividida em duas etapas: a síntese propriamente dita do γ -PGA e o seu transporte através da membrana celular (CANDELA; FOUET, 2006). Uma representação esquemática da biosíntese do γ -PGA é mostrada na Figura 2.3, sugerindo que o γ -PGA é sintetizado por um complexo associado à membrana e posteriormente é transportado para o meio extracelular podendo permanecer associado à membrana (Figura 2.3a) ou ser liberado para o meio extracelular (Figura 2.3b).

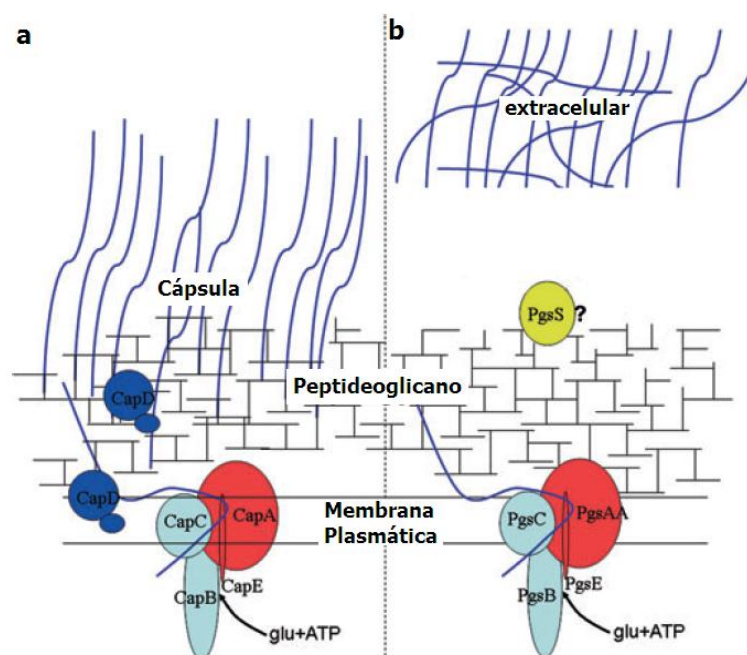


Figura 2.3 Representação esquemática da biosíntese de γ -PGA. **(a)** O complexo enzimático Cap é responsável pela síntese do γ -PGA ancorado a membrana celular, como ocorre no caso do *B. anthracis*. **(b)** O complexo enzimático Pgs é responsável pela síntese do γ -PGA que é liberado extracelularmente, como ocorre no caso do *B. subtilis* e do *B. licheniformis*.

FONTE: Adaptado de Candela e Fouet (2006)

Se o polímero está associado à superfície da bactéria e forma uma cápsula, o complexo enzimático correspondente é denominado Cap (cápsula), enquanto que é denominado de Pgs (poliglutamato-sintetase) se o γ -PGA é liberado. CapB/PgsB e CapC/PgsC estão diretamente envolvidos na síntese, enquanto CapA/PgsA e CapE/PgsE são requeridos para o transporte. No *B. anthracis* e provavelmente no *B. epidermis*, o γ -PGA encontra-se associado ao peptidoglicano via CapD localizado na membrana ou na camada de peptidoglicano. No *B. subtilis* e no *B. licheniformis*, o γ -PGA encontra-se no meio extracelular, sendo a liberação do polímero provavelmente facilitada pelo PgsS (CANDELA; FOUET, 2006).

Os monômeros de ácido glutâmico incorporados ao γ -PGA podem estar presentes no meio ou podem ser sintetizados pelo microrganismo a partir de precursores derivados do ciclo do ácido cítrico, conforme esquema apresentado na

Figura 2.4 (BUESCHER; MARGARITIS, 2007; SHIH; VAN, 2001). O ácido cítrico e o ácido L-glutâmico são metabolizados até γ -PGA por duas vias diferentes que podem conduzir a um mesmo monômero comum (CROMWICK; GROSS, 1995).

O complexo PgsBCA foi descrito em detalhes por Ashiuchi et al. (2004; 2001a). Inicialmente o ácido glutâmico se liga à molécula de ATP, que é convertida a ADP fornecendo energia para a polimerização. O complexo PgsBCA age como uma amidase, sendo que as subunidades PgsB e PgsC formam juntas um sítio catalítico e a subunidade PgsA remove a cadeia do sítio ativo e permite que um novo monômero seja adicionado. Segundo Ashiuchi et al. (2004), a presença do cátion Mg^{2+} é essencial para a atividade do complexo PgsBCA e a presença de Zn^{2+} aumenta ainda mais essa atividade; Fe^{2+} e Ca^{2+} são inibidores do complexo e Mn^{2+} aparentemente não exerce influência.

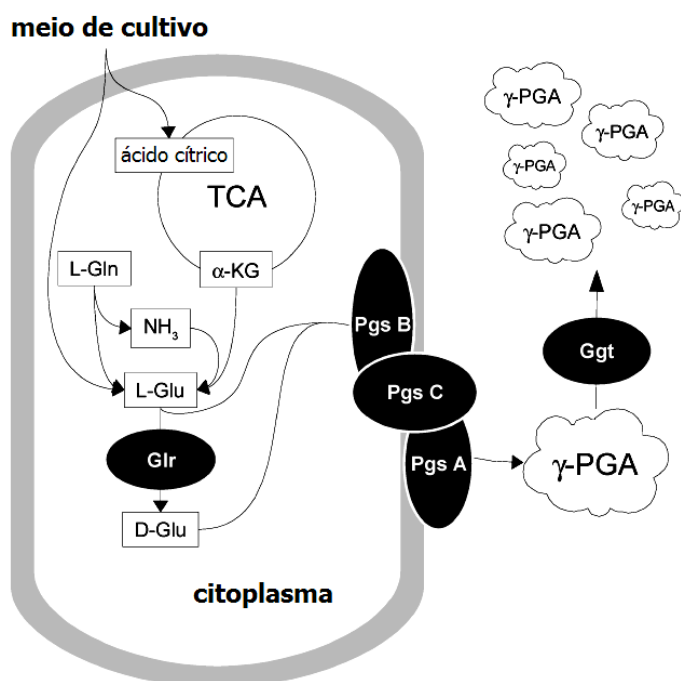


Figura 2.4 Via proposta para a síntese do γ -PGA em *Bacilli*

Na figura, TCA é o ciclo do ácido cítrico, α -KG é o α -cetoglutarato, L-Gln é L-glutamina, D-Glu é o ácido D-glutâmico, L-Glu é o ácido L-glutâmico, Glr é a glutamato-isomerase, Pgs é o complexo poliglutamato-sintetase e Ggt é a γ -glutamil endopeptidase (ou CapD).

FONTE: Adaptado de Buescher e Margaritis (2007)

De acordo com Ashiuchi et al. (2004), o complexo PgsBCA utiliza indistintamente ácido D-glutâmico e ácido L-glutâmico como substrato, com uma ligeira preferência para o primeiro. Em *B. subtilis*, duas glutamato-isomerases foram descritas: RacE (também chamada de Glr) e a YrpC, de acordo com Kada et al. (2004). Segundo Candela e Fouet (2006), cátions divalentes podem influenciar a razão entre os ácidos D- e L-glutâmico no γ -PGA. Em *B. licheniformis*, Mn^{2+} , Co^{2+} e Zn^{2+} são os cátions que podem influenciar na proporção entre os ácidos D- e L-glutâmico (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958).

Segundo Buescher e Margaritis (2007), existem duas enzimas que são capazes de degradar o γ -PGA (depolimerases) em *Bacillus*, a endo- γ -glutamil-peptidase e a exo- γ -glutamil-peptidase. As endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia, entre as regiões N- e C-terminal enquanto as exopeptidases atuam somente nos finais das cadeias, liberando um único resíduo de aminoácido ou duas ou três unidades.

Uma endo- γ -glutamil-peptidase secretada no meio pelo *B. subtilis* e pelo *B. licheniformis* é capaz de clivar moléculas de γ -PGA de massa molecular elevada em fragmentos menores (KING; BLACKER; BUGG, 2000; GOTO; KUNIOKA, 1992). No *B. anthracis*, a exo- γ -glutamil-peptidase (Ggt) é requerida para fixar covalentemente a cápsula de γ -PGA ao peptidoglicano na superfície da célula (Candela e Fouet, 2005). Linhagens de *B. subtilis* deficientes nesta exo-peptidase são incapazes de clivar o γ -PGA em fragmentos menores do que 10^5 Da ou esporular (KIMURA et al., 2004)

Tanto o *B. anthracis* quanto o *B. subtilis* degradam suas moléculas de γ -PGA, porém através de diferentes enzimas. No *B. anthracis*, o γ -PGA é degradado em fragmentos de 2-14 kDa, através da depolimerase CapD (MAKINO et al., 2002), uma endopeptidase. No *B. subtilis*, o γ -PGA é degradado durante a fase estacionária por uma Ggt, uma exopeptidase que possui uma potente atividade hidrolítica (γ -glutamil-

hidrolase) (KIMURA et al., 2004). Segundo Hirofuji (2004 apud Buescher e Margaritis, 2007), a ação das enzimas degradadoras do γ -PGA pode ser suprimida pela retirada de glicose do meio, seguida pelo fornecimento de baixos níveis de glicose.

O γ -PGA também pode ser degradado por exposição prolongada a valores extremos de pH, altas temperaturas e ultrassom. Em temperaturas inferiores a 60 °C, o polímero é estável (OPPERMANN-SANIO; STEINBÜCHEL, 2002).

2.2.3 Aspectos genéticos

Segundo Candela e Fouet (2006), somente um pequeno número de bactérias, principalmente representantes do gênero *Bacillus* (*B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. anthracis*) possui os genes requeridos para a síntese do γ -PGA. Na Figura 2.5, é possível observar a representação dos genes que codificam o complexo responsável pela síntese do γ -PGA e que codificam a enzima envolvida na degradação do polímero, em *B. anthracis* e em *B. subtilis*.

No *B. anthracis*, os genes *capBCA* são responsáveis pela formação da cápsula e pela síntese do γ -PGA e são carregados pelo plasmídeo pXO2 (MAKINO et al., 1989; GREEN et al., 1985). Em contraste, no *B. subtilis* TAM-4, no *B. subtilis* Natto ou no *B. subtilis* IFO 3336 os genes *pgsBCA* responsáveis pela codificação genética para a formação do γ -PGA estão presente no DNA cromossômico (ASHIUSHI; MISONO, 2002; ASHIUSHI; SODA; MISONO, 1999). No caso do *B. subtilis*, a expressão de todos os genes *pgs* (*pgaB*, *pgaC* e *pgaA*) é essencial para a síntese do γ -PGA, assim como a expressão dos genes *cap* (*capB*, *capC* e *capA*) é necessária para a formação do γ -PGA no *B. anthracis*.

Embora, no *B. anthracis* os genes estejam codificados num plasmídeo e no caso do *B. subtilis*, no DNA do microrganismo; os genes *pgsBCA* e *capBCA* são

homólogos. Sendo que essa homologia não está relacionada apenas a seqüência gênica, mas também a forma como os genes estão arranjados (BUESCHER; MARGARITIS, 2007; ASHUIISHI; MISONO, 2002).

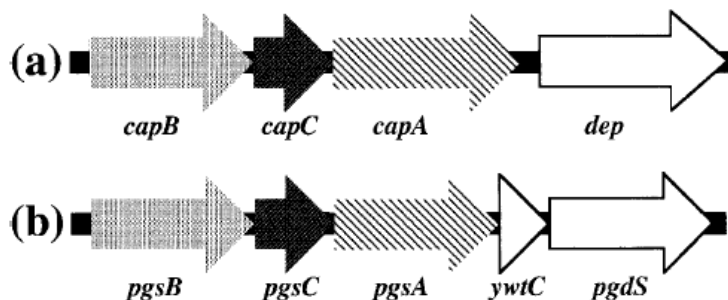


Figura 2.5 Representação dos genes que codificam o complexo responsável pela síntese e degradação do γ -PGA. **(a)** plasmídeo pOX2 envolvido no metabolismo capsular do *B. anthracis*: genes *capB*, *capC* e *capA* codificam respectivamente as componentes CapB, CapC e CapA do complexo envolvido na síntese do γ -PGA; gene *dep* codifica a γ -PGA-depolimerase.

(b) cromossomo do *B. subtilis* envolvido no metabolismo do γ -PGA: genes *pgsB*, *pgsC* e *pgsA* codificam respectivamente as componentes PgsB, PgsC e PgsA do complexo envolvido na síntese do γ -PGA; gene *pgdS* codifica a γ -PGA-depolimerase; gene *ywtC* com funcionalidade não definida (provavelmente codifica um pequena proteína para um sistema de atenuação do gene *PgdS*).

FONTE: Adaptado de Ashuishi e Misono (2002).

Os genes *dep* e *pgdS* são responsáveis pela degradação do γ -PGA, codificando depolimerases respectivamente no *B. anthracis* e no *B. subtilis*. Ambos os genes localizam-se à jusante (*downstream*) dos genes que codificam a síntese do γ -PGA. O gene *ywtC* não tem função identificada, mas provavelmente seja responsável pela codificação de uma proteína envolvida na atenuação do gene *PgdS* (ASHIUSHI; MISONO, 2002).

2.3 Bioprocessos para obtenção de γ -PGA

Conforme descrito anteriormente, várias espécies de *Bacillus* são capazes de produzir γ -PGA como um material viscoso extracelular ou como um componente capsular. Estas linhagens são muito úteis em termos de aplicações industriais e têm sido intensivamente estudadas (SHIH; VAN, 2001).

As linhagens de *B. subtilis* e o *B. licheniformis* são aquelas para as quais existe um maior número de trabalhos publicados em literatura. Nestes trabalhos, o microrganismo utilizado foi isolado do solo ou de produtos alimentícios fermentados, onde o γ -PGA é um dos principais componentes (SOLIMAN; BEREKAA; ABDEL-FATTAH, 2005; XU et al., 2005; ASHIUCHI et al., 2001a; YOKOI et al., 1995). Alguns pesquisadores buscam linhagens reconhecidamente produtoras de γ -PGA no acervo de coleções internacionais (SHIH; VAN; CHANG, 2002; YOON et al., 2000; CROMWICK; GROSS, 1995; BIRRER; CROMWICK; GROSS, 1994) ou ainda desenvolvem linhagens via clonagem dos genes responsáveis pela síntese do γ -PGA (JIANG et al., 2006; ASHUICHI; SODA; MISONO, 1999).

Em alguns estudos, o principal objetivo é demonstrar a capacidade de uma determinada linhagem em produzir o γ -PGA e/ou caracterizar o polímero produzido. Em outros trabalhos, os pesquisadores têm buscado investigar quais os parâmetros nutricionais e de processo que mais influenciam na produção do γ -PGA, de forma a buscar estratégias para aumentar o rendimento dos cultivos. Alguns trabalhos realizam essa investigação fazendo uso de uma abordagem estatística um pouco mais elaborada, como os trabalhos de Soliman, Berekaa e Abdel-Fattah (2005), Chen et al. (2005b) e Shih, Van e Chang (2002). Estes autores empregam técnicas sistemáticas de planejamento experimental e avaliação estatística dos resultados como estratégias para a definição de parâmetros significativos e para a otimização de meios de cultivo e condições de processo.

O planejamento experimental baseado nos fundamentos estatísticos é uma ferramenta poderosa para se chegar às condições otimizadas de um processo, desenvolver um produto dentro das especificações ou simplesmente avaliar os efeitos ou impactos que os fatores têm sobre as respostas desejadas (RODRIGUES; IEMMA, 2005).

2.3.1 Produção de γ -PGA em cultivo submerso

Grande parte dos estudos referentes à produção de γ -PGA são realizados em cultivo submerso. Na Tabela 2.1 é apresentada uma amostragem de trabalhos envolvendo o desenvolvimento de processos para a obtenção de γ -PGA em cultivos deste tipo. No caso de cultivo submerso, o meio frequentemente utilizado para o crescimento de *Bacillus* sp e para a produção de γ -PGA é o Caldo E, desenvolvido por Leonard e colaboradores (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958). A composição do Caldo E compreende: ácido L-glutâmico (20 g/l), ácido cítrico (12 g/l), glicerol (80 g/l), NH_4Cl (7 g/l), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/l), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,04 g/l), K_2HPO_4 (0,5 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,15 g/l) e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,04 g/l). A concentração de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ pode sofrer ligeiras variações de acordo com o estudo realizado.

Cromwick e Gross (1995) realizaram estudo avaliando o impacto da concentração de Mn^{2+} adicionado ao Caldo E, no cultivo de *B. licheniformis*. Os autores evidenciaram a influência do cátion Mn^{2+} na produção e na massa molecular do γ -PGA, na viabilidade celular e no consumo de ácido glutâmico, ácido cítrico e glicerol. De acordo com este trabalho, uma produção de γ -PGA superior a 17 g/L pode ser obtida se a concentração de MnSO_4 oscilar entre 6,15 e 61,5 μM (aproximadamente entre 0,001 e 0,01 g/L de MnSO_4), enquanto que as células têm maior viabilidade quando o cultivo contém entre 615 e 33,8 μM (aproximadamente entre 0,005 e 0,1 g/L) de MnSO_4 . Os autores observaram que as maiores produções de γ -PGA ocorreram justamente em concentrações de MnSO_4 próximas do mínimo

valor requerido para a manutenção celular, deste modo, sugeriram que o Mn^{2+} seria um nutriente limitante que promoveria uma condição de estresse, necessário para uma elevada produção de γ -PGA.

A presença de glicerol, ácido cítrico e ácido L-glutâmico no meio de cultivo é favorável ao crescimento do *B. licheniformis* CCRC 12826 e à produção de γ -PGA, apresentando efeito sinérgico na produção do polímero (DU et al., 2005; SHIH; VAN; CHANG, 2002; SHIH et al., 2001). Isso ocorre porque o ácido cítrico e o ácido glutâmico são precursores do γ -PGA (CROMWICK; GROSS, 1995) enquanto o glicerol age como um co-substrato (DU et al., 2005).

A adição de glicerol ao meio de cultivo também resulta num aumento da composição celular de ácidos graxos insaturados e na diminuição da concentração de ácidos graxos saturados, provocando um aumento da permeabilidade da membrana celular, propiciando uma maior liberação de γ -PGA para o meio extracelular. Esse efeito foi pronunciado para o *B. licheniformis* VBL-3, no entanto bem menos expressivo para o *B. subtilis* CGMCC 0833 (WU et al., 2008; DU et al., 2005). Segundo Wu et al. (2008), essa diferença é atribuída à diversidade das linhagens utilizadas. No mesmo trabalho, os autores obtiveram maiores produções de γ -PGA quando tensoativos (Tween 80 e DMSO) foram adicionados ao meio, ao invés de glicerol.

Shih, Van e Chang (2002), utilizando como base o Caldo E, variaram a concentração de ácido L-glutâmico, glicerol, ácido cítrico e pH inicial, demonstrando que apenas os três primeiros fatores eram significativos. Os autores chegaram a um meio otimizado, no qual foi possível obter uma produção de 19,8 g/L de γ -PGA ao final de 96 horas de cultivo em *shaker* a 37 °C e 150 rpm.

Tabela 2.1 Produção de γ -PGA em cultivo submerso

Microrganismo Linhagem	Origem do Microrganismo	Constituintes do Meio de Cultivo	Produção Máxima (g/L)*	Produtividade (g/L.h) [#]	Referência
<i>Bacillus subtilis</i> CGMCC 0833	Isolada de solo	Glicose, ácido glutâmico, (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄ , MnSO ₄ , K ₂ HPO ₄ e Tween 80 ou DMSO ^{&}	34,4	0,708	Wu et al. (2008)
<i>Escherichia coli</i> (geneticamente modificado)	Clonagem dos genes pgsBCA do <i>B. subtilis</i> subsp. chungkookjang	Caldo R/2 [¥] adicionado de ácido L-glutâmico glicose e IPTG [£]	3,74	0,107	Jiang et al. (2006)
<i>Bacillus licheniformis</i>	Isolado a partir de resíduos de um curtume	Meio similar ao Caldo E sem ácido L-glutâmico e com caseína, (NH ₄) ₂ SO ₄ e NH ₄ Cl	33,5	n.c.	Soliman, Berekaa e Abdel-Fattah (2005)
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3336	Institute for Fermentation, Osaka	Meio similar ao Caldo E, com 20 g/L de glicerol	23	0,767	Richard e Margaritis (2003a)
<i>Bacillus licheniformis</i> CCRC 12826	Culture Collection and Research Center - Taiwan	Caldo E modificado [*]	19,8	0,206	Shih, Van e Chang (2002)
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. chungkookjang	Isolado de pasta de soja fermentada	Sacarose, NaCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , MgSO ₄ , Na ₂ HPO ₄ e KH ₂ PO ₄	13,5	0,113	Ashuichi et al. (2001a)
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 9945A	American Type Culture Collection	Caldo E	17,6 ¹ 23,2 ² 35,0 ³	0,293 0,829 1,11	Yoon et al. (2000)
<i>Escherichia coli</i> (geneticamente modificado)	Clonagem dos genes pgsBCA do <i>B. subtilis</i> IFO 3336	ácido L-glutâmico, MgSO ₄ , MnSO ₄ , NaCl, vitaminas, antibióticos e IPTG [£]	0,024	0,0009	Ashuichi, Soda e Misono (1999)
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 9945A	American Type Culture Collection	Caldo E com concentrações variáveis de MnSO ₄	18	0,15	Cromwick e Gross (1995)

* Produção Máxima: máximo valor obtido no cultivo do γ -PGA

[#] Produtividade (Pdd): calculada a partir dos valores referidos pelos autores da máxima produção de γ -PGA (P) e do tempo de cultivo para obtenção dessa produção (t), definida como $Pdd = P/t$ (SCHMIDELL et al., 2001)

[&] Tween 80 e DMSO: tensoativos

[¥] Caldo R/2: meio mineral (JIANG et al., 2006)

[£] IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

^{*} Meio otimizado a partir de planejamento experimental e avaliação estatística.

^{1,2,3} Cultivos realizados respectivamente em *shaker*; biorreator com agitação e aeração operando em batelada e biorreator com agitação e aeração operando em batelada alimentada.

n.c.: não calculado (os autores não informaram o tempo de cultivo para obtenção da produção de γ -PGA)

Em cultivo submerso, o meio de uma bactéria produtora de γ -PGA torna-se altamente viscoso à medida que aumenta a concentração do polímero, sendo a máxima viscosidade observada em condições de pH neutro (CROMWICK; BIRRER; GROSS, 1996). O aumento da viscosidade do meio provoca uma diminuição na transferência de oxigênio, limitando o crescimento celular e diminuindo a rendimento de γ -PGA (OGAWA et al., 1997). Segundo Yoon et al. (2000), não foi possível aumentar a concentração de γ -PGA no meio de cultivo para valores superiores a 35 g/L, em decorrência do aumento na viscosidade do meio de cultivo. Essa constatação foi feita mesmo sendo o experimento conduzido em um biorreator provido de agitador mecânico (1000 rpm) e aeração forçada. Os mesmos autores sugerem que outro tipo de biorreator, como um de membranas, seja utilizado como forma de superar o problema.

Para a aplicação comercial do γ -PGA, é necessário também estudar formas para melhorar a produtividade do processo em escala industrial. Yoon et al. (2000) demonstraram que é possível aumentar a produtividade de γ -PGA num cultivo de *B. licheniformis* ATCC 9945, operando em batelada alimentada. Os autores utilizaram um biorreator de 2,5 L, no qual foram colocados 950 mL de Caldo E (pH 6,5). As células foram cultivadas a 37 °C, pH 6,5, agitação de 1000 rpm, suprimento de 2 vvm de ar (40% de oxigênio dissolvido) ou oxigênio puro. Quando pulsos de 0,2 mL/min (1,44 g/h de ácido cítrico e 2,4 g/h de ácido L-glutâmico) foram adicionados após depleção do ácido cítrico, foram obtidas uma concentração máxima de 35 g/L de γ -PGA e uma produtividade de 1,11 g/L.h, valores sensivelmente superiores a operação do biorreator em batelada e ao cultivo em *skaker* (Tabela 2.1).

Existem relatos da produção industrial do γ -PGA que datam da década de 90 (SHIH; VAN, 2001). Segundo os autores, o γ -PGA era produzido em cultivo submerso pela companhia japonesa Meiji Seika Kaisha Co., utilizando o *B. subtilis* F-02-1. Este microrganismo foi isolado inicialmente de uma amostra de solo coletada na

Universidade de Osaka (KUBOTA et al., 1993) e era capaz de produzir 50 g/L de PGA em escala laboratorial, sob condições ótimas de cultivo. Em trabalho publicado, Tanaka et al. (1997) revelaram alguns detalhes do processo industrial empregado pela Meiji Seika Kaisha. O cultivo era conduzido por 6 dias a 37 °C e pH 7,5 e utilizava um volume de $5 \cdot 10^3 \text{ m}^3$ de meio, constituído por 10% de glicose, 8% de ácido L-glutâmico, 0,7% de peptona, 0,68% de uréia, 0,5% de NaNO_3 e 0,24% de KH_2PO_4 .

Outras companhias que produzem comercialmente o ácido γ -poliglutâmico são a Ajinomoto Co., a Nippon Poly-glu Co. e a Natto Biosciences, todas localizadas no continente asiático. A Ajinomoto Co., nitidamente com foco em alimentos para a saúde, oferece dois produtos funcionais a base de PGA e sais de cálcio (AJINOMOTO, 2006). A Nippon Poly-glu Co. comercializa produtos para tratamento de águas e suplementos funcionais a base de γ -PGA (NIPPON POLY-GLU, 2006). A Natto Biosciences produz o γ -PGA e derivados como insumos para fins variados, em aplicações que podem ser desenvolvidas em conjunto com o cliente (NATTO BIOSCIENCES, 2008).

2.3.2 Produção γ -PGA em cultivo de estado sólido

A limitação da produção do γ -PGA em decorrência do aumento de viscosidade dos meios de cultivo líquidos e também a busca de substratos de mais baixo custo, têm levado ao desenvolvimento de processos de cultivo em estado sólido (CES). No entanto, relatos sobre a produção de γ -PGA em CES são bem menos frequentes que aqueles em cultivo submerso, podendo ser citados os trabalhos de Oh et al. (2007), Xu, Chen e Yu (2005), Chen et al. (2005a), Chen et al. (2005b).

Oh et al. (2007) estudaram a produção de γ -PGA sobre o resíduo sólido gerado da obtenção do extrato aquoso de soja, conhecido popularmente como “leite de soja” (*soybean milk cake* – SMC). O SMC (74,1% de umidade) foi suplementado com

farinha de soja desengordurada e ácido glutâmico e foram testadas duas linhagens neste estudo, *B. subtilis* GT-D e *B. subtilis* KU-A. Os autores obtiveram uma produção de 62,4 g/kg (b.u.) de γ -PGA após 24 horas a 42 °C, utilizando o *B. subtilis* KU-A.

Xu, Chen e Yu (2005) avaliaram a utilização de diversos resíduos agroindustriais como substratos para a obtenção de γ -PGA em CES. Os autores obtiveram uma produção de 83,61 g/kg (b.s.) e uma produtividade de 1,99 g/kg.h, quando otimizaram um meio constituído de uma mistura de farinha de torta de soja e fibra de trigo numa proporção de 11:9, suplementada com ácido glutâmico, ácido cítrico e NH_4NO_3 . Neste trabalho, foi utilizada uma nova linhagem (*B. subtilis* CCTCC202048) isolada pelo grupo de pesquisadores a partir de amostras de solo, sendo o experimento conduzido de forma estática em frascos de 250 mL com 20 g de meio, a 40 °C por 42 h.

Cultivos de estado sólido (CES) de *B. subtilis* CCTCC202048, utilizando estrume animal como substrato foram empregados por Chen e colaboradores para a obtenção de γ -PGA. Em dois trabalhos, foi utilizado o planejamento experimental de forma a otimizar o meio de cultivo que foi constituído de resíduos agroindustriais, ácido cítrico, ácido glutâmico e MnSO_4 (CHEN et al., 2005a; 2005b).

O meio otimizado contendo estrume bovino, farelo de trigo, torta de soja e ácido glutâmico produziu em média 47,2 g de γ -PGA por kg de substrato, em base seca (1,12 g/kg.h) (CHEN et al., 2005a). Já para o meio otimizado no segundo trabalho (CHEN et al., 2005b), composto por estrume suíno, torta de soja, farelo de trigo, ácido glutâmico, ácido cítrico e MnSO_4 , foi possível obter uma produção média de γ -PGA de 60 g/kg substrato, b.s. (1,25 g/kg.h). Em Chen et al. (2005b), os parâmetros de processo também foram otimizados, obtendo-se como condições ótimas uma quantidade de substrato de 15 g, 60% de umidade do meio de cultivo, pH inicial 9,0, 4% de inóculo; 48 h de cultivo e 37 °C.

O cultivo de estado sólido é frequentemente mais simples e necessita de menores requisitos energéticos do que o cultivo submerso, principalmente porque o volume de cultivo é geralmente menor, reduzindo o tamanho do reator e conseqüentemente da unidade de purificação. No entanto, há desvantagens neste tipo de cultivo, como dificuldades de transporte de massa e de calor através do meio, sobretudo em reatores de grande porte. Além disso, a carência de sensores e de técnicas eficientes específicas para o CES torna complicado o controle do processo, principalmente em operações contínuas (RAGHAVARAO; RANGANATHAN; KARANTH, 2003).

2.4 Recuperação e quantificação do γ -PGA

Uma vez que a maioria dos *Bacillus* produz o γ -PGA extracelularmente, a purificação deste polímero pode ser considerada relativamente simples (SHIH; VAN, 2001). Segundo Buescher e Margaitis (2007), existem basicamente três diferentes abordagens para a recuperação do γ -PGA a partir do meio de cultivo: precipitação através da formação de um complexo, precipitação através da redução da atividade de água e separação por diferença de tamanho (filtração). Segundo os mesmos autores, em todos os casos, é preciso previamente remover as células por centrifugação ou filtração através de membranas de 0,45 μm .

A precipitação do γ -PGA através da redução da atividade de água é conseguida mais comumente através da adição de etanol ou de outro álcool como metanol ou 1-propanol (SHIH; VAN, 2001), seguindo de modo geral o procedimento proposto por Goto e Kunioka (1992). Este procedimento consiste em adicionar uma quantidade suficiente de álcool de forma a provocar a precipitação do γ -PGA, que é separado por centrifugação, sendo o precipitado re-dissolvido em água destilada.

Segundo Buescher e Margaritis (2007), o método de precipitação com álcool é pouco seletivo, uma vez que proteínas e polissacarídeos podem ser precipitados juntamente com o γ -PGA. Deste modo, o precipitado re-dissolvido em água destilada deve ser submetido a análises posteriores para quantificação ou caracterização do polímero, sendo realizadas geralmente através de cromatografia de camada delgada (TLC), cromatografia de permeação em gel (GPC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Originalmente, a concentração de γ -PGA era determinada a partir da hidrólise do polímero em presença de HCl sob altas temperaturas, seguida da medida da concentração de ácido glutâmico via HPLC (BUESCHER; MARGARITIS, 2007). Ultimamente, alguns autores têm utilizado a determinação direta do γ -PGA sem a necessidade de hidrólise, a partir do uso de colunas cromatográficas específicas para polímeros de elevada massa molecular, como as utilizadas por Chen et al. (2005a), Xu, Chen e Yu (2005) e Do, Chang e Lee (2001).

Park et al. (2005a) utilizaram um método que é a combinação da medida da concentração em ácido glutâmico após a hidrólise e a quantificação do grupo amino livre do γ -PGA. A partir do conhecimento desses valores é possível estimar a massa molecular média do polímero e a sua concentração.

Do, Chang e Lee (2001) propuseram uma estratégia para melhorar a separação e a recuperação do γ -PGA a partir de caldos de cultivo altamente viscosos. Segundo os autores, o γ -PGA secretado pelas células forma cápsulas durante o cultivo e é excretado no meio de cultivo, tornando o meio altamente viscoso. Além disso, as células envoltas em γ -PGA possuem cargas negativas em pH neutro por causa da ionização dos grupos carboxil da molécula.

A alta viscosidade do meio e a alta estabilidade das células representam os maiores problemas na separação da biomassa e do γ -PGA a partir do meio de cultura. Entretanto, é possível reduzir a estabilidade das células e a viscosidade do meio para uma eficiente separação do γ -PGA. Além da utilização da ultrafiltração, Do, Chang e Lee (2001) propõem a redução do valor de pH para valores próximos a 3, de forma a diminuir a viscosidade do meio e a carga das células e, conseqüentemente tornar mais fácil a separação da biomassa a partir do caldo de cultivo.

Como mencionado, o γ -PGA também pode ser recuperado a partir do meio de cultivo (livre de células) através da formação de complexo e posterior precipitação e separação por centrifugação. O γ -PGA pode formar complexos com Cu^{2+} , Al^{3+} , Cr^{3+} e Fe^{3+} , sendo o Cu^{2+} mais eficiente. Após formação e separação do complexo, o precipitado pode ser re-dissolvido com a adição de HCl 1,5 M (BOVARNICK, 1942; MCLEAN et al., 1990).

Kanno e Takamatsu (1995) propuseram um método alternativo para a quantificação de γ -PGA em Natto, que também foi utilizado por Kada et al. (2004) para a quantificação do polímero produzido em cultivo submerso por *B. subtilis*. A metodologia consiste basicamente de três etapas. Na primeira etapa, é adicionada uma solução de ácido tricloroacético aos grãos de soja fermentada (Natto) ou ao caldo de cultivo, sendo a mistura agitada por 30 min a 50 °C para extração do γ -PGA e para a precipitação de células microbianas e proteínas em pH 3,0. A seguir, os grãos são separados (no caso do Natto) e o restante do extrato é submetido a centrifugação. Na segunda etapa, o sobrenadante da centrifugação tem o pH ajustado a 7,0 e são realizadas duas precipitações sucessivas com etanol absoluto, sendo o precipitado separado por centrifugação. Na última etapa, o precipitado é suspenso em solução tampão pH 7,0, sendo o γ -PGA, contido na solução, submetido a reação de complexação com Brometo de Cetiltrimetilamônio (CET). O complexo formado provoca uma turvação do meio, que é proporcional à concentração de

γ -PGA presente, sendo possível a quantificação desse composto via espectrofotometria a 400nm, mediante utilização de um padrão analítico (KANNO; TAKAMATSU, 1995).

2.5 Transferência de oxigênio em cultivo submerso para produção de biopolímeros

Em qualquer mistura onde ocorra um gradiente de concentração de uma espécie química haverá potencial motriz para a transferência de massa dessa espécie. Em particular, em bioprocessos há variáveis situações onde as concentrações dos componentes não são uniformes ocasionando a transferência de massa das regiões de alta concentração para outras onde a concentração é menor. Um exemplo importante deste tipo de transporte é a transferência de oxigênio que ocorre em cultivos aeróbios (DORAN, 1995).

Em processos aeróbios, o dimensionamento adequado do sistema de aeração e agitação interfere no transporte do oxigênio da fase gasosa para a fase líquida e condiciona a proliferação de biomassa microbiana e a obtenção de elevadas concentrações de produto (SHMIDELL et al.,2001). Em cultivos para a obtenção de biopolímeros, o caldo de cultura tende a tornar-se mais viscoso a medida que o cultivo evolui, de modo que uma diminuição na transferência de massa pode conduzir a limitação no suprimento de oxigênio (CROMWICK; BIRRER; GROSS, 1996).

2.5.1 Respiração microbiana e transferência de oxigênio

Do ponto de vista bioquímico, o oxigênio é o último acceptor de elétrons, ao final da cadeia respiratória, sendo então reduzido à água, permitindo a reoxidação das coenzimas das reações de desidrogenação ao longo da glicólise e do ciclo do

ácido cítrico, além de permitir o armazenamento de energia na forma de ATP (SHIMIDELL, et al. 2001). Deste modo, o oxigênio exerce papel importante na proliferação da biomassa microbiana e conseqüentemente na geração de produtos.

A taxa na qual o oxigênio é consumido pelas células microbianas determina a taxa na qual esse gás deve ser transferido ao sistema. Muitos fatores influenciam a demanda de oxigênio pelo meio de cultivo; sendo os mais importantes a espécie e a fase de crescimento do microrganismo e a natureza da fonte de carbono no meio. No meio de cultura, a taxa de consumo de oxigênio também varia com o tempo em decorrência da variação na concentração de células e da variação da velocidade específica de consumo de oxigênio. Tipicamente a demanda específica de oxigênio passa por um período máximo no início fase exponencial (RICHARD; MARGARITIS, 2003b; DORAN, 1995).

Conforme descrito por vários autores, a velocidade específica de consumo de oxigênio ou velocidade específica de respiração, Q_{O_2} , pode ser definida como:

$$Q_{O_2} = \frac{1}{X} OUR$$

Equação 2.1

onde X (g/m^3) é a concentração de biomassa e OUR ($g/m^3.h$) é a taxa global de consumo de oxigênio (*oxygen uptake rate*).

Para a manutenção da atividade metabólica em cultivos aeróbios, é necessário o transporte de oxigênio a partir da fase gasosa para o líquido e do oxigênio dissolvido no líquido para as células onde será consumido. As moléculas de oxigênio devem superar, portanto, uma série de resistências de transporte antes de serem utilizadas pelas células. A importância relativa das diferentes resistências à transferência de massa depende da composição e propriedades reológicas do meio de cultivo, da intensidade de mistura, do tamanho das bolhas de gás, do tamanho dos

aglomerados de células e de características de adsorção interfacial entre outros fatores (SHMIDELL et al., 2001; DORAN, 1995).

Quando as células se encontram dispersas num caldo de cultivo bem misturado, a maior resistência a transferência de oxigênio é representada pelo filme líquido ao redor das bolhas de gás. Este filme torna-se a resistência limitante do processo e controla a taxa de transferência de massa global (DORAN, 1995).

A teoria das películas estagnadas é uma das teorias mais utilizadas para o equacionamento da transferência de oxigênio entre as fases gasosa e líquida (DOBLE; KRUTHIVENTI; GAIKAR, 2004; SHMIDELL et al., 2001). De acordo com essa teoria, em uma bolha de ar suspensa num meio líquido existirá uma película gasosa estagnada entre o seio gasoso e a interface gás-líquido na bolha e da mesma forma haverá uma película de líquido estagnada ao redor da bolha. O transporte de massa através dessas películas é difusional e segue a Lei de Fick, existindo dois coeficientes de transferência de massa associados, k_g (coeficiente de transferência da película gasosa) e k_l (coeficiente de transferência da película líquida).

De acordo com a teoria das películas estagnadas, a resistência da interface gás-líquido a transferência de massa é assumida como desprezível. Segundo Doble, Kruthiventi e Gaikar (2004), essa consideração é um pouco limitada quando se consideram caldos de cultivo com proteínas ou outros compostos tensoativos. Nestes casos, a resistência interfacial pode ser significativa e comparável a resistência da película, fazendo o coeficiente de transferência de massa ser dependente da composição do meio de cultivo. De fato, segundo Shmidell et al. (2001), não há condições de se conhecer os valores relativos a interface gás-líquido, podendo-se determinar apenas as concentrações no seio do gás e do líquido. Assim pode-se trabalhar com um coeficiente global de transferência de oxigênio, considerando ainda desprezível a resistência devido a película gasosa. Assim, a taxa volumétrica de

transferência de oxigênio, OTR (*oxygen transport rate*) ($\text{g/m}^3\cdot\text{h}$), pode ser determinada pela

$$OTR = k_L a (C_s - C) \quad \text{Equação 2.2}$$

onde $k_L a$ é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio, C_s (g/m^3) é a concentração do oxigênio dissolvido no líquido em equilíbrio com a fase gasosa (solubilidade do oxigênio no caldo de cultivo) e C (g/m^3) é a concentração de oxigênio no seio do líquido.

De acordo com Bandaipheth e Prasertsan (2006), a taxa de transferência de oxigênio pode ser afetada pela geometria e por demais características dos vasos, pelas propriedades do caldo de cultivo (viscosidade, tensão superficial, etc.), pela energia dissipada pelo fluido, pelas propriedades de biocatálise, pela concentração e morfologia dos microrganismos. De acordo com os mesmos autores, a taxa de consumo de oxigênio também pode ser limitada pela viscosidade do meio de cultivo.

Durante o cultivo, ocorre a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida, enquanto que, os microrganismos consomem o oxigênio suprido pelo sistema. O balanço entre o oxigênio transferido (OTR) e o oxigênio consumido (OUR) pode ser equacionado a partir das Equações 2.1 e 2.2, conforme segue:

$$\frac{dC}{dt} = OTR - OUR = k_L a (C_s - C) - Q_{O_2} X \quad \text{Equação 2.3}$$

No estado estacionário, a taxa de transferência de oxigênio a partir das bolhas de gás deve ser igual a taxa de consumo de oxigênio pelas células, assim, obtém-se:

$$k_L a (C_s - C) = Q_{O_2} X \quad \text{Equação 2.4}$$

O k_{La} é um parâmetro utilizado para comparar a capacidade de transferência de oxigênio em biorreatores ou num mesmo biorreator com diferentes dispositivos de mistura. Se o k_{La} para um determinado sistema é pequeno, a capacidade do reator para fornecer oxigênio às células é limitada. O k_{La} também pode ser utilizado com um critério para o escalonamento de processos (BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006; DORAN, 1995)

2.5.2 Aeração e agitação em cultivo submerso para produção de biopolímeros

Existem diversas maneiras de transferir oxigênio para os meios de cultivo, sendo que aquela que combina um sistema de aeração com um sistema de agitação a opção mais utilizada industrialmente. O biorreator do tipo tanque agitado padrão apresenta altura de líquido igual ao diâmetro do tanque, sendo agitado por um impelidor tipo turbina com 6 pás planas, apresentando um diâmetro igual a 1/3 do diâmetro do tanque (SCHMIDELL et al., 2001). Neste tipo de reator, o oxigênio é suprido ao meio através de um aerador que dispersa bolhas de ar sob o impelidor. A ação do impelidor provoca a dispersão do gás através do vaso (DORAN, 1995).

Segundo Oldshue (1997), a mistura do fluido é de fundamental importância em bioprocessos, sendo que em cultivos aeróbios essa é uma operação crítica, pois dela depende em grande parte a transferência de oxigênio. Para Richard e Margaritis (2002), a agitação e a aeração são fatores importantes em processos aeróbios e têm um efeito ainda mais relevante em bioprocessos que envolvem a produção de biopolímeros.

Quando o ar é disperso através do meio líquido, diferentes padrões de fluxo das bolhas de ar podem ocorrer. Se a velocidade do agitador é baixa e a taxa de alimentação do ar é alta, o gás envolve o impelidor sem ocorrer a dispersão das bolhas, formando um fluxo de ar ao longo do eixo do agitador. À medida que a

velocidade do impelidor aumenta, o gás é capturado sob as pás do agitador e é disperso adequadamente através do meio líquido. Em condições típicas de operação, o aumento da velocidade de agitação eleva o valor do k_La . Por outro lado, exceto para taxas de aeração muito baixas, o aumento do fluxo de gás exerce menor influência sobre o k_La (DORAN, 1995).

Segundo Richard e Margaritis (2002), em sistemas não-newtonianos pseudoplásticos, como nos cultivos para a produção de biopolímeros, a agitação é mais significativa para a transferência de oxigênio do que a aeração. Isso ocorre pois em fluidos pseudoplásticos, o aumento da velocidade de agitação (aumento da tensão de cisalhamento) contribui para a redução da viscosidade aparente do meio.

2.5.3 Determinação do k_La e Q_{O_2}

Existem muitos métodos para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) que são descritos na literatura. O método dinâmico é o mais amplamente utilizado tanto para medir o k_La quanto o Q_{O_2} (BORGES et al., 2008; BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006; RICHARD; MARGARITIS, 2003b)

O método dinâmico está baseado no balanço de massa para o oxigênio em estado transiente (Equação 2.3). Neste método um sensor de oxigênio dissolvido é empregado de forma a monitorar a variação na concentração do oxigênio durante o procedimento de medida. Um gráfico representativo da variação da concentração de oxigênio dissolvido durante o método dinâmico é mostrado na Figura 2.6.

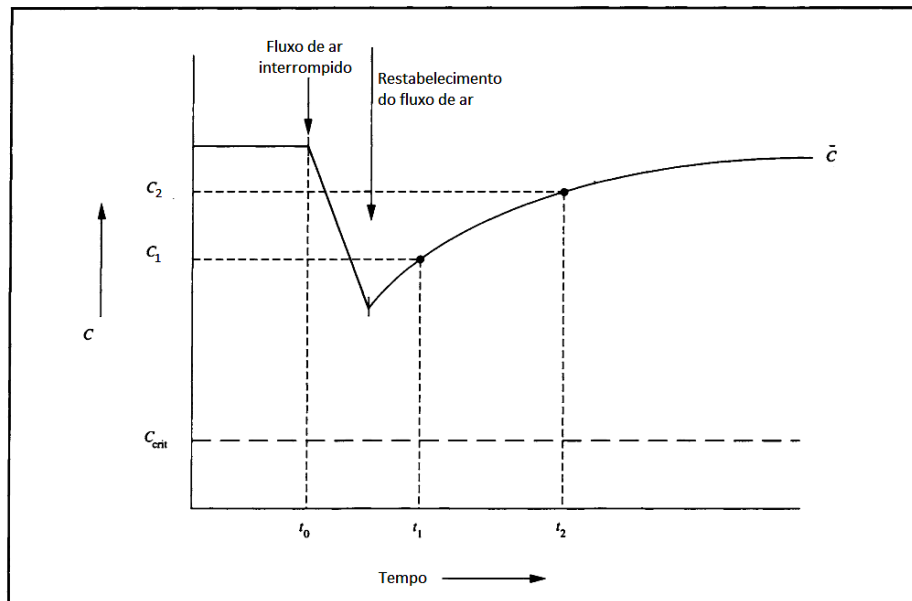


Figura 2.6 Variação da concentração de oxigênio dissolvido durante a medida de k_{La} e Q_{O_2} pelo método dinâmico.

FONTE: Adaptado de Doran (1995).

Para a determinação taxa de oxigênio consumido (OUR), o fluxo de ar é interrompido ($OTR=0$) fazendo com que o oxigênio dissolvido (OD) decaia nesse período, sendo essa variação igual a OUR , conforme a Equação 2.3, e determinada pela inclinação no gráfico $OD \times$ tempo. A taxa específica de consumo de oxigênio Q_{O_2} é calculada através da Equação 2.1, conhecendo-se a concentração da biomassa microbiana neste momento (BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006; DORAN, 1995). Schmidell et al. (2001) recomenda que além de se interromper o fluxo de oxigênio também se reduza a frequência de agitação, a fim de reduzir ao máximo a transferência de oxigênio durante a medida.

Para a determinação da taxa de transferência de oxigênio (OTR) e do coeficiente volumétrico de transferência (k_{La}), o fluxo de ar é restabelecido, causando o aumento na concentração do oxigênio dissolvido. Nessa etapa de re-oxigenação, o sistema está em estado transiente e segue a Equação 2.3. No entanto,

quando a concentração de oxigênio dissolvido alcança novamente o valor estacionário de \bar{C} (Figura 2.6), considera-se que a concentração de oxigênio dissolvido não varia com o tempo (pelo menos num breve espaço de tempo), assim $dC/dt = 0$ e a Equação 2.3 converte-se na Equação 2.4. Substituindo-se a Equação 2.4 na Equação 2.3, obtém-se a Equação 2.5 (SHIMIDELL et al., 2001; DORAN, 1995).

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (\bar{C} - C) \quad \text{Equação 2.5}$$

Assumindo que $k_L a$ é constante com o tempo, a Equação 2.5 é integrada entre os intervalos de tempo t_1 e t_2 , resultando na Equação 2.6, que pode ser utilizada para estimar o $k_L a$ mediante gráfico representado pela Figura 2.7 (DORAN, 1995). O valor de $k_L a$ será tanto mais acurado quantos mais intervalos ($t_2 - t_1$) forem considerados.

$$k_L a = \frac{\ln\left(\frac{\bar{C} - C_1}{\bar{C} - C_2}\right)}{t_2 - t_1} \quad \text{Equação 2.6}$$

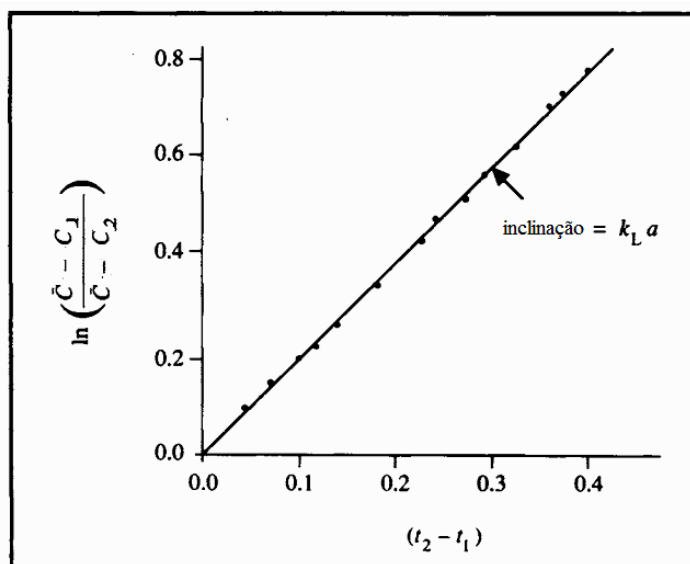


Figura 2.7 Determinação do $k_L a$ pelo método dinâmico.
 FONTE: Adaptado de Doran (1995).

Capítulo 3

Metodologia

A etapa experimental deste trabalho foi realizada principalmente no Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Todas as metodologias empregadas foram fundamentadas na pesquisa bibliográfica das bases referenciais internacionais.

3.1 Microrganismos

3.1.1 Coleção de culturas de isolados da região amazônica

As linhagens utilizadas neste trabalho integram as coleções de microrganismos do Laboratório de Biotecnologia do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Uma coleção de 87 linhagens oriundas de ambiente amazônico (solo, água e animais) isoladas pelo professor Spartaco Astolfi-Filho do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, foram pré-testadas para a produção de biopolímeros. Seis destas linhagens, BL15, BL16, BL32, BL53, BL62 e BL74, que produziram caldos de cultura altamente viscosos foram escolhidas para avaliação da habilidade em produzir o ácido γ -poliglutâmico.

3.1.2 Isolados de Natto

Linhagens foram isoladas a partir de Natto comercial. Os produtos foram adquiridos no comércio especializado da cidade de Porto Alegre, sendo um produzido no estado de São Paulo e o outro importado do Japão.

Uma pequena quantidade de Natto foi suspensa em 100 mL de solução salina estéril e foi submetida agitação lenta por 20 min, a temperatura ambiente. A suspensão foi inoculada por esgotamento em placas com ágar Luria Bertani (LB) e em placas com meio de isolamento descrito por Xu, Chen e Yu (2005) constituído por: 5 g/L extrato de levedura; 5 g/L ácido L-glutâmico, 1 g/L glicose, 0,5 g/L KH_2PO_4 , 0,1 g/L MgSO_4 e 15 g/L ágar, pH = 7,0. As placas foram incubadas a 37 °C por 12 h. As colônias altamente mucóides foram selecionadas e repicadas para tubos com ágar LB inclinado. Após crescimento, os tubos foram conservados sob refrigeração.

3.1.3 Manutenção e reativação das culturas

As culturas microbianas foram mantidas em glicerol a -18 °C, sendo reativadas duas vezes em caldo Luria Bertani – LB, em agitador orbital (*shaker*) a 180 rpm e 37 °C. Posteriormente uma alçada foi inoculada em ágar LB, utilizando a técnica de semeadura em estrias (esgotamento) para obtenção de colônias isoladas. Colônias isoladas foram repicadas para tubos com ágar inclinado (LB) e mantidas sob refrigeração até o uso.

3.2 Meios de cultivo

Nos cultivos submersos foram utilizados o Caldo Luria Bertani (LB) e o Caldo E (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958). A composição desses meios é apresentada na Tabela 3.1 e na Tabela 3.2.

Tabela 3.1 Caldo Luria Bertani (LB), pH 6,5.

<i>Componentes</i>	<i>g/L</i>
Peptona Bacteriológica	10
Extrato de Levedura	5
NaCl	10

Tabela 3.2 Caldo E, pH 6,5.

<i>Componentes</i>	<i>g/L</i>
taÁcido Glutâmico	20
Ácido Cítrico	12
Glicerol	80
NH ₄ Cl	7
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,04
K ₂ HPO ₄	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,15
MnSO ₄ .H ₂ O	0,04

Fonte: Leonard, Housewright e Thorne (1958).

3.3 Métodos analíticos

3.3.1 Biomassa microbiana

A biomassa microbiana foi estimada através da determinação do peso seco da massa de células. Para tanto, submeteu-se uma amostra do meio de cultivo a centrifugação a 3000 g, seguida de duas lavagens sucessivas do sedimento celular com água destilada e secagem em estufa a 75 °C até massa constante.

3.3.2 Contagem total em placa - células viáveis

A contagem total de células viáveis foi realizada utilizando a técnica de plaqueamento em superfície. Após sucessivas diluições decimais do caldo de cultivo,

diluições definidas foram inoculadas sobre a Àgar Padrão de Contagem (PCA - *Plate Count Agar*) e incubadas a 37 °C por 18 h (APHA, 2001).

3.3.3 Ácido γ -poliglutâmico

A quantificação do ácido γ -poliglutâmico foi realizada segundo o método espectrofotométrico de complexação com o brometo de cetiltrimetilamônio, adaptado de Kanno e Takamatsu (1995). γ -PGA (MM: 70-100 kDa, Sigma-Aldrich) foi utilizado como padrão espectrofotométrico, a absorbância do complexo foi medida em 400 nm.

De acordo com essa metodologia, uma solução de ácido tricloroacético é adicionada ao meio de cultivo para reduzir o pH até 3,0 e precipitar células microbianas e proteínas. A seguir, a mistura é centrifugada a 20.000 g e 4 °C por 30 min. O sobrenadante é recolhido, o pH é ajustado para 7,0 e cinco volumes de etanol absoluto são adicionados. O precipitado resultante é coletado por centrifugação a 25.000 g e 4 °C por 30 min. A etapa de adição de etanol e centrifugação é realizada duas vezes. Após a segunda centrifugação, o precipitado é dissolvido em tampão pH 7,0 \pm 0,1 e é submetido à reação de complexação com brometo de cetiltrimetilamônio. A metodologia apresentada de forma detalhada é descrita no Apêndice A.

3.3.4 Carboidratos totais

A determinação de carboidratos totais foi realizada pelo método Fenol -Ácido Sulfúrico, utilizando glicose como padrão espectrofotométrico (DUBOIS et al., 1956).

3.4 Estudo do inóculo

Para definir o meio a ser utilizado como inóculo dos cultivos, foram realizados ensaios utilizando o Caldo LB e o Caldo E (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958). Os cultivos foram incubados a 37 °C e 180 rpm por um período de 36 h, sendo o crescimento microbiano avaliado pela medida da absorbância a 600 nm.

3.5 Screening de linhagens produtoras de ácido γ -poliglutâmico

A partir das culturas microbianas em tubos inclinados em ágar LB, foi feito o inóculo para cada cultivo, utilizando-se 50 mL de Caldo LB em frascos Erlenmeyer de 250 mL incubados em agitador orbital (*shaker*) a 180 rpm, a 37°C. O inóculo para os cultivos foi padronizado de forma a apresentar uma absorbância igual a $1,0 \pm 0,1$, medida em espectrofotômetro a 600 nm.

A avaliação da habilidade das linhagens em produzir o γ -PGA foi conduzida em Caldo E (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958), pH = 6,5. Um inóculo em Caldo LB foi adicionado a 25 mL de meio em frascos Erlenmeyer de 125 mL, numa concentração de 4% (v/v). Os cultivos foram incubados a 37 °C e 180 rpm, sendo retiradas amostras em intervalos de 0, 24, 48, 72 e 96 horas para determinação da concentração de γ -PGA e de carboidratos totais.

3.6 Identificação filogenética e caracterização morfológica e bioquímica de linhagens produtoras de γ -PGA

A linhagem mais competente na produção de γ -PGA foi caracterizada e identificada através da análise do gene 16S DNAr e através de suas características morfológicas e bioquímicas

A caracterização morfológica e bioquímica foi realizada segundo o Manual de Bergey (SNEATH, 1986) e Mac Fadin (1980) e contou ainda com referências complementares de Xu e Côté (2003), Reva, Sorokulova e Smirnov (2001), Priest, Goodfellow e Todd (1998) e Welker e Campbel (1967).

O seqüenciamento e a identificação via análise do gene 16S do DNA ribossômico (16S DNAr) foram realizados com auxílio de pesquisador colaborador. O DNA foi extraído usando o *QIAamp minikit DNA* (Quiagen ®) a partir de uma suspensão microbiana

equivalente a McFarland 0,5 (200 μ L). A reação de PCR foi realizada usando o kit *Platinun Taq Supermix* (Invitrogen) e 10 μ L do extrato de DNA em um volume final de 50 μ L. O gene 16S DNAr foi amplificado usando os *primers* 285 and 261 (KIRSCHNER; MÉIER; BÖTTGER, 1993). Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose, sendo as bandas visualizadas sob luz ultravioleta. Após confirmação, os produtos de PCR foram purificados usando o *AccuPrep(R) PCR Purification Kit* (Bioneer) e submetidos a sequenciamento direto usando o *BigDye Terminator kit* (Applied Biosystems), segundo instruções dos fabricantes. As sequências de nucleotídeos foram submetidas à BLAST utilizando o banco de dados do DDJB (*DNA Data Bank of Japan*).

3.7 Cultivo submerso em incubadora de agitação orbital (*shaker*)

3.7.1 Condições de cultivo

O meio base utilizado nos cultivos foi o Caldo E (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958), conforme composição apresentada na Tabela 3.2. Os cultivos foram conduzidos com 25 mL de meio em frascos de 125 mL, sendo incubados em agitador orbital (*shaker*) a 180 rpm em diferentes temperaturas de acordo com a combinação de fatores do delineamento utilizado. Para cada cultivo, um inóculo em Caldo LB com densidade ótica de $1,0 \pm 0,1$ foi adicionado ao meio de cultivo, numa concentração de 4% (v/v). Foram retiradas amostras em intervalos de 24 horas para determinação da concentração de ácido γ -poliglutâmico e pH.

3.7.2 Delineamento composto central rotacional para três fatores

A influência da temperatura, da concentração de Zn^{2+} e do pH inicial sobre a produção do γ -PGA foi avaliada. O delineamento experimental seguiu um planejamento composto central rotacional para três fatores, ou seja, um planejamento fatorial 2^3 , incluindo 6 ensaios nas condições axiais e 3 repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios.

Na Tabela 3.3, são mostrados os valores codificados e originais das variáveis (fatores) envolvidas no planejamento: temperatura, concentração de Zn^{2+} e pH inicial. O cátion Zn^{2+} foi adicionado na forma de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. O ajuste do pH do meio foi feito mediante adição de NaOH. Os cultivos foram incubados por um período de 96 horas.

Tabela 3.3 Valores codificados e originais utilizados no DCCR para avaliar o efeito da temperatura, da concentração de Zn^{2+} e do pH inicial sobre a produção de γ -PGA em cultivo submerso.

Variável	- 1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura (°C)	29	32	37	42	45
Concentração de Zn^{2+} (mM)	0,46	0,70	1,05	1,40	1,64
pH inicial	5,3	6,0	7,0	8,0	8,7

3.7.3 Avaliação estatística

Um modelo de segunda ordem para a predição da produção de γ -PGA foi obtido a partir da análise de regressão dos dados experimentais. Este modelo tem a forma do polinômio representado na Equação 3.1.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i>j} \beta_{ij} x_i x_j \quad \text{Equação 3.1}$$

onde y é a resposta predita (produção de γ -PGA, g/L); β_0 , β_i , β_j e β_{ij} são os coeficientes da regressão, k é o número de fatores, x_i e x_j são as variáveis independentes ou fatores.

Para avaliar a significância da regressão e o ajuste do modelo aos dados experimentais foi utilizada a Análise de Variância (ANOVA). A significância dos efeitos e dos coeficientes de regressão foi avaliada através do teste t de Student e a variação explicada pelo modelo foi determinada através do coeficiente R^2 .

Como ferramenta para a realização da análise de regressão múltipla e da análise de significância do modelo, dos efeitos e dos coeficientes de regressão foi utilizado o software Statistica 7.1 (Statsoft).

3.8 Cultivo submerso em biorretor

3.8.1 Condições de cultivo e amostragem

Os cultivos foram conduzidos em biorreator de tanque agitado modelo Biostat B (B. Braun Biotech International) de 5 L, acoplado a unidade de controle digital integrado, conforme representado na Figura 3.1. Uma placa de aquisição de dados foi conectada ao sistema para transferência de dados a um microcomputador, operando com auxílio do software MATLAB (MathWorks). A aquisição de dados de temperatura, pH, velocidade de agitação e o teor de oxigênio dissolvido no meio foi realizada a cada 10 s, sendo os dados gravados em arquivo.



Figura 3.1 Biorreator Biostat B (B. Braun Biotech International)
(a) vaso do biorreator (b) unidade de controle do biorreator

Para cada cultivo, um inóculo em Caldo LB com densidade ótica de $1,0 \pm 0,1$ foi adicionado ao meio de cultivo, numa concentração de 4% (v/v). Os cultivos foram conduzidos por 96h, sem controle de pH e com 2,5 L de meio de cultura, utilizando as condições otimizadas pelo delineamento realizado em agitador orbital (*shaker*). Foi utilizada uma taxa de aeração de 2,0 vvm e foram empregadas velocidades de agitação de 500, 750 e 1000 rpm. Uma pequena quantidade de antiespumante (Antifoam, 204 – Sigma-Aldrich) foi adicionada para controlar a formação de espuma, sempre que necessário num total inferior a 0,2% do volume de meio.

Os cultivos de 500 rpm foram realizados em triplicata e os cultivos de 750 e 1000 rpm em duplicata. Ao longo do tempo de cultivo, amostras foram retiradas para determinação da concentração de ácido γ -poliglutâmico e contagem total de células viáveis.

3.8.2 Determinação dos parâmetros cinéticos de crescimento microbiano

As curvas de células viáveis foram ajustadas ao Modelo Logístico, apresentado na Equação 3.2 (ZWIETERING et al., 1990), com o auxílio do *software* OriginPro (OriginLab).

$$X = \frac{X_{\max}}{1 + e^{-\mu_{\max}(t-t_c)}} \quad \text{Equação 3.2}$$

Na Equação 3.2, de X é a contagem total de células viáveis (UFC/mL) e t é tempo (h). Os parâmetros cinéticos X_{\max} , μ_{\max} e t_c são obtidos a partir do ajuste dos dados experimentais ao modelo. X_{\max} representa o máxima amplitude de X (patamar na fase estacionária), μ_{\max} é a máxima velocidade específica de crescimento (na fase exponencial) e t_c corresponde ao tempo no qual $\mu = \mu_{\max}/2$.

3.8.3 Aquisição de dados de oxigênio dissolvido

O oxigênio dissolvido no caldo de cultivo foi medido utilizando um eletrodo polarográfico (Mettler-Toledo) e foi expresso como percentagem de oxigênio de saturação. A aquisição e o registro dos dados foram realizados com auxílio do *software* MATLAB (MathWorks).

3.8.4 Determinação do *OUR*, Q_{O_2} e k_La

A taxa de consumo de oxigênio (*OUR*), a taxa específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2}) e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio k_La foram determinados pelo Método Dinâmico (DORAN, 1995). Esses parâmetros foram calculados nas primeiras horas do cultivo para as velocidades de agitação de 500, 750 e 1000 rpm.

Para a determinação da taxa de consumo de oxigênio (*OUR*), o fluxo de ar foi interrompido e a velocidade de agitação foi reduzida a zero ($OTR=0$) fazendo o oxigênio dissolvido decair nesse período, sendo a *OUR* determinada pela inclinação da reta no gráfico oxigênio dissolvido *versus* tempo. A taxa específica de consumo de oxigênio Q_{O_2} foi calculada através da Equação 2.1, conhecendo-se a concentração da biomassa microbiana.

$$Q_{O_2} = \frac{1}{X} OUR \quad \text{Equação 2.1}$$

onde X (g/m^3) é a concentração da biomassa microbiana e OUR ($\text{g}/\text{m}^3 \cdot \text{h}$) é a taxa de consumo de oxigênio (*oxygen uptake rate*).

Para a determinação do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La), o fluxo de ar e a agitação foram restabelecidos, causando o aumento na concentração do oxigênio dissolvido até um valor estacionário de concentração (\bar{C}).

O $k_L a$ foi calculado com auxílio do *software* MATLAB (MathWorks) pela inclinação da reta obtida pela regressão linear dos vários pontos do gráfico $\ln\left(\frac{\bar{C} - C_i}{\bar{C} - C_k}\right) \times (t_k - t_i)$ de acordo com Equação 3.3 e Figura 3.2.

$$k_L a = \frac{\ln\left(\frac{\bar{C} - C_i}{\bar{C} - C_k}\right)}{t_k - t_i} \quad \text{Equação 3.3}$$

onde t_i e t_k representam dois instantes genéricos de medição do oxigênio dissolvido C_i e C_k , após o período de restabelecimento da aeração e agitação.

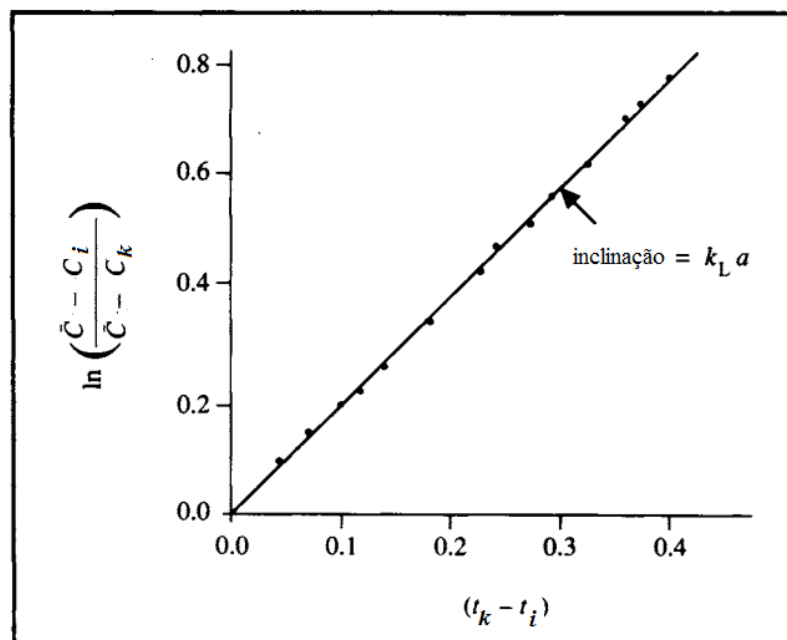


Figura 3.2 Gráfico representativo da determinação do $k_L a$ pelo método dinâmico .

FONTE: Adaptado de Doran (1995)

3.9 Estudo preliminar para produção de γ -PGA utilizando resíduos industriais

Paralelamente aos cultivos submersos realizados com Caldo E, foi feita uma avaliação preliminar para a utilização de resíduos industriais como substratos para a produção de γ -PGA. Foram testados o glicerol residual de biodiesel e o resíduo fibroso de soja (RFS).

3.9.1 Cultivo submerso em agitador orbital utilizando glicerol residual de biodiesel

Os cultivos foram conduzidos com 25 mL de meio em frascos de 125 mL, incubados em agitador orbital (shaker) a 180 rpm, utilizando as condições de cultivo otimizadas pelo DCCR. A composição do Caldo E (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958) foi modificada pela substituição do glicerol P.A por glicerol residual de biodiesel, utilizando a mesma concentração de glicerol utilizada no meio convencional, porém considerando a pureza do resíduo. O laudo técnico do glicerol residual de biodiesel utilizado é apresentado no Apêndice B.

3.9.2 Cultivo em estado sólido sobre resíduo fibroso de soja (RFS)

Foi realizado estudo para a produção de γ -PGA em cultivo de estado sólido utilizando o resíduo fibroso de soja (RFS) como substrato. Esse mesmo resíduo já foi utilizado anteriormente por Heck, Hertz e Ayub (2002), sendo sua composição apresentada na Tabela 3.4.

O teor de umidade original do RFS é 10%. Nos cultivos, esse teor de umidade foi aumentado através da adição de um meio líquido. Foram utilizados os seguintes meios: solução salina tamponada (pH=7,0) e meio Bushnell-Hass adicionado de ácido glutâmico e MnSO_4 (pH=7,0), conforme composição mostrada na Tabela 3.5.

Tabela 3.4 Resíduo fibroso de soja (RFS) – composição típica

<i>Componentes</i>	<i>% (b. s.)</i>
Proteína total	33
Hemicelulose	26
Celulose	18
Açúcares não redutores	17
Açúcares redutores	2

Fonte: Heck, Hertz e Ayub (2002)

Tabela 3.5 Composição do meio Bushnell-Hass modificado

Componentes do meio líquido	(g /L)
MgSO ₄	0,2
KH ₂ PO ₄	1
K ₂ HPO ₄	1
NH ₄ NO ₃ ,	1
CaCl ₂	0,02
FeCl ₂	0,05
MnSO ₄	0,5
Ácido L-glutâmico	12,5

Os ensaios foram conduzidos em biorreatores cilíndricos verticais estáticos de fluxo de ar ascendente, desenhados em nosso laboratório e mostrados na Figura 3.3. O corpo do biorreator é construído em vidro (60 mm de diâmetro e 170 mm de altura) e o fundo é composto de vidro sinterizado (de porosidade G1) e lã de vidro. Na parte superior, é colocada firmemente uma tampa em material elastomérico com filtro acoplado para saída dos gases produzidos durante o cultivo. Os biorreatores foram montados num conjunto de quatro unidades com distribuidor de ar central, que recebe ar umidificado e estéril com vazão controlada por rotâmetro. Durante os ensaios, os biorreatores foram colocados em estufa para controle da temperatura.



Figura 3.3 Biorreator para cultivo em estado sólido

O inóculo foi produzido em erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de Caldo LB, sendo incubado em agitador orbital a 37 °C e 180 rpm por aproximadamente 12 h. O inóculo foi adicionado ao meio de cultivo com absorvância igual a $1.0 \pm 0,1$.

Para o cultivo, foram misturados 20 g de RFS e 80 mL de meio líquido, sendo assim constituído o meio de cada biorreator. Após esterilização do conjunto em autoclave, foram adicionados 20 mL de inóculo. Os biorreatores foram incubados a 37 °C e uma aeração de 250 mL/min foi fornecida em fluxo ascendente através do leito.

Para determinação do γ -PGA, o meio de cultivo foi submetido inicialmente à extração a temperatura ambiente com água destilada numa proporção de RFS/água de 1:20. Após extração, a mistura foi centrifugada e o γ -PGA foi determinado no sobrenadante segundo metodologia descrita no item 3.3.3. As condições da extração foram definidas mediante ensaios preliminares.

Capítulo 4

Resultados e Discussões

Os resultados obtidos na etapa experimental são apresentados neste capítulo, bem como as discussões pertinentes em cada caso. Em primeiro lugar são mostrados os resultados referentes à seleção e Identificação de linhagens produtoras de γ -PGA. Num segundo momento são discutidos os resultados da otimização dos parâmetros para produção do polímero em cultivo submerso. A seguir é realizada uma avaliação detalhada do efeito da agitação em biorreator sobre a produção do γ -PGA. Por fim, são apresentadas potencialidades para a produção do γ -PGA utilizando resíduos industriais.

4.1 Estudo do inóculo

Para definição do melhor meio de inóculo para a produção de γ -PGA foram avaliados o Caldo LB e o Caldo E (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958). As seis linhagens (BL15, BL16, BL32, BL53, BL62 e BL74) utilizadas neste estudo foram isoladas a partir de amostras de solo, água e animais da região amazônica e foram escolhidas por seu potencial em produzir o γ -PGA. Em trabalhos desenvolvidos anteriormente em nosso laboratório, foi observado que essas linhagens produziram meios de cultivo altamente viscosos, dando indícios da presença de um polímero no meio.

Na Figura 4.1 e na Figura 4.2 são apresentadas as curvas de crescimento das linhagens estudadas. Como pode ser observado, as curvas apresentam comportamento típico, sendo possível identificar as fases de latência (LAG), exponencial (LOG) e estacionária nos cultivos. Para todas as bactérias pesquisadas, quando o Caldo LB foi utilizado como meio de cultivo, a fase LAG foi curta ou inexistente e a fase LOG foi alcançada em menos de 12 horas. Por outro lado, os cultivos em Caldo E apresentaram uma fase LAG relativamente longa, com duração de aproximadamente 24 horas.

O ácido glutâmico, o ácido cítrico e o glicerol, presentes no Caldo E, são as fontes de carbono geralmente utilizadas para induzir a formação de γ -PGA. No entanto, esse meio não se mostrou o mais favorável para a produção de biomassa microbiana, conforme fica evidenciado através da Figura 4.2. Confirmando essa observação, Du et al. (2005) mostraram que o acréscimo na concentração de glicerol não contribui para o aumento de biomassa microbiana.

Com base nesses resultados, o Caldo LB, geralmente utilizado para o crescimento e manutenção de bactérias, foi escolhido como o meio para obtenção do inóculo para os cultivos. Foi considerado um tempo mínimo de 12 horas de crescimento do inóculo em Caldo LB, de forma a assegurar a transferência das células já em fase LOG para o Caldo E.

Embora o uso de um mesmo meio para o inóculo e para o cultivo possa auxiliar na adaptação das células ao meio nas primeiras horas de cultivo, no caso específico da produção de γ -PGA essa prática não é comum. Xu, Chen e Yu (2005) e Ashiuchi et al. (2001a) também utilizaram o Caldo LB como meio para o inóculo, enquanto Shih, Wu e Shieh (2005) e Shih, Van e Chang (2002) utilizaram o Caldo Nutriente, que tem composição muito similar ao Caldo LB. O Caldo Nutriente pode ser utilizado como estratégia para indução de esporulação (SHIH; VAN; CHANG, 2002), uma vez que entre os produtores de γ -PGA há uma estreita relação entre síntese do polímero e esporulação (SUNG et al., 2005).

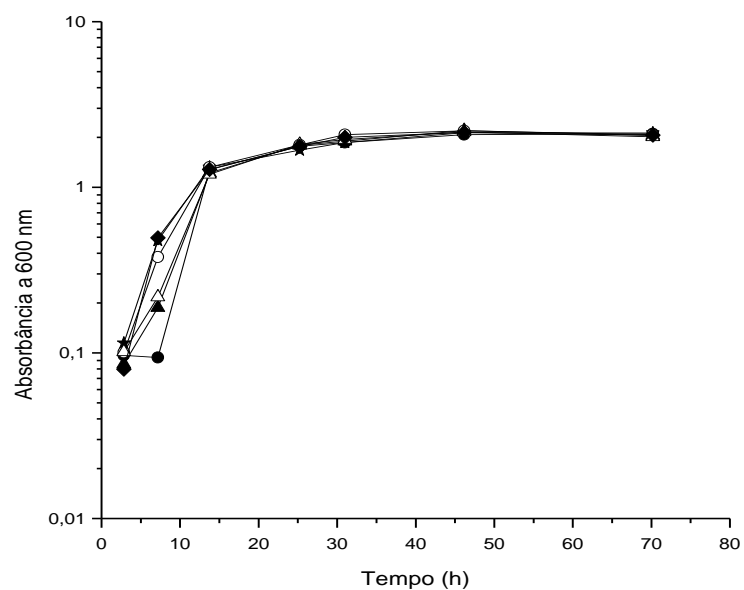


Figura 4.1 Curvas de crescimento microbiano em Caldo LB em cultivos conduzidos a 37 °C e 180 rpm.

● BL15, ▲ BL16, ★ BL32, ○ BL53, △BL62, ◆ BL74

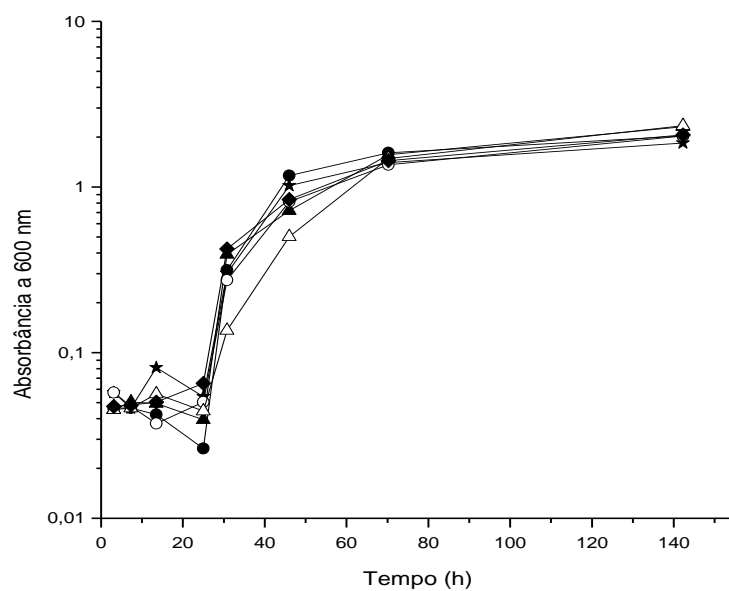


Figura 4.2 Curvas de crescimento microbiano em Caldo E em cultivos conduzidos a 37°C e 180 rpm.

● BL15, ▲ BL16, ★ BL32, ○ BL53, △BL62, ◆ BL74

4.2 Seleção das melhores linhagens produtoras de γ -PGA

Com o objetivo de selecionar dentre as linhagens BL15, BL16, BL32, BL53, BL62 e BL74, aquelas que apresentavam a habilidade em produzir o γ -PGA foram conduzidos cultivos a 180 rpm e 37 °C, utilizando o Caldo E (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958).

Na Figura 4.3 e na Figura 4.4, é possível observar a concentração de γ -PGA e de carboidratos totais num período de 96 horas. Com exceção da linhagem BL32, todas as demais apresentaram habilidade para a produção de γ -PGA. Para as linhagens BL53 e BL74 foram obtidos os melhores resultados, atingindo-se concentrações de aproximadamente 4 g/L em 72 horas de cultivo. Porém, a BL53 mostrou uma produção antecipada de γ -PGA (maior produtividade) em relação a todas as outras linhagens, sendo a linhagem de maior potencial para a continuidade dos ensaios.

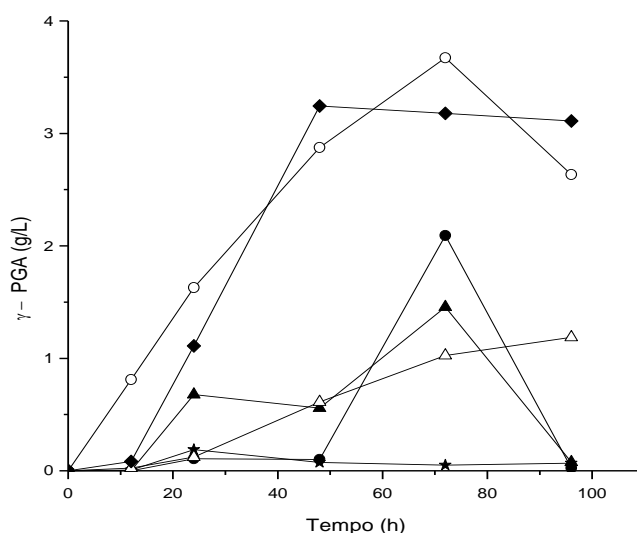


Figura 4.3 Produção de γ -PGA em Caldo E por linhagens isoladas na Amazônia, a 37 °C e 180 rpm.

● BL15, ▲ BL16, ★ BL32, ○ BL53, △ BL62, ◆ BL74

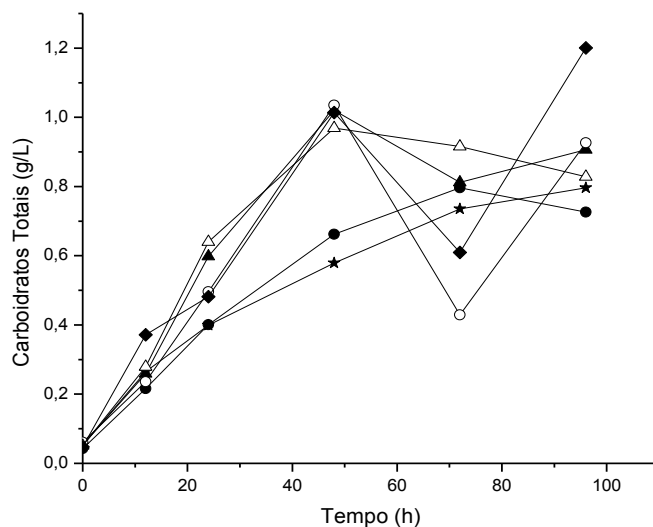


Figura 4.4 Produção de carboidratos totais por linhagens isoladas na Amazônia, em Caldo E a 37°C e 180 rpm
● BL15, ▲ BL16, ★ BL32, ○ BL53, △BL62, ◆ BL74

A produção de γ -PGA pela linhagem BL53 foi semelhante à produção obtida por Shih, Van e Chang (2002) para o cultivo de *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. Esses autores conduziram o cultivo em *shaker* (150 rpm, 37 °C) em Caldo E (pH 6,5) e obtiveram após 96 horas uma produção de 5,27 g/L de γ -PGA.

Quanto a produção de carboidratos totais, todas as linhagens foram capazes de produzir concentrações entre 0,5g/L e 1,0g/L em 48 horas de cultivo, quando ocorreu um pico de produção para a maioria das linhagens. Nessas linhagens, após 48 horas, parece ocorrer um declínio na produção de carboidratos totais, indicando que, provavelmente, esse produto começou a ser utilizado como fonte de carbono.

Duas outras linhagens foram isoladas a partir de amostras de Natto (tradicional produto fermentado japonês) e foram avaliadas quanto à habilidade em produzir γ -PGA, como forma de comparação com as produções obtidas pelas linhagens isoladas de ambiente amazônico. Os resultados obtidos são mostrados na Figura 4.5, onde a linhagem isolada a partir do produto proveniente do estado de São Paulo foi designada como Natto N e aquela isolada a partir de Natto importado do Japão foi designada como Natto IP.

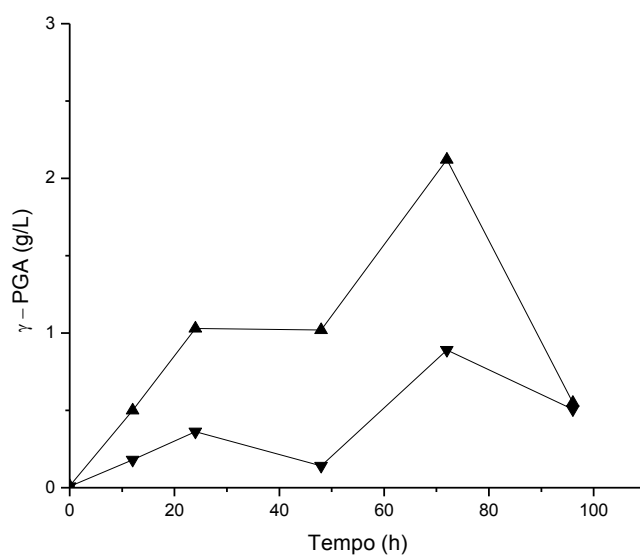


Figura 4.5 Produção de γ -PGA por linhagens isoladas de Natto, em Caldo E a 37 °C e 180 rpm
▲ Natto N, ▼ Natto IP

Algumas linhagens utilizadas na literatura para produção de γ -PGA foram isoladas a partir de Natto ou de produtos similares. Ashiuchi et al. (2001a), por exemplo, isolou a linhagem *Bacillus subtilis* subsp. *chungkookjang* a partir de pasta fermentada de soja e obteve uma produção máxima de 13,4 g/L após 5 dias de cultivo. No presente trabalho, as linhagens isoladas de Natto também foram capazes de produzir o γ -PGA, no entanto apresentaram produção de γ -PGA inferior às linhagens BL53 e BL74, sendo desconsideradas para a continuidade dos estudos.

4.3 Identificação de linhagens produtoras de γ -PGA

A caracterização morfológica e bioquímica mostrou que as linhagens BL53 e BL74 são bactérias aeróbias, catalase-positiva, formadoras de esporos e que se apresentam como bastonetes gram-positivos, capazes de produzir ácido a partir de glicose. Essas características confirmam as linhagens como típicos integrantes do gênero *Bacillus* (SNEATH, 1986; MAC FADIN, 1980). A caracterização completa da linhagem BL 53 é apresentada na Tabela 4.1. A

linhagem *Bacillus* BL74, que apresentou uma menor produtividade de γ -PGA, na caracterização morfológica e bioquímica mostrou-se como uma provável linhagem de *Bacillus anthracis*, sendo por esses motivos não utilizada nas próximas etapas do trabalho.

Tabela 4.1 Características morfológicas e bioquímicas da linhagem BL53

<i>Características morfológicas e bioquímicas</i>	
Forma	Bastonete
Coloração de Gram	+ ^a
Esporulação	+
Redução de nitrato	+
Hidrólise	
Amido	+
Gelatina	+
Produção de Indol	- ^b
Voges-Proskauer	+
Citrato	+
Catalase	+
Oxidase	-
Fenilalanina desaminase	-
Produção de ácido a partir de	
Glicose	+
Lactose	-
Xilose	-
Rafinose	-
Manitol	+
Sorbitol	-
Crescimento a 50°C	+
Crescimento em NaCl 7 %	+
Crescimento em NaCl 10 %	-

a Positivo

b Negativo

A análise da seqüência do gene 16S DNAr obtido a partir da linhagem BL 53 quando comparada com outras seqüências disponíveis no banco DDJB (*DNA Data Bank of Japan*) revelou 100% de similaridade com *Bacillus subtilis* e com *Bacillus amyloliquefaciens*. A análise da seqüência do 16S DNAr é frequentemente utilizada como uma ferramenta para identificar microrganismos inclusive a nível de espécie, no entanto no caso de *Bacillus* a identificação a nível de espécie nem sempre é possível (PORVAL, et al., 2009; FOX et al., 1992). Quando existe um elevado grau de semelhança genética entre os indivíduos, o fragmento amplificado deve incluir o espaço intergênico 16S-23S DNAr, pois essa região apresenta maior variabilidade quando comparada com a 16S ou 23S DNAr (REIS JUNIOR; REIS; TEIXEIRA, 2006; XU; CÔTÉ, 2003).

Estudos filogenéticos disponíveis na literatura, indicam que o *B. subtilis* e o *B. amyloliquefaciens* são de fato muito similares, apresentando a seqüência do 16S DNAr quase idêntica, e também o espaço intergênico 16S-23S DNAr muito similar, sendo muito difícil separar as duas espécies usando esses critérios (PORVAL, et al., 2009; XU; CÔTÉ, 2003). No entanto, algumas características fisiológicas permitem distinguir as duas espécies (PRIEST; GOODFELLOW; TODD, 1998; REVA; SOROKULOVA; SMIRNOV, 2001; WELKER; CAMPBELL, 1967). A reação positiva à utilização do citrato como única fonte de carbono, o crescimento a 50 °C, a não formação de ácidos a partir da lactose e a ausência de crescimento em NaCl 10% permitiram diferenciar as duas espécies e identificar a linhagem BL 53 como *Bacillus subtilis*.

4.4 Otimização de parâmetros para produção de γ -PGA em cultivo submerso

Embora o Caldo E (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958) tenha sido previamente descrito para a produção de γ -PGA, esta é a primeira vez que este meio de cultivo é avaliado estatisticamente em relação à temperatura, ao pH e à concentração de Zn^{2+} . O cátion Zn^{2+} é apontado por Ashiuchi et al. (2004) como fator

importante na síntese enzimática do γ -PGA *in vitro*, no entanto esse cátion não está presente na composição do Caldo E. Além disso, ao se utilizar uma nova linhagem em um bioprocessamento, é importante avaliar suas características fisiológicas de forma a definir condições otimizadas de operação, como realizado neste trabalho.

A influência da concentração de Zn^{2+} suplementado ao meio de cultivo, da temperatura e do pH inicial sobre a produção de γ -PGA foi avaliada para em cultivo submerso de *Bacillus subtilis* BL53. Os ensaios foram realizados em frascos com agitação orbital (*shaker*) a 180 rpm, tendo como meio base o Caldo E (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958).

A avaliação dos parâmetros foi realizada mediante a aplicação de *Planejamento Experimental*, utilizando um delineamento composto central rotacional 2^3 , consistindo de 17 ensaios e incluindo 3 réplicas no ponto central. O planejamento composto central compreende o planejamento fatorial com dois níveis adicionado de pontos centrais e axiais necessários para estimar a curvatura e a interação entre os efeitos (KENNEDY; KROUSE, 1999).

A Tabela 4.2 mostra os valores originais para os 3 fatores avaliados e a produção observada de γ -PGA (g/L) para cada ensaio após 72 horas de cultivo, que coincide com a maior produção do polímero para a maioria dos experimentos.

A avaliação dos resultados obtidos no planejamento foi realizada através da análise de variância e a significância dos efeitos foi medida pelo teste *t* de *Student*. A Tabela 4.3 mostra que o efeito quadrático do pH inicial é o mais significativo na produção γ -PGA ($P = 0,0667$), seguido pela concentração de Zn^{2+} . Segundo Burkert et al. (2005), um valor de probabilidade menor que 10 % ($P < 0,10$) pode ser considerado significativo, devido a grande variabilidade inerente aos bioprocessos que envolvem enzimas e microrganismos.

Tabela 4.2 Matriz do delineamento (DCCR) para 3 fatores e valores observados para a produção de γ -PGA em 72 h de cultivo

<i>Ensaio</i>	x_1	x_2	x_3	γ -PGA (g/L)
1	32	0,70	6,0	8,86
2	32	0,70	8,0	9,60
3	32	1,40	6,0	10,0
4	32	1,40	8,0	8,91
5	42	0,70	6,0	5,10
6	42	0,70	8,0	5,24
7	42	1,40	6,0	11,0
8	42	1,40	8,0	9,53
9	29	1,05	7,0	9,75
10	45	1,05	7,0	9,52
11	37	0,46	7,0	7,60
12	37	1,64	7,0	9,80
13	37	1,05	5,3	8,79
14	37	1,05	8,7	6,20
15	37	1,05	7,0	10,4
16	37	1,05	7,0	13,2
17	37	1,05	7,0	12,4

X_1 : Temperatura ($^{\circ}$ C)

X_2 : Concentração de Zn^{2+} (mM)

X_3 : pH inicial

Tabela 4.3 Estimativa da significância dos efeitos

Parâmetro	Efeito	Valor t	Valor P
x_1	-1,0086	-1,2921	0,3255
x_1^2	-1,6190	-1,8840	0,2003
x_2	2,0972	2,6896	0,1149
x_2^2	-2,2697	-2,6517	0,1176
x_3	-0,8839	-1,1325	0,3749
x_3^2	-3,1322	-3,6449	0,0677*
x_1x_2	2,4350	2,3877	0,1396
x_1x_3	-0,2450	-0,2402	0,8325
x_2x_3	-0,8600	-0,8433	0,4878

X_1 : Temperatura (°C)

X_2 : Concentração de Zn^{2+} (mM)

X_3 : pH inicial

* Efeito significativo para $P > 0,10$

A forte influência do pH sobre a produção de γ -PGA já havia sido reportada em cultivos realizados com outras linhagens de *Bacillus* (RICHARD; MARGARITIS, 2003a; CROMWICK; BIRRER; GROSS, 1996). Richard e Margaritis (2003a) obtiveram as maiores produções de γ -PGA por *Bacillus subtilis* IFO 3335 para a faixa de pH compreendida entre 6,5 e 7,5. Cromwick, Birrer e Gross (1996) relataram a influência do pH sobre a produção de γ -PGA por *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A e atribuíram o aumento da produção do polímero à maior viabilidade celular e à diferença da utilização do citrato (via ciclo do TCA) em diferentes faixas de pH. O consumo de glicerol e ácido glutâmico do meio manteve-se aproximadamente constante em todas as faixas de pH estudadas, no entanto a utilização de citrato foi maior a pH 6,5.

Com o objetivo de determinar os valores ótimos para as variáveis independentes, um modelo de segunda ordem foi obtido a partir da regressão múltipla dos dados do DCCR. Exceto pelos efeitos menos significativos o x_1x_2 (interação entre pH inicial e concentração de Zn^{2+}) e x_2x_3 (interação entre temperatura e pH inicial), todos os outros parâmetros foram considerados no ajuste do modelo, apresentado na Equação 4.1.

$$y = 12,0 - 1,01 x_1 + 2,10 x_2 - 0,884 x_3 - 1,62 x_1^2 - 2,27 x_2^2 - 3,13 x_3^2 - 2,44 x_1x_2$$

Equação 4.1

onde y é a resposta predita (produção de γ -PGA, g/L) e x_1 , x_2 e x_3 são respectivamente as variáveis independentes temperatura, concentração de Zn^{2+} e pH inicial.

Para a adoção do modelo foram considerados os seguintes critérios: a significância de regressão, o ajuste aos dados experimentais (significância da “falta de ajuste”) e valor do coeficiente de determinação (R^2). A Análise de Variância (ANOVA) para o modelo é mostrada na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para produção de γ -PGA (g/L) em 72 h, referente a matriz do delineamento (DCCR)

<i>Fonte de Variação</i>	<i>Soma Quadrática</i>	<i>Graus de Liberdade</i>	<i>Média Quadrática</i>	<i>F calculado</i>	<i>Valor P</i>
Modelo	66,79	7	9,541	8,41	0,0024
Resíduo	10,21	9	1,135		
Falta de Ajuste	6,05	7	0,864	0,416	0,840
Erro Puro	4,16	2	2,080		
Total	77,00	16			

$$R^2 = 0.87$$

A análise de variância mostrou que o modelo é altamente significativo, como fica evidente através do teste F de Fisher ($P = 0,0024$). Além disso, a falta de ajuste aos dados experimentais não é significativa ($P = 0,84$) e o coeficiente de determinação R^2 foi de 0,87, indicando que 87% da variação é explicada pelo modelo. Estes resultados sugerem que o modelo proposto representa satisfatoriamente o fenômeno sob análise.

Os diagramas de contorno gerados pelo modelo são apresentados na Figura 4.6, sendo que a terceira variável que não aparece em cada diagrama considerada no seu valor ótimo. Através dos diagramas de contorno é possível observar o comportamento das variáveis independentes e avaliar o impacto das mesmas na produção de γ -PGA. A máxima produção de γ -PGA prevista pelo modelo ajustado foi 12,3 g/L, quando a temperatura, o pH inicial e a concentração de Zn^{2+} são respectivamente iguais a 37 °C, 6,9 e 1,22 mM. A validação experimental do modelo utilizando as condições ótimas previstas em agitador orbital (*shaker*) resultou numa produção de γ -PGA de 10,4 g/L, que é um valor bem próximo do valor predito.

Ashiuchi et al. (2004) verificaram que o pH ideal para a síntese *in vitro* do γ -PGA é aproximadamente 7,0, utilizando o complexo enzimático PgsBCA extraído da membrana celular do *Bacillus subtilis* subsp. chungkookjang. Richard e Margaritis (2003a) mostraram que o pH ideal para a produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* IFO 3335 também é 7,0, enquanto para o *Bacillus licheniformis* ATCC 9945, Cromwick, Birrer e Gross (1996) reportaram um pH ótimo de 6,5. Ao contrário do realizado no presente trabalho, esses estudos foram realizados utilizando o método tradicional de variação de uma variável de cada vez, sem verificar a interação entre fatores, que só é possível em planejamentos fatoriais. Shih, Van e Chang (2002) utilizaram um DCCR para avaliar a influência da composição do meio e o do pH inicial. No entanto, a faixa de pH selecionada para o planejamento naquele trabalho foi muito estreita (6,0-7,0), levando à exclusão desse parâmetro pela não significância de seus efeitos.

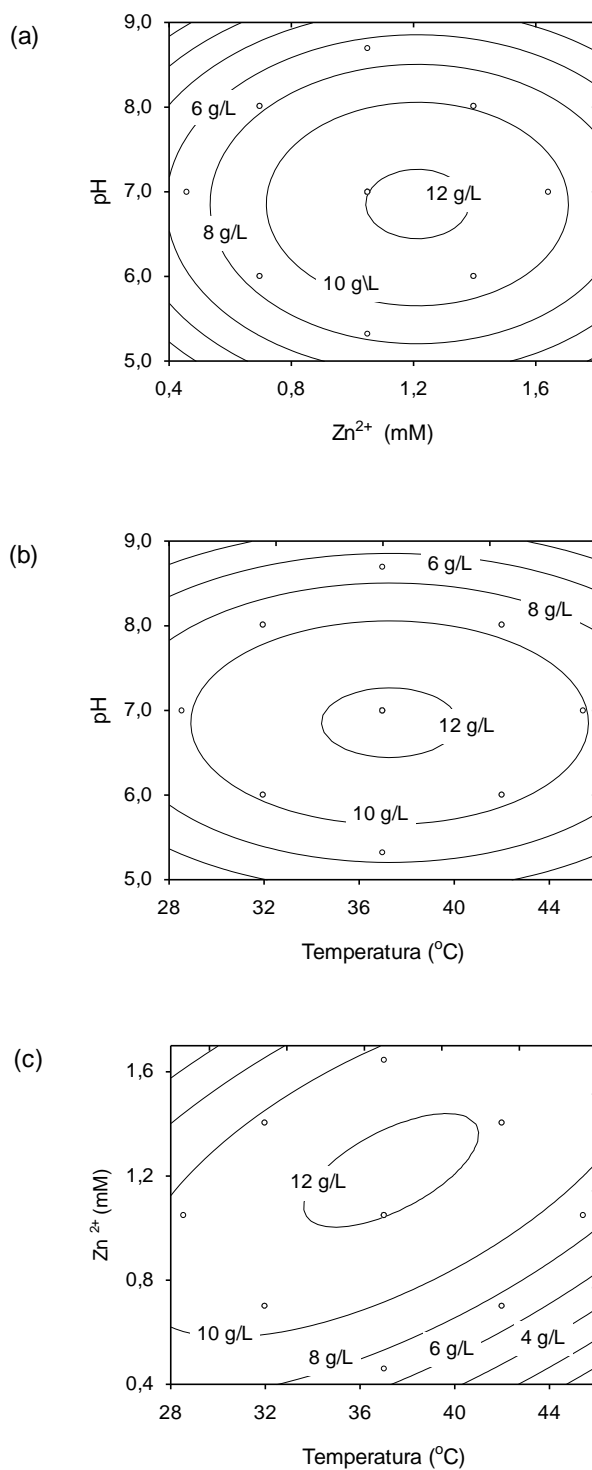


Figura 4.6 Diagramas de contorno para a produção de γ -PGA em 72 horas de cultivo como função (a) do pH inicial e da concentração de Zn^{2+} , (b) do pH inicial e da temperatura e (c) da concentração de Zn^{2+} e da temperatura. A variável que não aparece em cada diagrama foi considerada no seu valor ótimo, respectivamente igual a 37 $^{\circ}C$, 1,22 mM Zn^{2+} e pH 6,9.

Embora o pH inicial desempenhe um papel importante na produção γ -PGA pelo *Bacillus subtilis* BL53 e também em outras linhagens de *Bacillus*, os experimentos realizados no presente trabalho indicam que não é necessário um controle rigoroso deste parâmetro durante o cultivo. Mesmo com diferentes valores de pH inicial, os meios tenderam a um tamponamento entre 7,0 e 7,5 após 24 h de cultivo. Deste modo, as culturas de *Bacillus subtilis* BL53 contrastam com o comportamento reportado para linhagens de *Bacillus licheniformis*, como o relatado por Shih et al. (2001) para o *B. licheniformis* CCRC 12826, onde o pH inicial de 6,5 caiu para 5,6 após 36 h de cultivo a 37 °C. Também Cromwick, Birrer e Gross (1996) relataram que no cultivo de *B. licheniformis* ATCC 9945, o pH foi acidificado de 7,4 para valores entre 5,9 e 5,6 após 48 de cultivo a 37 °C.

Conforme demonstrado na análise dos efeitos (Tabela 4.3), a concentração de Zn^{2+} é um fator relevante sobre a produção de γ -PGA por *B. subtilis* BL53. Ashiuchi et al. (2004) observaram que o Zn^{2+} foi capaz de potencializar a ação do Mg^{2+} na ativação do complexo PgsBCA na síntese enzimática de γ -PGA. Em estudo utilizando um delineamento do tipo Plackett-Burman para investigar a produção de γ -PGA por uma nova linhagem de *B. licheniformis* mostrou que a concentração de Zn^{2+} tem um efeito positivo sobre a produção de γ -PGA, mas negativo sobre a biomassa (SOLIMAN; BEREKAA; ABDEL-FATTAH, 2005)

4.5 Comparação da produção de γ -PGA em agitador orbital e em biorreator

Com o objetivo de observar os efeitos de um pequeno escalonamento sobre o processo de produção do γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53, cultivos foram conduzidos em frascos de 125 mL em agitador orbital (*shaker*) e em biorreator mecanicamente agitado com vaso de 5 L. Os cultivos foram avaliados por 96 h e empregaram as condições ótimas obtidas no DCCR, sendo realizados em triplicata. Os resultados obtidos são

mostrados na Figura 4.7. No agitador orbital, uma rotação de 180 rpm foi utilizada, enquanto no biorreator foi utilizada uma taxa de aeração de 2 vvm e velocidade de agitação de 500 rpm, para melhorar a aeração do sistema e evitar a depleção de oxigênio.

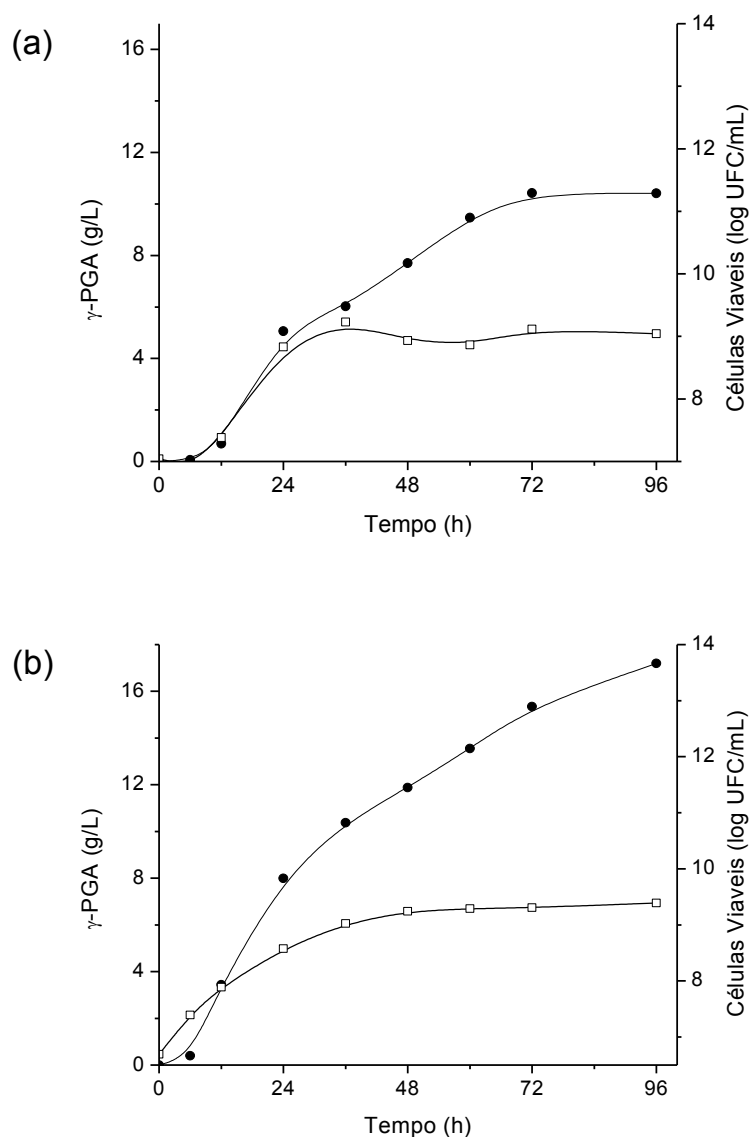


Figura 4.7 Produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53, sob condições otimizadas pelo DCCR, em cultivos conduzidos em (a) agitador orbital e (b) biorreator agitado mecanicamente a 500 rpm e 2 vvm.

γ -PGA (●), Células Viáveis (□)

O número de células viáveis aumentou rapidamente nos cultivos realizados em biorretor, sendo que após aproximadamente 6 h o γ PGA já começa a ser produzido. Em ambos cultivos, em agitador orbital e em biorreator, a produção de γ -PGA aumenta rapidamente na fase exponencial e tende a alcançar um platô na fase estacionária. Esse comportamento sugere que a produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL 53 segue uma cinética parcialmente associada ao crescimento celular, semelhante ao que é relatado para outras linhagens de *Bacillus subtilis* (XU et al., 2005; CHEN, et al., 2005a; CHEN, et al., 2005b).

Os cultivos conduzidos em agitador orbital produziram 10,4 g/L de γ -PGA em 72 horas, enquanto no biorreator uma produção muito maior (17 g/L) foi obtida, sugerindo que o metabolismo aeróbico é essencial para a produção desse biopolímero. O γ -PGA é um polímero extracelular, de modo que o caldo de cultura se torna viscoso a medida que o tempo de cultivo avança, podendo levar a limitação de oxigênio (RICHARD; MARGARITIS, 2003b). Nos ensaios realizados, a concentração de oxigênio dissolvido apresentou sensível declínio mesmo com a utilização de estratégias de aeração e agitação nos cultivos conduzidos em biorreator.

4.6 Avaliação do efeito da agitação sobre a produção de γ -PGA

A produção de γ -PGA tem sido investigada por muitos autores e diversos fatores relevantes para sua produção têm sido estudados, sendo os mais frequentes a composição do meio de cultivo e as condições de processo, como temperatura e pH. No entanto, relativamente poucos trabalhos têm investigado a influência da transferência de massa de oxigênio (aeração e agitação) sobre o rendimento e a produtividade de γ -PGA (BAJAJ; SINGHAL, 2010; RICHARD; MARGARITIS, 2003b; CROMWICK; BIRRER; GROSS, 1996).

A análise da influência da transferência de oxigênio é de fundamental importância em processos aeróbios, principalmente naqueles que envolvem a produção de biopolímeros, sendo um aspecto determinante para o entendimento e a otimização desses processos. Este trabalho privilegiou o estudo da influência da velocidade de agitação sobre a transferência de oxigênio, visto que em cultivos para produção de biopolímeros a influência da taxa de aeração é pouco significativa, conforme revisado por Richard e Margaritis (2002). Um aumento na taxa de aeração só causa impacto na taxa de transferência de oxigênio quando se trabalha em condições de pequena aeração.

No presente trabalho foram determinados a percentagem de oxigênio dissolvido no meio de cultivo, a taxa específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2}) e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), sendo investigada a influência desses parâmetros sobre a viabilidade celular, a produção e a produtividade de γ -PGA. Foram conduzidos cultivos em três diferentes velocidades de agitação (500, 750 e 1000 rpm), utilizando uma taxa de aeração de 2 vvm.

4.6.1 Velocidade de agitação e teor de oxigênio dissolvido

O teor de oxigênio dissolvido foi monitorado durante a realização de alguns cultivos mediante a utilização de placa de aquisição de dados conectada a um microcomputador, operando com auxílio do software MATLAB (MathWorks). Na Figura 4.8 e na Figura 4.9 é mostrado o teor de oxigênio dissolvido durante a produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53 para três diferentes velocidades de agitação, sendo que para 500 rpm são ilustrados dois cultivos.

Como é possível observar através da Figura 4.8 e da Figura 4.9, o teor de oxigênio dissolvido decai bruscamente nas primeiras horas de cultivo (até 15 horas), indicando a ocorrência de elevada demanda de oxigênio pelas bactérias, que supera a transferência de oxigênio. Observa-se ainda, que embora a taxa de aeração seja a mesma em todos os cultivos (2 vvm), o teor de oxigênio dissolvido varia em função da velocidade de agitação

empregada. Assim, a queda no teor de oxigênio é tanto mais rápida, quanto menor é a velocidade de agitação utilizada; sendo que para 500 rpm, o oxigênio dissolvido atinge valores inferiores a 10 % já em 5 h de cultivo.

Um comportamento similar já foi reportado por Bajaj e Singhal (2010) para *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 em cultivo submerso para produção de γ -PGA em biorreator semelhante ao utilizado no presente trabalho. Porém, naquele trabalho, o menor valor de oxigênio dissolvido ocorre mais tarde, entre 12 e 24 h, dependendo da condição utilizada de aeração e agitação. Além disso, o teor de oxigênio dissolvido se eleva rapidamente após 24 h chegando a valores acima de 50 % após 48 h e a aproximadamente 100 % após 96 h, o que só ocorreu de forma expressiva no presente trabalho quando a velocidade de agitação de 1000 rpm foi utilizada.

O aumento no teor de oxigênio dissolvido pode indicar uma diminuição na demanda de oxigênio provocada pela redução no crescimento dos microrganismos ao entrar na fase estacionária. Segundo Garcia-Ochoa et al. (2010) em alguns cultivos, a concentração de oxigênio dissolvido diminui até que se aproxime de zero e não aumenta mesmo quando a cultura atinge a fase estacionária, apesar de esforços de melhoria na taxa de transferência de oxigênio (através do aumento da vazão de ar ou da velocidade de agitação). Esse parece ser o caso dos cultivos de *Bacillus subtilis* BL53 conduzidos a 750 rpm.

Para a velocidade de agitação de 750 rpm, foi obtida a maior produção de γ -PGA durante a fase estacionária. Uma maior concentração de polímero provoca um aumento na viscosidade do meio com conseqüente aumento da resistência a transferência de oxigênio (GARCIA-OCHOA et al., 2010). Em decorrência disso, a concentração de oxigênio dissolvido tende a permanecer em um patamar baixo, podendo limitar o crescimento microbiano, como de fato ocorreu em 750 rpm e será mostrado mais adiante neste trabalho.

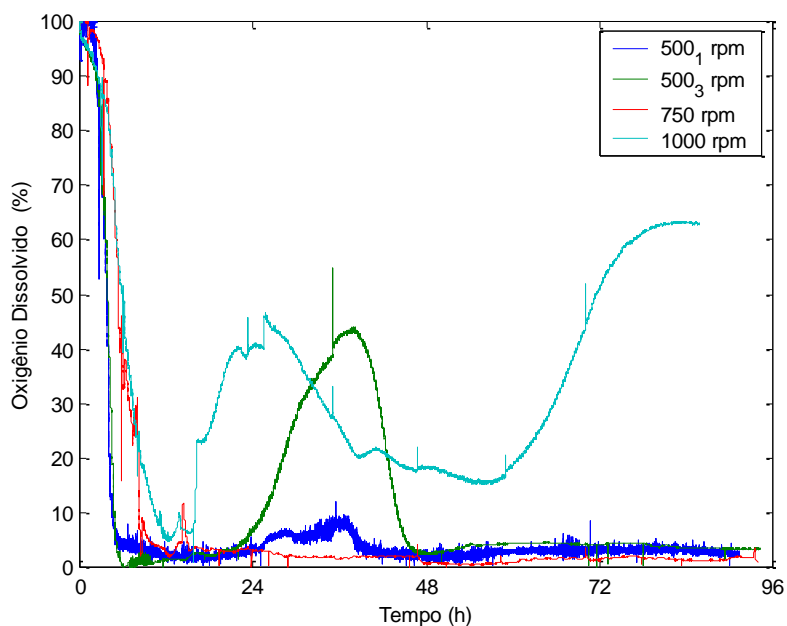


Figura 4.8 Teor de oxigênio dissolvido durante o cultivo para produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53 sob diferentes velocidades de agitação e aeração 2 vvm.

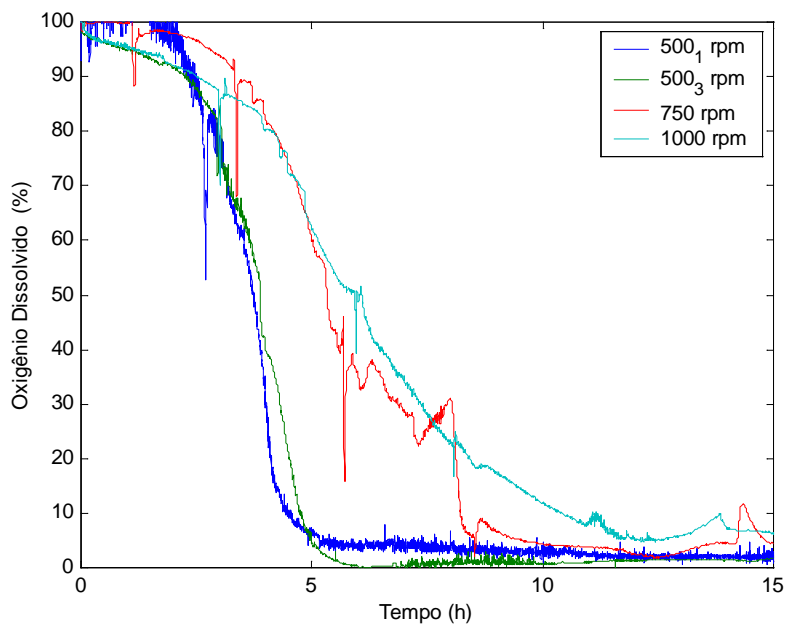


Figura 4.9 Teor de oxigênio dissolvido durante as primeiras 15 de horas de cultivo para produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53 sob diferentes velocidades de agitação e aeração 2 vvm.

4.6.2 Velocidade de agitação, OUR e Q_{O_2}

A eficiência da transferência de oxigênio no seio do meio de cultura também pode ser avaliada através de parâmetros como a taxa global de consumo de oxigênio (OUR), a taxa específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2}) e o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), os quais são utilizados tanto para o projeto quanto para o escalonamento de processos. Esses parâmetros foram determinados durante as primeiras horas de cultivos realizados a 500, 750 e 1000 rpm, utilizando o Método Dinâmico, conforme descrito no Capítulo 3.

Na Figura 4.10 é apresentado um gráfico típico obtido durante a utilização do Método Dinâmico. O declínio da curva de oxigênio dissolvido reflete o momento em que o fluxo de ar foi interrompido e a velocidade de agitação foi reduzida a zero, sendo o oxigênio consumido pelas bactérias. E, posteriormente, reflete quando a aeração e a agitação foram restabelecidas, provocando um aumento no oxigênio dissolvido no meio de cultivo.

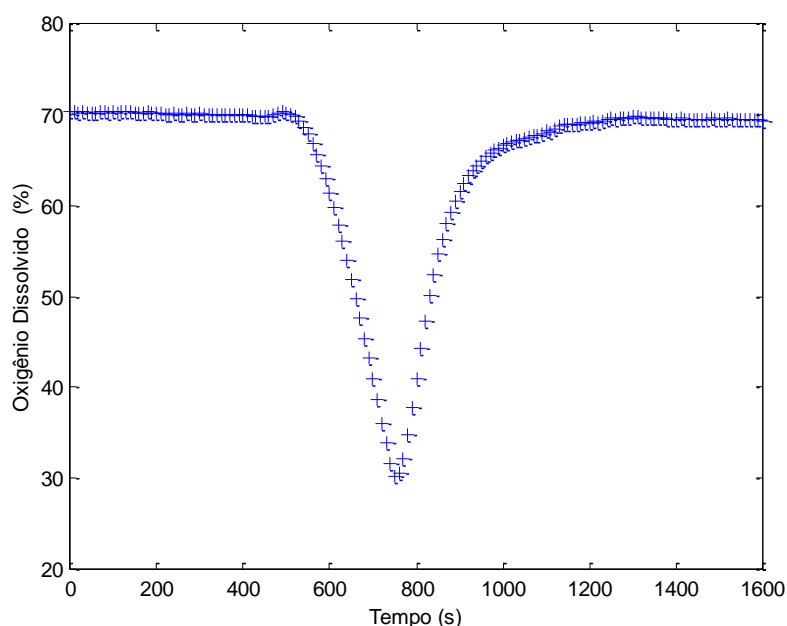


Figura 4.10 Gráfico experimental obtido durante realização do Método Dinâmico para determinação do OUR , Q_{O_2} e k_{La} para o cultivo de *Bacillus subtilis* BL53

No declínio da curva foi determinada a inclinação da reta (*OUR*) e o valor de Q_{O_2} foi calculado mediante Equação 2.1, utilizando a biomassa (*X*) medida neste momento. Para a expressão do resultado foi considerada a percentagem de oxigênio dissolvido de 100 % como a concentração de oxigênio na saturação em água a 37 °C e 1 atm, que é 6,7 mg O₂/L (0,21 mmol/L) (WILDE, 2006). Embora os caldos de cultivo não sejam constituídos de água pura, essa suposição é utilizada também por outros autores quando há a necessidade de expressar o valor absoluto da concentração de oxigênio dissolvido (SCHIMIDELL et al. 2001).

$$Q_{O_2} = \frac{1}{X} OUR$$

Equação 2.1

Na Tabela 4.5 são apresentados os valores da taxa global de consumo de oxigênio (*OUR*) expressos como *mmol O₂/L.h*, enquanto que na Tabela 4.6 são apresentados os valores da taxa específica de consumo de oxigênio (Q_{O_2}), expressos como *mmol O₂/g biomassa.h*. Os parâmetros *OUR*, Q_{O_2} e k_{La} não foram calculados em 6 h e 8 h para os cultivos de 500 rpm, pois nestes tempos o oxigênio dissolvido já havia atingido valores baixos que impossibilitavam a realização da medida.

Tabela 4.5 Taxa global de consumo de oxigênio para cultivos realizados a 500, 750 e 1000 rpm

Velocidade de Agitação (rpm)	<i>OUR</i> - Taxa global de consumo de oxigênio (mmol O ₂ /L.h)		
	3 h	6 h	8 h
500 rpm	1,54*	-	-
750 rpm	0,97	3,4	0,49
1000 rpm	0,80	6,8	1,9

* $\sigma = 0,04$ mmol O₂/L.h, calculado a partir da triplicata de cultivos realizados a 500 rpm

Tabela 4.6 Taxa específica de consumo de oxigênio para cultivos realizados a 500, 750 e 1000 rpm

Velocidade de Agitação (rpm)	Q_{O_2} - Taxa específica de consumo de oxigênio (mmol O_2 /g biomassa.h)		
	3 h	6 h	8 h
500 rpm	11,6*	-	-
750 rpm	12	12	0,35
1000 rpm	11	3,4	0,22

* $\sigma = 0,2$ mmol O_2 /g biomassa.h, calculado a partir da triplicata de cultivos realizados a 500 rpm

A partir dos resultados de *OUR* obtidos para 6 e 8 h, é possível observar que parece haver uma relação entre este parâmetro e a velocidade de agitação. Em 1000 rpm, os valores de *OUR* são superiores àqueles determinados para 750 rpm. Sendo o oxigênio um substrato fundamental para o metabolismo de microrganismos aeróbios, é lógico esperar o comportamento observado, uma vez que uma maior velocidade de agitação representa uma maior disponibilidade de oxigênio para as células.

Até o momento, nenhum outro trabalho havia reportado a influência da velocidade de agitação sobre a demanda de oxigênio por *Bacillus* produtores de γ -PGA. O estudo de Bandaipheth e Prasertsan (2006) sobre a influência da velocidade de agitação na produção de um exopolissacarídeo por *Enterobacter cloacae* WD7, mostrou também que um acréscimo na velocidade agitação correspondia a um aumento da *OUR*. Isto representa um indício de que o metabolismo celular foi afetado pela maior disponibilidade de oxigênio.

Em sistemas biológicos, onde a absorção de gás (oxigênio) é seguida por uma reação bioquímica, duas resistências podem controlar a taxa global: a transferência de oxigênio da fase gasosa para a fase líquida e a reação bioquímica na célula. Às vezes, o transporte dos substratos até a célula ocorre a uma taxa que é consideravelmente mais elevada que a velocidade das reações bioquímicas. No entanto, se o fenômeno da

reação bioquímica é mais rápido que a transferência de massa, essa última pode controlar a disponibilidade de oxigênio para a célula e assim limitar seu metabolismo (GARCIA-OCHOA et al., 2010; BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006) .

Através da Tabela 4.5 também é possível perceber que ocorreu um aumento na demanda de oxigênio (*OUR*) do tempo de 3 h para 6 h nos cultivos realizados a 750 e 1000 rpm, com uma redução posterior na demanda em 8 h. Um comportamento similar foi evidenciado por Richard e Margaritis (2003b) nas primeiras horas de cultivo de *Bacillus subtilis* IFO 3335 em biorreator operando a 2 vvm e 700 rpm, porém naquele trabalho, a máxima *OUR* foi de 20 mmol O₂/L.h e ocorreu mais tarde, em 10 horas de cultivo. De acordo com Garcia-Ochoa et al. (2010) o valor da *OUR* aumenta durante a fase exponencial de crescimento porque nesta etapa ocorre grande consumo de substrato, diminuindo posteriormente devido à redução da atividade metabólica das células a medida que se aproxima da fase estacionária.

Segundo Garcia-Ochoa et al. (2010), uma queda brusca na concentração de oxigênio dissolvido nas primeiras horas de alguns cultivos decorre da alta taxa específica de consumo de oxigênio (*Q_{O2}*) no início da fase de latência. Como observado na Tabela 4.6, o maior valor da *Q_{O2}* para *Bacillus subtilis* BL 53 ocorreu justamente no início do cultivo com 11 e 12 mmol O₂/g biomassa.h. Esses valores podem ser considerados relativamente altos se comparados aos valores de *Q_{O2}* para a maioria dos microrganismos revisados por Garcia-Ochoa et al. (2010), como por exemplo o *Bacillus thuringiensis* subsp. Kurstaki HD-1 com *Q_{O2}* entre 2 e 15,5 mmol O₂/g biomassa.h. Para o cultivo de *Xanthomonas campestris* NRRL 1775 para produção de goma xantana, os valores de *Q_{O2}* variaram de 2 a 15 mmol O₂/g biomassa.h, sendo o máximo valor observado em torno de 5 h de cultivo (GARCÍA-OCHOA; CASTRO; SANTOS, 2000). Richard e Margaritis (2003b) também obtiveram um pico de *Q_{O2}* no início de cultivo, porém ele ocorreu em 9 h produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* IFO 3335. O valor de *Q_{O2}* de 106 mmol O₂/g biomassa.h obtido pelos

autores foi bem superior ao reportado para outras bactérias (GARCÍA-OCHOA et al., 2010), incluindo os resultados obtidos neste trabalho.

A taxa específica de consumo de oxigênio é característica para cada microrganismo e apresenta um pico estreito entre a fase de latência e o início da fase exponencial, conforme mostrado por Garcia-Ochoa et al. (2010). Os resultados apresentados nas Tabela 4.5 e Tabela 4.6 para os cultivos de *Bacillus subtilis* BL 53 parecem acompanhar esse padrão, porém um perfil mais consistente só pode ser obtido com a realização de mais medidas. Neste caso, seria necessária a utilização de outros métodos para a determinação do Q_{O_2} , uma vez que o Método Dinâmico, utilizado neste trabalho, não permite a realização de um grande número de medidas sem interferência no curso normal do processo; além disso, sua utilização é inviável quando o oxigênio dissolvido atinge níveis muito baixos.

4.6.3 Velocidade de agitação e k_La

O coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) foi determinado utilizando a Equação 3.3, considerando a porção ascendente da curva da Figura 4.10. Com auxílio do *software MATLAB*, foi calculado e representado graficamente o $\ln\left(\frac{\bar{C} - C_i}{\bar{C} - C_k}\right)$ versus $(t_k - t_i)$, conforme mostrado na Figura 4.11. Onde, i e k são índices que representam vários pontos tomados na porção ascendente da curva e \bar{C} é a concentração estacionária de oxigênio dissolvido após realização do Método Dinâmico. Através da inclinação da reta obtida pela regressão linear dos vários pontos do gráfico da Figura 4.11, os valores de k_La foram calculados.

$$k_La = \frac{\ln\left(\frac{\bar{C} - C_i}{\bar{C} - C_k}\right)}{t_k - t_i} \quad \text{Equação 3.3}$$

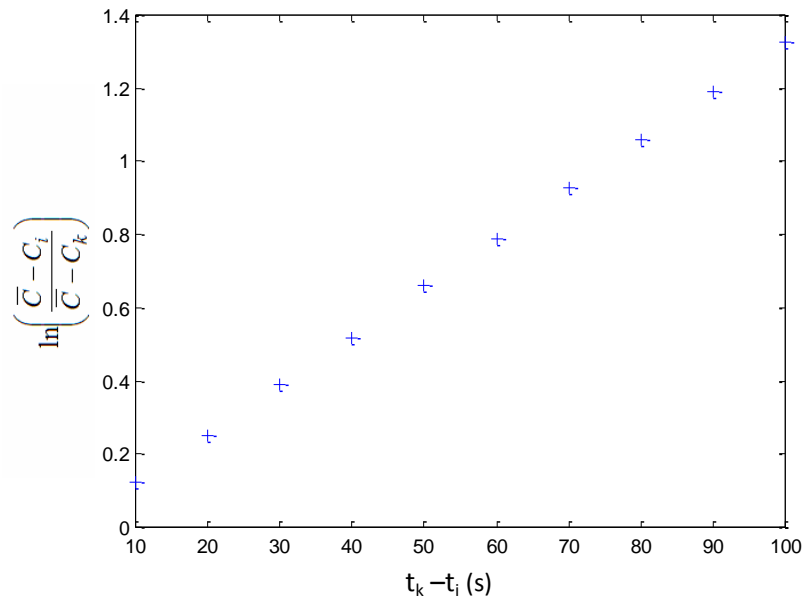


Figura 4.11 Gráfico típico para a determinação do k_La , obtido a partir dos dados experimentais do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53

O k_La foi determinado nas primeiras horas de cultivo do *Bacillus subtilis* BL53 para ensaios conduzidos em biorreator a uma taxa de aeração de 2 vvm e velocidade de agitação de 500, 750 e 1000 rpm. Na Figura 4.12, para melhor visualização do resultado obtido, o k_La é apresentado de duas formas distintas: (a) em função da velocidade de agitação e (b) em função do tempo de cultivo. Como pode ser observado, há nitidamente uma correlação entre k_La , velocidade de agitação e tempo. O k_La aumenta com o acréscimo da velocidade de agitação e diminui a medida que aumenta o tempo de cultivo. O maior valor de k_La é 210 h^{-1} e foi obtido a 1000 rpm num tempo de 3 h de cultivo, enquanto que 38 h^{-1} é o menor valor que foi obtido a 500 rpm e 8 horas de cultivo.

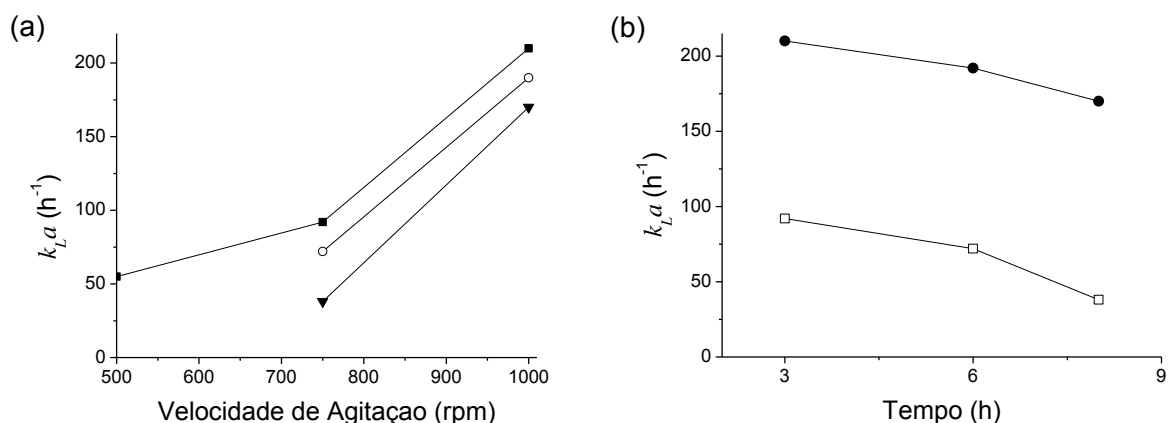


Figura 4.12 Coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_La) para cultivos de *Bacillus subtilis* BL53 (a) em função da velocidade de agitação para 3 h (■), 6 h (○) e 8 h (▼) de cultivo e (b) em função do tempo de cultivo para velocidades de agitação de 750 (□) e 1000 rpm (●).

Considerando o tempo de cultivo de 3 h na Figura 4.12a, o acréscimo na velocidade de agitação de 500 para 1000 rpm provocou um aumento de aproximadamente 4 vezes no valor de k_La , passando de 53 para 210 h^{-1} . Bandaiphet e Prasertsan (2006) estudaram a influência da agitação sobre o k_La na produção de um exopolissacarídeo por *Entobacter cloacae* e também observaram um aumento no valor desse parâmetro quando a agitação era incrementada. Naquele trabalho, o acréscimo de 500 para 1200 rpm provocou um aumento de cerca de 9 vezes no valor do k_La , sendo que o aumento provocado pelo incremento na taxa de aeração foi bem menos expressivo. O comportamento do k_La evidenciado no presente estudo e no trabalho de Bandaiphet e Prasertsan (2006) está de acordo com o descrito anteriormente por Doran (1995), isto é, em condições típicas de operação, o aumento na velocidade de agitação provoca um aumento no valor do k_La devido a captura das bolhas de gás sob as pás do agitador que é disperso gradualmente através do meio líquido.

O decréscimo do k_La com o tempo de cultivo, observado na Figura 4.12b, provavelmente ocorre devido ao aumento da viscosidade do meio decorrente da produção de γ -PGA. Segundo Garcia-Ochoa et al. (2010), a viscosidade de meios para

produção de biopolímeros aumenta drasticamente ao longo do cultivo, provocando um aumento na resistência à transferência de massa, ou seja, diminuindo o k_La .

Richard e Margaritis (2003b) mediram o k_La ao longo do cultivo de *Bacillus subtilis* IFO 3335 na produção de γ -PGA, mas não avaliaram a influência de diferentes velocidades de agitação. Em cultivo conduzido em biorreator a 2 vvm e 700 rpm, aqueles autores encontraram um k_La de 80 h^{-1} em 8 h (primeira medida) e um pico de 154 h^{-1} em 24 h de cultivo (final da fase exponencial) com 5 g /L de γ -PGA. Como será visto mais adiante, a fase exponencial dos cultivos de *Bacillus subtilis* BL 53 ocorreu um pouco antes e quantidades apreciáveis de γ -PGA já haviam sido obtidas no final desta fase; em 750 rpm, a produção de γ -PGA foi superior a 5 g/L em 12 horas. A maior concentração do biopolímero no meio (e a maior de viscosidade) provavelmente explique os menores valores de k_La obtidos para 8 h de cultivo por *Bacillus subtilis* BL 53 em relação aos resultados de Richard e Margaritis (2003b). Além disso, a composição diferenciada dos dois meios de cultivo e as características intrínsecas de cada uma das linhagens contribuem para a obtenção de resultados diferentes.

4.6.4 Velocidade de agitação e viabilidade celular

Na Figura 4.13 são mostradas as curvas de crescimento para o *Bacillus subtilis* BL53 cultivado a 37°C em biorreator operando com taxa de aeração de 2 vvm e diferentes velocidades de agitação. Para as três condições de agitação, uma concentração de células viáveis em torno de 10^9 UFC/mL foi atingida após 36 horas, não havendo perda de viabilidade celular até o término do cultivo (96 h), mesmo em altas velocidades de agitação. Esses resultados estão em acordo com Cromwick, Birrer e Gross (1996) que encontram igual concentração de células viáveis na fase estacionária do cultivo de *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A e relataram a não existência de perdas significativas da viabilidade celular. Porém, naquele trabalho a aeração foi mantida em condições mais brandas (0,5 vvm e 250 rpm).

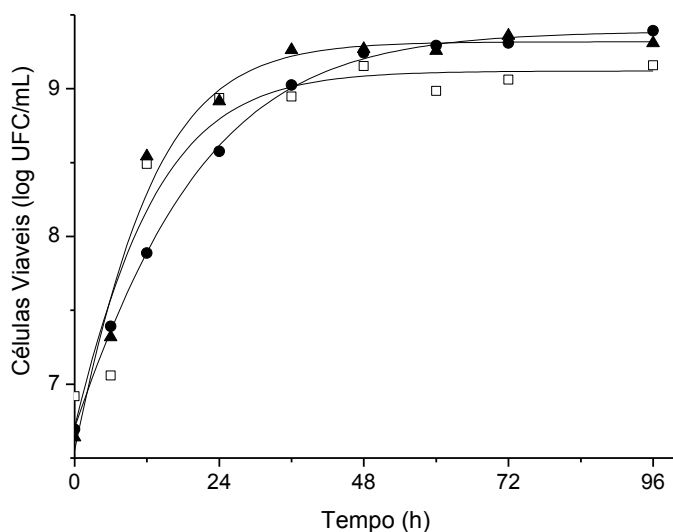


Figura 4.13 Teor de células viáveis durante a produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53 para cultivos conduzidos a 2 vvm e velocidades de agitação de 500 rpm (●), 750 rpm (□) e 1000 rpm (▲)

Em muitos processos, a transferência de oxigênio controla o crescimento microbiano, podendo afetar a evolução de processos biológicos (GARCIA-OCHOA et al., 2010). Para melhor avaliar esse efeito, neste trabalho, os dados de contagem de células viáveis foram ajustados ao Modelo de Crescimento Logístico (ZWIETERING et. al., 1990), apresentado no Capítulo 3. Os parâmetros cinéticos X_{max} , μ_{max} e t_c , obtidos através do ajuste, fornecem informações úteis sobre a cinética de cultivo e permitem comparar as três velocidades de agitação utilizadas. X_{max} representa o máximo valor de células viáveis (X) que se apresenta como um patamar na curva de crescimento (fase estacionária), μ_{max} é a máxima velocidade específica de crescimento (obtida na fase exponencial) e t_c corresponde ao tempo no qual a $\mu = \mu_{max}/2$, fornecendo uma estimativa do tempo no qual ocorre a transição entre a fase exponencial e a estacionária. Na Tabela 4.7 são mostrados os parâmetros ajustados para cada velocidade de agitação, bem como o coeficiente de determinação R^2 .

Tabela 4.7 Ajuste das curvas de crescimento ao Modelo Logístico e respectivos parâmetros

Velocidade de agitação (rpm)	X_{max} (log UFC/mL)	μ_{max} (h^{-1})	t_c (h)	R^2
500	9,39	0,062	15	0,999
750	9,11	0,095	11	0,904
1000	9,31	0,102	8,4	0,974

Como pode ser observado na Tabela 4.7, o aumento na velocidade de agitação claramente influenciou os parâmetros cinéticos de crescimento do *Bacillus subtilis* BL53. Quanto maior foi a agitação empregada maior foi a velocidade específica de crescimento (μ_{max}) na fase logarítmica e menor o tempo para o alcance da fase estacionária. Ao aumentar a velocidade de agitação de 500 para 750 rpm houve um aumento na velocidade específica de crescimento em cerca de 35 %, sendo que de 750 para 1000 rpm o aumento foi 10%. No entanto, a quantidade final de microrganismos praticamente não foi alterada, sendo ligeiramente menor em 750 rpm refletindo a menor concentração de oxigênio dissolvido na fase estacionária (Figura 4.8).

Bajaj e Singhal (2010) também reportaram o efeito positivo do aumento da velocidade de agitação sobre a produção de biomassa celular (biomassa celular seca) de *Bacillus licheniformis* NCIM 2324, obtendo maiores resultados quando operaram a 1 vvm e 1000 rpm. No entanto, esses autores não avaliaram viabilidade celular e não chegaram a calcular parâmetros cinéticos. O impacto do aumento da agitação sobre a velocidade específica de crescimento está diretamente relacionado ao aumento de transferência de massa (k_{La}) na fase exponencial, que propicia uma maior disponibilização de oxigênio aos microrganismos, intensificando o metabolismo aeróbio, como observado pelo aumento da taxa global de consumo de oxigênio (*OUR*). Além disso, uma agitação vigorosa propicia a homogeneização do meio de cultura e suprimento adequado de nutrientes às células mesmo em caldos de cultivo altamente viscosos (GARCIA-OCHOA et al., 2010; BAJAJ; SINGHAL, 2010).

A correlação existente entre disponibilidade de oxigênio (agitação) e crescimento microbiano na fase exponencial pode ser verificada através da observação da Figura 4.9 e dos parâmetros cinéticos mostrados na Tabela 4.7. Quanto mais abrupto foi o declínio na concentração de oxigênio dissolvido nas primeiras horas de cultivo, tanto menor foi a velocidade específica de crescimento e maior o tempo de duração da fase exponencial. A queda da concentração de oxigênio dissolvido desacelera o metabolismo aeróbico, diminuindo a inclinação da curva de crescimento exponencial e ampliando o tempo de duração desta fase, já que o número final de microrganismos praticamente não se altera.

Após a entrada na fase estacionária, o metabolismo microbiano diminui e a concentração de oxigênio dissolvido tende a aumentar. Esse aumento na concentração de oxigênio dissolvido pode ser claramente observado para as velocidades de 500 e 1000 rpm na Figura 4.8, coincidindo com um tempo ligeiramente superior a duas vezes o valor de t_c (Tabela 4.7), estimado como final da fase exponencial de acordo com o modelo cinético.

4.6.5 Velocidade de agitação e produção do γ -PGA

A influência de diferentes velocidades de agitação sobre a produção de γ -PGA já foi investigada anteriormente para cultivos de *Bacillus licheniformis*, mas esta é a primeira vez que se faz este tipo de estudo para *Bacillus subtilis*. Na Figura 4.14 são mostradas as curvas de produção de γ -PGA e na Figura 4.15 são mostradas as curvas de produtividade do polímero por *Bacillus subtilis* BL53 em cultivo conduzido em biorreator a 37 °C, com taxa de aeração de 2 vvm e diferentes velocidades de agitação.

É possível perceber através da Figura 4.14, que o aumento na velocidade de agitação conduz a uma maior produção de γ -PGA, pelo menos até 48 h de cultivo, após esse período, ocorre uma estabilização na concentração de γ -PGA para o cultivo conduzido a 1000 rpm. Ainda assim, nos cultivos conduzidos a 500 e 750 rpm não

parece haver inibição da produção de γ -PGA em decorrência de baixas concentrações de oxigênio dissolvido, mesmo em situações onde a concentração ficou abaixo de 10%, como mostrado na Figura 4.8.

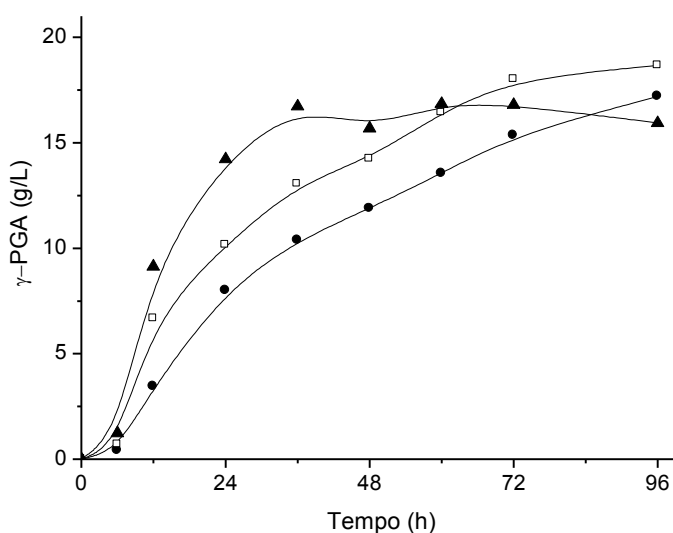


Figura 4.14 Produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53 para cultivos conduzidos a 2 vvm e velocidades de agitação de 500 rpm (●), 750 rpm (□) e 1000 rpm (▲)

Em bioprocessos aeróbicos, o oxigênio é um substrato fundamental empregado tanto para a manutenção do crescimento microbiano quanto em outras vias metabólicas, incluindo a síntese de produtos (GARCIA-OCHOA et al., 2010). Por isso, todas as estratégias utilizadas para melhorar a transferência de oxigênio devem *a priori* contribuir para o aumento de rendimento e produtividade dos cultivos.

O trabalho de Cromwick, Birrer e Gross (1996) foi o primeiro a investigar a influência do uso de diferentes condições de aeração/agitação sobre a produção de γ -PGA. Esses autores testaram duas condições (0,5 vvm / 250 rpm e 1 vvm / 800 rpm) para cultivos de *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A e conseguiram dobrar a produção do polímero, utilizando a condição de maior aeração, na qual também verificaram um decréscimo na concentração de γ -PGA ao final da fase estacionária. Recentemente, Bajaj

e Singhal (2010) retornaram à temática ampliando a faixa de avaliação das condições de aeração e agitação utilizadas no cultivo do *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. Esses autores também verificaram o aumento na concentração de γ -PGA pelo aumento da agitação e em menor grau pelo aumento da aeração. Em condições de intensa agitação combinada com baixa aeração e vice-versa foram obtidas as menores produções. Porém, naquele estudo o k_{La} não foi calculado, não sendo possível maiores considerações a respeito da transferência de oxigênio.

No presente trabalho, o k_{La} foi calculado para cada uma das três condições de agitação empregadas nos cultivos de *Bacillus subtilis* BL53. A comparação da produção de γ -PGA para cada velocidade de agitação (Figura 4.14) com os respectivos coeficientes de transferência de oxigênio (k_{La}) (Figura 4.12), permite concluir que um maior k_{La} na fase exponencial conduz a uma maior produção de γ -PGA. Além disso, verifica-se que à medida que a fase exponencial se estende, menores são os valores de k_{La} medidos para cada cultivo. Esse decréscimo no valor de k_{La} está relacionado com o aumento da produção de γ -PGA decorrente do aumento da viscosidade do meio já nas primeiras horas de cultivo, quando inclusive ocorrem as maiores produtividades, como observado na Figura 4.15. A correlação entre k_{La} e produção de polímero já foi documentada anteriormente por Borges et al. (2008) e García-Ochoa, Castro e Santos (2000) para a goma xantana, que observaram que o aumento de k_{La} decorre do aumento da velocidade de agitação e sua diminuição está associada com o aumento da concentração de polímero formado.

As maiores produtividades de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53 foram obtidas em 12 horas de cultivo, sendo que maiores valores foram obtidos quando foram empregadas maiores velocidades de agitação (maior transferência de oxigênio). A máxima produtividade de γ -PGA obtida a 1000 rpm foi aproximadamente 0,8 g/L.h, sendo superior a maior produtividade obtida por Cromwick, Birrer e Gross (1996) para cultivo de *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A e de Bajaj e Singhal (2010) para *Bacillus licheniformis* NCIM 2324

e semelhante à máxima produtividade referida por Richard e Margaritis (2003b) para *Bacillus subtilis* IFO 3335. Porém, no presente trabalho a maior produtividade de γ -PGA ocorreu bem antes do tempo relatado por outros autores. A alta produtividade de γ -PGA já nas primeiras horas de cultivo pode explicar a queda tão abrupta na concentração de oxigênio dissolvido, conforme referido anteriormente neste trabalho.

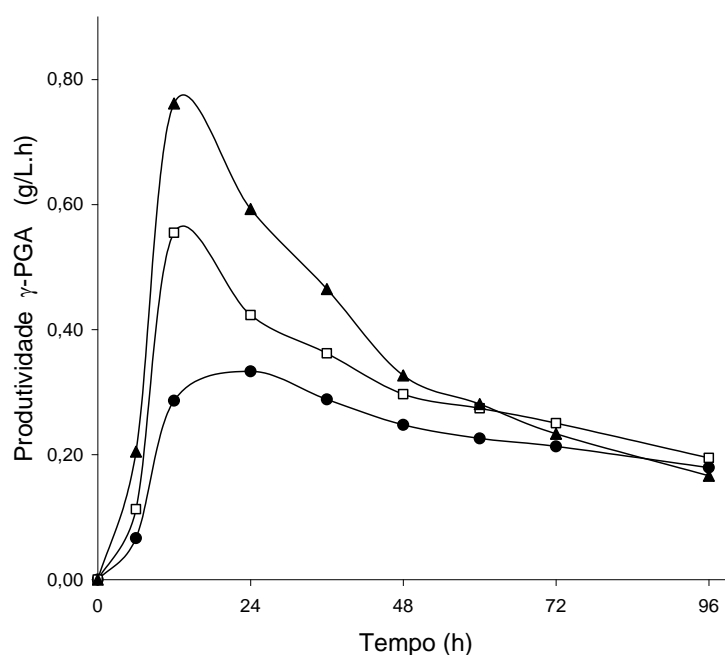


Figura 4.15 Produtividade de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53 para cultivos conduzidos a 2 vvm e velocidades de agitação de 500 rpm (●), 750 rpm (□) e 1000 rpm (▲)

A tendência a redução na produtividade de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL 53 ao longo do cultivo está relacionada com o aumento da concentração do polímero (aumento da viscosidade do meio) e a conseqüente redução da transferência de oxigênio. Já o declínio mais acentuado na curva de 1000 rpm após as 48 h pode ser decorrente de um outro efeito, que pode ser melhor compreendido através da Figura 4.14. A redução na produção e na produtividade de γ -PGA após 48 horas pode ser um indício da degradação de polímero devido às altas tensões de cisalhamento provocadas pela intensa agitação, uma vez que o mesmo efeito não foi observado nos cultivos conduzidos a 500 e 750 rpm.

Esse efeito já foi documentado na produção de outros polímeros como goma xantana (CASAS; SANTOS; GARCÍA-OCHOA, 2000), goma gelana (GIAVASIS; HARVEY; MCNEIL, 2006) e para um exopolissacarídeo produzido por *Enterobacter cloacae* (BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006). No entanto, convém também não descartar, no caso específico do γ -PGA, a influência das depolimerases, cuja atividade é induzida em condições de depleção de fontes de carbono e/ou aumento de concentração de γ -PGA, durante a fase estacionária (CROMWICK, BIRRER; GROSS, 1996), com o consumo do polímero como fonte de reserva (KIMURA et al., 2004). Outra hipótese levantada por Bandaipheth e Prasertsan (2006) é de que a redução na produção de metabólitos em cultivos intensamente agitados estaria relacionada à deformação e injúria celular como resultado da exposição a altas tensões de cisalhamento, o que levaria a inibição do crescimento e da atividade metabólica através do bloqueio no transporte de nutrientes e consumo pela célula.

As considerações feitas a respeito da produção e produtividade do γ -PGA nos cultivos de *Bacillus subtilis* BL53 sugerem a existência de uma condição ótima de operação para a produção desse polímero, situada em torno de 36 a 48 h para o cultivo conduzido a 2 vvm e 1000 rpm, visto que após esse momento não há mais aumento da produção que justifique continuidade do processo. Considerando a estratégia utilizada para melhorar a transferência de oxigênio, verifica-se que o tempo de cultivo pode ser reduzido em cerca de 50% ao aumentar a velocidade de agitação de 500 para 1000 rpm, representando uma economia no custo do processo. É claro que é necessário também considerar o impacto do aumento da velocidade de agitação sobre o custo final do processo, bem como as implicações operacionais de empregar uma agitação tão intensa em cultivos de maior escala. Neste sentido, o escalonamento baseado no critério da manutenção do $k_L a$ constante seria a estratégia mais adequada, uma vez que esse é o critério mais utilizado para ampliação de escala em processos aeróbios, principalmente naqueles que envolvem alta demanda de oxigênio, como é o caso da produção de γ -PGA.

4.7 Potencialidades para produção de γ -PGA utilizando resíduos industriais

Paralelamente aos cultivos submersos realizados com Caldo E, foi feita uma avaliação preliminar para a utilização de resíduos industriais como substratos para a produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53. Dentre os resíduos disponíveis industrialmente, selecionou-se o resíduo fibroso de soja e o glicerol residual de biodiesel. Esses resíduos foram escolhidos em decorrência de sua composição que representava potencial para uso na produção de γ -PGA; e também, em decorrência do tamanho da indústria de processamento de soja e de biodiesel no Brasil, o que representaria abundância no fornecimento desses resíduos.

4.7.1 Cultivo submerso utilizando glicerol residual de biodiesel

Em cultivo submerso, o glicerol é o componente majoritário dos meios para produção de γ -PGA. O glicerol também é o principal subproduto da produção do biodiesel, sendo gerado numa proporção de 10 para 90 partes em volume do total produzido em biodiesel. Segundo previsões de especialistas, o volume desse resíduo tende a aumentar no Brasil nos próximos anos, principalmente em decorrência dos incentivos para a produção de combustíveis de origem alternativa ao petróleo. Em 2004, o Governo Federal instituiu o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel, que prevê que este biocombustível seja adicionado ao diesel fóssil. Em 2008, o diesel comercializado em todo território nacional passou a conter, obrigatoriamente, 3% de biodiesel (B3) e para 2013 está previsto o aumento deste percentual para 5% (B5) (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009).

Tanto no Brasil como no resto do mundo, o aumento dos excedentes de glicerol oriundo de biodiesel tem levado a uma saturação no mercado, uma vez que os usos convencionais de glicerol não conseguem absorver todo o volume extra gerado, resultando na diminuição expressiva dos preços mundiais desse insumo, conforme

reportado por Johnson e Taconi (2007). Deste modo, havendo viabilidade técnica, a utilização de glicerol residual se constituiria numa alternativa interessante para a produção de γ -PGA e também agregaria valor a cadeia de biodiesel.

Com o objetivo de verificar a possibilidade de substituição do glicerol P.A. por glicerol residual de biodiesel na composição do Caldo E, foram conduzidos cultivos em frascos de 125 mL em agitador orbital (*shaker*) a 180 rpm, com percentagem de inóculo de 4%. Os cultivos foram avaliados por 96 h e empregaram as condições ótimas obtidas no DCCR, sendo realizados em duplicata. Foi considerado o grau de pureza do glicerol residual, a fim de se adicionar quantidade idêntica à prevista na formulação do meio convencional. O laudo do glicerol residual utilizado é mostrado no Apêndice B.

Como observado através do gráfico da Figura 4.16, a substituição de glicerol P.A. por glicerol residual é alternativa viável tecnicamente, porém as concentrações de γ -PGA obtidas utilizando glicerol residual foram um pouco menores do que aquelas obtidas para o cultivo com meio convencional. Isso pode ter ocorrido em decorrência da presença de compostos inibidores de microrganismos, geralmente presentes em glicerol residual obtido a partir da síntese química de biodiesel. De acordo com Johnson e Taconi (2007), o glicerol bruto gerado durante a produção de biodiesel contém impurezas tais como o álcoois, sais, metais pesados e água. No entanto, em 72 h, os dois cultivos apresentaram concentrações semelhantes de γ -PGA, dando indícios que o efeito inibitório não é tão deletério para a produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53.

Os resultados obtidos apontam para a possibilidade da utilização do glicerol residual em meios de cultivo para a produção de γ -PGA. Isto é particularmente importante, se for considerado que o glicerol é um componente adicionado em maior quantidade ao meio de cultivo e que existe grande disponibilidade de glicerol residual oriundo de plantas processadoras de biodiesel no Brasil. De acordo com Mota, Silva e Gonçalves (2009), estima-se uma produção de cerca de 100 mil toneladas de glicerina

por ano com a entrada do B3 em 2008 e cerca de 250 mil toneladas a cada ano são projetadas, a partir de 2013, com a introdução do B5.

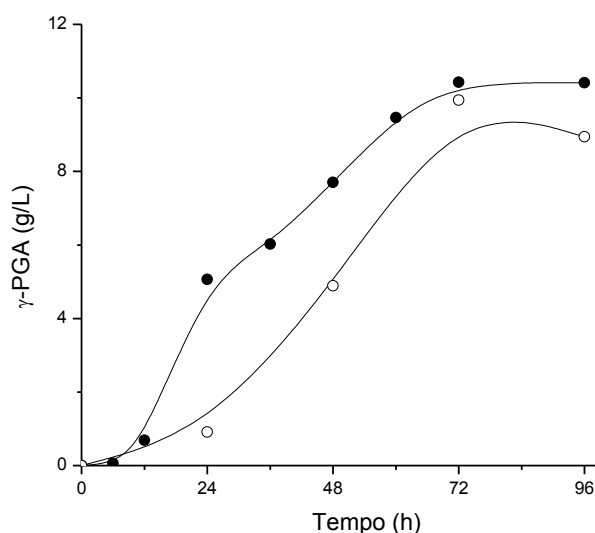


Figura 4.16 Produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53, sob condições otimizadas pelo DCCR, conduzidos em agitador orbital a 180 rpm, utilizando meio de cultivo com glicerol P.A. (●) e glicerol residual de biodiesel (○)

No que se refere às impurezas que acompanham o glicerol bruto, atenção deve ser prestada principalmente no caso de uso do γ -PGA produzido para fins alimentícios e farmacêuticos. Neste caso, deve se preferir o uso de glicerol residual purificado de custo de aquisição mais elevado; ou ainda, recorrer a processos de purificação pós-cultivo capazes de remover as impurezas que ainda restem no produto final.

4.7.2 Cultivo em estado sólido utilizando o resíduo fibroso de soja

Segundo dados da FAO (2010), o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja com aproximadamente 57 milhões de toneladas produzidas em 2009, ficando somente atrás dos Estados Unidos que produziu cerca de 91 milhões de toneladas dessa oleaginosa no mesmo período. Em 2009, o Rio Grande do Sul produziu em 2009 quase 9 milhões de toneladas de soja, ficando atrás de Mato Grosso e Paraná (IBGE, 2009).

Do total da soja produzida no Brasil em 2009, aproximadamente 50% foi exportada na forma de grãos, segundo dados da ABIOVE (2010), sendo o restante (cerca de 28 milhões de toneladas) processado em território brasileiro. O processamento industrial da soja, em linhas gerais, objetiva a extração do óleo e a obtenção da proteína isolada. Para obtenção de proteína isolada é gerada uma grande quantidade de resíduos fibrosos. O resíduo fibroso de soja (RFS) é constituído principalmente por proteína insolúvel, hemicelulose e celulose, representando respectivamente 28, 23 e 16% em base seca (HECK; HERTZ; AYUB, 2002).

O RFS foi utilizado como substrato para cultivo de estado sólido por Heck et al. (2005), Soares, Assmann e Ayub (2003) e Heck, Hertz e Ayub (2002) na produção de celulase, xilanase e transglutaminase. Os resultados obtidos por estes autores demonstraram o potencial do RFS para a obtenção de outros bioprodutos, sendo, portanto esse o resíduo testado nesta etapa do trabalho. Salienta-se ainda que em países asiáticos a soja é amplamente utilizada para a produção do Natto, produto rico em γ -PGA produzido pelo cultivo de linhagens específicas de *Bacillus subtilis*.

Nos cultivos realizados no presente trabalho, o RFS foi utilizado como substrato base. O teor de umidade original do RFS é 10%, porém meio líquido foi adicionado ao RFS, conforme descrito no item Metodologia, com o objetivo de elevar o conteúdo de umidade do substrato, tamponar o meio e/ou e fornecer nutrientes. Ao RFS do cultivo designado como CES1 foi adicionada solução salina tamponada (pH 7,0), sendo que ao RFS do CES2 utilizou-se o meio Bushnell-Hass modificado (pH 7,0). Além da composição convencional, o meio Bushnell-Hass modificado apresenta ácido-glutâmico e cátion Mn^{2+} , conforme descrito no capítulo de Metodologia.

Na Figura 4.17 é apresentada a produção de γ -PGA a partir de cultivo de *Bacillus subtilis* BL 53 sobre o resíduo fibroso de soja (RFS) adicionado de solução salina (CES1) e de meio Bushnell-Hass modificado (CES 2). Os cultivos foram conduzidos a 37°C em

biorreatores cilíndricos de vidro e uma aeração de 250 mL/min foi fornecida em fluxo ascendente através do leito.

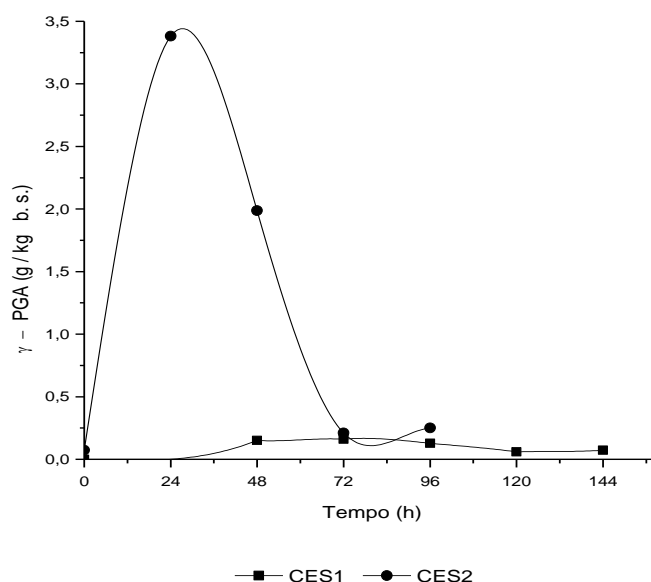


Figura 4.17 Efeito da adição do meio Bushnell-Hass modificado na produção de γ -PGA a partir de cultivo de *Bacillus subtilis* BL53 sobre RFS, a 37 °C, aeração de 250 mL/min (■) CES1 (RFS e solução salina tamponada), (●) CES2 (RFS e meio Bushnell-Hass modificado)

É possível observar através da Figura 4.17 a influência da adição do meio Bushnell-Hass modificado na produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53. Ambos os meios CES1 e CES2 tinham como base o resíduo fibroso de soja (RFS), no entanto, enquanto no primeiro foi adicionada solução salina tamponada como meio líquido, no segundo um meio mais rico contendo ácido glutâmico e minerais foi utilizado. A adição de nutrientes ao substrato de RFS (CES2) tornou possível a produção de γ -PGA. Diversos autores relatam a importância da presença de ácido glutâmico e de cátions divalentes para a biosíntese de ácido γ -poliglutâmico, sendo a produção desse polímero altamente dependente da composição do meio utilizado.

Os monômeros incorporados ao polímero de γ -PGA podem ser provenientes do meio de cultivo ou podem ser sintetizados a partir de precursores oriundos do ciclo do ácido cítrico (TCA) (YOON; LEE, 2002). Considerando a composição complexa do RFS não é possível afirmar com certeza a origem os monômeros utilizados para a polimerização do γ -PGA no cultivo CES2, mas muito provavelmente a origem é o meio Bushnell-Hass modificado. Ainda assim, a adição de ácido cítrico ao meio de cultivo poderia representar um aumento na produção de γ -PGA, à medida que uma rota metabólica geradora de ácido glutâmico endógeno também pudesse ser utilizada para o fornecimento desse monômero.

O mecanismo de polimerização do γ -PGA proposto por Ashiuchi, Soda e Misono (1999) envolve a ação do complexo enzimático γ -PGA-sintetase (PgsBCA), associado à membrana celular. Os mesmos autores mostraram que a atividade do complexo PgsBCA está intimamente ligada à presença dos íons Mn^{2+} Mg^{2+} , considerados cofatores. Deste modo, o aumento na produção de γ -PGA obtido com o meio CES2 também pode ter resultado da adição dos sais de Mn^{2+} e Mg^{2+} .

Mesmo a produção de γ -PGA tendo aumentado grandemente do meio de cultivo CES1 para o meio CES2, a quantidade obtida ainda é pequena quando comparada às obtidas por outros autores utilizando cultivo de estado sólido (OH et al., 2007; CHEN et al., 2005a; CHEN et al., 2005b). No entanto, esses autores utilizaram meios mais enriquecidos e conduziram os cultivos com pequena quantidade de substrato em frascos com grande área superficial com aeração natural.

O meio CES2 é relativamente pobre em fontes de carbono prontamente assimiláveis (o teor de açúcares redutores da RFS é de apenas 2%) o que pode ter restringido o crescimento microbiano e induzido a degradação do γ -PGA por hidrolases, no final da fase estacionária, conforme indicado por Kimura et al. (2004) e Richard e Margaritis (2003b). Esse último aspecto justificaria também o decréscimo na

concentração de γ -PGA após 24 horas. Vale ainda salientar, que o γ -PGA é um composto de reserva para precursores de carbono e de nitrogênio ou fonte de energia (SCHREIER, 1993 apud CANDELA; FOUET, 2006), podendo ser degradado com essa finalidade.

Outra hipótese que poderia explicar a baixa produção de γ -PGA nos cultivos é a insuficiência da aeração fornecida ao leito de substrato. Como já evidenciado para os cultivos submersos de *Bacillus subtilis* BL53, a transferência de oxigênio é um fator importante na produção do γ -PGA, sendo, portanto esperado que a aeração aplicada ao substrato sólido apresente similar importância na produção desse polímero em cultivos de estado sólido.

Observações realizadas durante os cultivos dão indícios da aeração ineficiente, como por exemplo, o crescimento irregular da biomassa microbiana (visualização de crescimento característico somente em regiões mais expostas ao fluxo de ar) e a geração de odores desagradáveis, lembrando a ácido acético. Shih e Van (2001) reportaram a secreção de ácido acético e acetoína (2,3 butanediol) em meios de cultivo de *B. licheniformis*. A presença de acetoína é um indicativo de que o nível de oxigênio do meio não é suficiente para suportar um metabolismo completamente aeróbico (CROMWICK; BIRRER; GROSS, 1996). Oh et al. (2007) também observaram a geração de odores desagradáveis após 24 h de cultivo em estado sólido do *B. subtilis* KU-A e do *B. subtilis* GT-D, sobre o substrato constituído principalmente de torta de soja. Por esse motivo, aqueles autores consideraram limitante a utilização de cultivos de mais de 24 h para produção de γ -PGA para fins alimentícios.

Segundo Raghavarao, Ranganathan e Karanth (2003), o cultivo de estado sólido (CES) é freqüentemente mais simples e necessita de menores requisitos energéticos do que o cultivo submerso. No entanto, há desvantagens como dificuldades de transporte de massa e de calor através do meio e a carência de sensores e de técnicas eficientes específicas para o controle do processo, principalmente em operações contínuas.

Os resultados obtidos sugerem portanto a necessidade da realização de estudos mais aprofundados para suplementação de nutrientes ao RFS e para a melhoria das condições de aeração de forma a aumentar a produção de γ -PGA em cultivo de estado sólido. A utilização de biorreator do tipo tambor rotativo também parece ser uma boa alternativa para esse tipo de cultivo. Além disso, é necessário que se faça uma avaliação dos gastos com a suplementação de nutrientes.

4.7.3 Considerações sobre a utilização de resíduos industriais para a produção de γ -PGA

A utilização de resíduos de baixo valor comercial como substrato ou componente de meios de cultivo é uma das formas de se reduzir os custos de produção em bioprocessos. Tanto o glicerol residual de biodiesel quanto o resíduo fibroso de soja mostraram-se resíduos promissores para emprego em cultivos para a produção de γ -PGA. Porém é necessária a realização de estudos mais detalhados de forma a se obter produções competitivas em comparação ao uso de meios de cultivo convencionais.

Além do glicerol residual de biodiesel e do resíduo fibroso de soja, devem merecer atenção e requerem igualmente estudos aprofundados os resíduos da industrialização de cítricos e o soro de queijo proveniente da indústria de laticínios. O primeiro por apresentar em sua composição o ácido cítrico e o segundo pelo fornecimento de aminoácidos, em especial o ácido glutâmico, glutamina e arginina que são essenciais para produção de γ -PGA de alta massa molecular, conforme descrito por Ashiuchi et al. (2001b).

Capítulo 5

Conclusão

Este trabalho estudou a produção de ácido γ -poliglutâmico a partir do cultivo de uma nova linhagem de *Bacillus* isolada de ambiente amazônico, o *Bacillus subtilis* BL53. Através dessa investigação foi possível aprofundar o conhecimento relativo à produção desse biopolímero, que é um dos mais promissores da indústria de biomateriais. As principais contribuições desse trabalho dizem respeito à identificação de uma nova linhagem produtora de γ -PGA e à otimização de condições operacionais para seu cultivo, em especial aos aspectos relacionados à transferência de oxigênio. Outra contribuição está relacionada à avaliação preliminar para o aproveitamento de resíduos gerados pelas indústrias brasileiras para a produção de γ -PGA. Deste modo, as principais conclusões obtidas durante o desenvolvimento desse trabalho são agora apresentadas.

Das bactérias testadas, cinco linhagens isoladas de ambiente amazônico mostraram capacidade de produzir γ -PGA quando cultivadas em Caldo E. A linhagem BL53 foi aquela que apresentou a maior produção e produtividade em 96 h de cultivo a 37 °C. A análise da seqüência do gene 16S DNAr dessa linhagem e suas características bioquímicas permitiram sua identificação como *Bacillus subtilis* BL53.

A avaliação das condições para o cultivo submerso em agitador orbital da linhagem *Bacillus subtilis* BL53, realizada através do delineamento composto central rotacional (DCCR), apontou como ponto ótimo de produção de γ -PGA a temperatura de 37 °C, o pH inicial de 6,9 e a concentração de 1,22 mM de Zn^{2+} suplementada ao Caldo E. Nas condições otimizadas, a produção de γ -PGA foi igual a 10,4 g/L, cerca de três vezes maior do que a obtida em condições convencionais de cultivo em Caldo E.

A condução do processo de produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53 não exige controle rigoroso do pH, conforme evidenciado durante a realização de ensaios experimentais. Mesmo quando diferentes valores de pH inicial foram utilizados, o meio tendeu a um tamponamento, com valores entre 7,0 e 7,5, numa faixa favorável a produção do polímero.

A utilização de aeração e agitação na mudança de escala de produção do γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53, passando de frascos de 125 mL em agitador orbital para biorreatores de 5 L, aumentou a produção do biopolímero em mais de 70 %.

A produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* BL53 é altamente dependente da transferência de oxigênio, sendo que o teor de oxigênio dissolvido decai bruscamente nas primeiras 15 horas de cultivo, como resultado da elevada demanda de oxigênio pelas bactérias (*OUR*). No entanto, o aumento da velocidade de agitação no biorreator possibilita uma maior transferência de massa e maior disponibilidade de oxigênio no meio, que induz ao aumento na taxa de consumo de oxigênio pelas bactérias, conduzindo a maiores produções de γ -PGA.

No cultivo de *Bacillus subtilis* BL53 para produção de γ -PGA, o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}) aumenta com o acréscimo da velocidade de agitação e diminui ao longo da fase exponencial com o acréscimo na concentração de γ -PGA no meio. Em 3 h de cultivo com aeração de 2 vvm, a

intensificação da agitação de 500 para 1000 rpm provocou um aumento de aproximadamente 4 vezes no valor do k_{La} , passando de 53 para 210 h⁻¹. A comparação da produção de γ -PGA para cada velocidade de agitação mostrou que um maior k_{La} na fase exponencial conduz a uma maior produção de γ -PGA pelo cultivo.

A velocidade de agitação empregada no biorreator também influenciou os parâmetros cinéticos de crescimento do *Bacillus subtilis* BL53. Quanto maior foi a agitação empregada, maior foi a velocidade específica de crescimento na fase logarítmica (μ_{max}), porém a quantidade final de microrganismos praticamente não foi alterada. Uma concentração de células viáveis em torno de 10⁹ UFC/mL foi atingida na fase estacionária, não havendo perda de viabilidade celular até o término do cultivo (96 h), mesmo em altas velocidades de agitação.

O aumento na velocidade de agitação conduziu a uma maior produção de γ -PGA durante o cultivo, somente até 48 h. Após esse período, ocorre uma estabilização na concentração de γ -PGA em torno de 17 g/L, para o cultivo conduzido a 1000 rpm. Concentrações ligeiramente mais elevadas são observadas somente após 72 h para velocidades de agitação mais brandas. Deste modo, recomenda-se que o cultivo em biorreator do *Bacillus subtilis* BL53 para produção de γ -PGA seja conduzido com aeração de 2 vvm e velocidade de agitação de 1000 rpm. Utilizando essa estratégia de intensificação da transferência de oxigênio, o tempo de cultivo pode ser reduzido para menos de 48 h, cerca de 50% do tempo necessário para operação a 500 rpm, contribuindo assim para a diminuição de custos do processo.

Outra forma de se reduzir os custos de produção em bioprocessos é a utilização de resíduos de baixo valor comercial como substrato ou componente de meios de cultivo. Tanto o glicerol residual de biodiesel quanto o resíduo fibroso de soja, avaliados de forma preliminar neste trabalho, mostraram-se resíduos

promissores para a produção de γ -PGA, gerando possibilidades de investigação para trabalhos futuros.

A exploração racional da biodiversidade é a primeira etapa para o desenvolvimento de bioprocessos para obtenção de bioprodutos industrialmente importantes. A prospecção de substratos potenciais a partir de resíduos de baixo valor comercial também contribui para o sucesso desse desenvolvimento. No entanto, somente isto não basta, são necessários também a realização de estudos para a otimização das condições de cultivo e o enfrentamento de problemas operacionais baseado nos fundamentos da engenharia. O trabalho apresentado procurou abranger todos esses aspectos, dedicando maior atenção aos estudos de otimização das condições de cultivo e à melhoria da transferência de oxigênio durante a operação em biorreator.

Obviamente, a temática não se esgota aqui, muito pelo contrário. Esse trabalho tem a pretensão de servir como ponto de partida para outros, que venham a ele se somar de modo a ampliar o conhecimento nesta área. Os resultados aqui obtidos apontam para a viabilidade técnica da produção do γ -PGA por uma nova linhagem isolada a partir da biodiversidade brasileira. Espera-se que mais estudos na área também conduzam à viabilização econômica desse novo processo a partir do uso de resíduos de disponíveis em abundância no Brasil. Além do aproveitamento desses resíduos, a obtenção de um novo produto como o γ -PGA, poderia também agregar valor a grandes cadeias produtivas no Brasil, como a cadeia da soja e do biodiesel.

Capítulo 6

Perspectivas para continuidade do trabalho

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram a viabilidade da produção do γ -PGA por uma nova linhagem, o *Bacillus subtilis* BL53. O trabalho de pesquisa permitiu o contato com vários aspectos do desenvolvimento de bioprocessos, fazendo com que algumas perguntas fossem respondidas e muitas outras fossem levantadas. Os questionamentos surgidos da vivência e da prática experimental constituem-se em ferramentas valiosas para o surgimento de novas pesquisas e aprofundamento de estudos. Desse modo, são listadas a seguir as perspectivas para trabalhos futuros.

1) Estudo aprofundado do uso de resíduos para produção de γ -PGA, incluindo resíduos de biodiesel, resíduos do processamento de soja, soro de queijo e resíduos da industrialização de cítricos.

2) Caracterização do ácido γ -poliglutâmico através da determinação da massa molecular e avaliação detalhada do comportamento reológico.

3) Realização de estudo para ampliação de escala baseada na manutenção do valor de $k_L a$, levando a produção de γ -PGA para uma escala piloto.

4) Projeto de reatores diferenciados para a produção de γ -PGA em cultivo submerso, incluindo estudo de reatores com membranas.

5) Estudo de operações de purificação do γ -PGA tendo em vista as aplicações do produto.

6) Desenvolvimento de aplicações para o γ -PGA, em especial como ingrediente funcional em alimentos e material para elaboração de biofilmes.

Referências

AJINOMOTO. **Amino acids business**. Disponível em: <http://www.ajinomoto.com/ar/i_r/pdf/fact/amino_oct2005.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2006.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4. ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676 p.

ASHIUCHI, M. et al. Enzymatic synthesis of high molecular-mass poly- γ -glutamate and regulation of its stereochemistry. **Applied Environment Microbiology**, v. 70, p. 4249–4255, 2004.

ASHIUCHI, M. et al. Isolation of *Bacillus subtilis* (chungkookjang), a poly- γ -glutamate producer with high genetic competence. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 57, p. 764–769, 2001a.

ASHIUCHI, M. et al. Physiological and biochemical characteristics of poly- γ -glutamate synthetase complex of *Bacillus subtilis*. **European Journal Biochemical**, v. 268, p. 5321–5328, 2001b.

ASHIUCHI, M; SODA, K.; MISONO H. A poly- γ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: gene cloning and biochemical analysis of poly- γ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 263, n. 1, p. 6-12, 1999.

ASHIUCHI, M; MISONO, H. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 59, p. 9-14, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS (ABIOVE). **Exportações do complexo soja**. Disponível em: http://www.abiove.com.br/exporta_br.html. Acesso em: 13 out. 2010.

- BAJAJ, I. B.; SINGHAL, R. S. Effect of aeration and agitation on synthesis of poly(γ -glutamic acid) in batch cultures of *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 15, n. 4, p. 635-640, 2010.
- BANDAIPHET, C.; PRASERTSAN, P. Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, k_{La} in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 2, p. 216-228, 2006.
- BIRRER G.A.; CROMWICK A. M.; GROSS R. A γ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945A: physiological and biochemical studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 16, n. 5, p. 265-275, 1994.
- BORGES, C. D. et al. Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv pruni strain 101. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 40, p. 81-85, 2008.
- BOVARNICK, M. The formation of extracellular D(-)glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 145, p. 415-424, 1942.
- BUESCHER, J. M.; MARGARITIS, A. Microbial biosynthesis of polyglutamic acid biopolymer and applications in the biopharmaceutical, biomedical and food industries. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2007.
- BURKERT, J. F. M. et al. Comparison of lipase production by *Geotrichum candidum* in stirring and airlift fermenters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 61-67, 2005.
- CANDELA, T; FOUET, A. Poly- γ -glutamate in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1091-1098, 2006.
- CHEN, X et al. High yield of poly- γ -glutamic acid from *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation using swine manure as the basis of a solid substrate. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 17, p. 1872-1879, 2005a.
- CHEN, X. et al. Medium optimization by response surface methodology for poly- γ -glutamic acid production using dairy manure as the basis of a solid substrate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 69, p. 390–396, 2005b.
- CROMWICK, A. M.; GROSS, R. A. Effects of Manganese (II) on *Bacillus licheniformis* ATCC-9945A physiology and γ -poly(glutamic acid) formation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.17, n.5, p. 259-267, 1995.
- CROMWICK, A. M., BIRRER, G. A.; GROSS, R. A. Effects of pH and aeration on poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, p. 222-227, 1996.

DO, J. H.; CHANG, H. N.; LEE, S. Y. Efficient recovery of γ -poly(glutamic acid) from highly viscous culture broth. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 76, n. 3, p. 219-223, 2001.

DOBLE, M; KRUTHIVENTI, A.K.; GAIKAR, V. G. **Biotransformations and bioprocesses**. New York: Marcel Dekker, 2004. 371 p.

DORAN, P. M. **Bioprocess engineering principles**. London: Academic Press, 1995. 439 p.

DU, G. et al. Effects of glycerol on the production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 6, p. 2143-2147, 2005.

DUBOIS, M. et al. Colorimetric method of determination of sugars and related substrates. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **FAO Statistical Databases**. Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso: 12 out. 2010.

FOX et al. How close is close: 16s rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 166-170, 1992.

GARCÍA-OCHOA, F.; CASTRO, E. G.; SANTOS, V.E. Oxygen transfer and uptake rates during xanthan gum production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 9, p. 680-690, 2000.

GARCIA-OCHOA et al. Oxygen uptake rate in microbial processes: an overview. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 3, p. 289-307, 2010.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. The effect of agitation and aeration on the synthesis and molecular weight of gellan in batch cultures of *Sphingomonas paucimobilis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 1-2, p. 101-108, 2006.

GOTO, A; KUNIOKA, M. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 7, 1031-1035, 1992.

GREEN, B. D. et al. Demonstration of a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*. **Infection and Immunity**, v. 49, p. 291-297, 1985.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático da produção agrícola**: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil (dezembro 2009), 2009. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/servidor_arquivos_est>. Acesso em: 13 out. 2010.

HE, L. M.; NEU, M. P.; VANDERBERG, L. A. *Bacillus licheniformis* γ -glutamyl exopolymer: physicochemical characterization and U(VI) interaction. **Environmental Science and Technology**, v. 34, n. 9, p. 1694-1701, 2000.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon *Bacillus* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 213-218, 2002.

HECK, J. X. et al. Optimization of cellulase-free xylanase activity produced by *Bacillus coagulans* BL69 in solid-state cultivation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 107-112, 2005.

HOSTEA, K.; SCHACHTA, B.; SEYMOURC, L. New derivatives of polyglutamic acid as drug carrier systems. **Journal of Controlled Release**, v. 64, p. 53-61, 2000.

JIANG, H. et al. Optimal Production of Poly- γ -glutamic Acid by Metabolically Engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 16, p. 3075-3081, 2006.

JOHNSON, D. T.; TACONI, K. A. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. **Environmental Progress**, v.26, n.4, p.338-348, 2007.

KADA, S. et al. Glr, a glutamate racemase, supplies D-glutamate to both peptidoglycan synthesis and poly-gamma-glutamate production in gamma-PGA-producing *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, p. 13-20, 2004.

KANNO, A.; TAKAMATSU, H. Determination of polyglutamic acid in "Natto" using cetyltrimethylammonium bromide (Studies on "Natto" part V). **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 42, p. 878-886, 1995.

KENNEDY, M.; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 456-475, 1999.

KIMURA, K. et al. Characterization of *Bacillus subtilis* gamma-glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly-gamma-glutamate. **Microbiology**, p. 150, p. 4115-4123, 2004.

KING, E.C.; BLACKER, A.J.; BUGG, T.D.H. Enzymatic breakdown of poly- γ -D glutamic acid in *Bacillus licheniformis*: identification of a polyglutamyl γ -hydrolase enzyme. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 75-83, 2000.

KIRSCHNER, P.; MEIER, A.; BÖTTGER, E. C. Genotypic identification and detection of mycobacteria: facing novel and uncultured pathogens. In: PERSING, D.H. et al. (Eds.) **Diagnostic molecular microbiology: principles and applications**. American Society for Microbiology: Washington, 1993. p. 173-190.

- KOCIANOVA, S. et al. Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 688-694, 2005.
- KUBOTA, H. et al. Production of poly(gamma-glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 57, n. 7, p. 1212-1213, 1993.
- KUNIOKA, M. Biodegradable water absorbent synthesized from bacterial poly(amino acid)s. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, p. 324-329, 2004.
- KONNO, A.; TAGUCHI, T.; YAMAGUCHI, A. / Takeda Chemical Industries Ltd. **Bakery products and noodles containing polyglutamic acid**. US4888193-A, 19 dez. 1989.
- LEONARD, C. G., HOUSEWRIGHT, R. D. THORNE, C. B. Effects of some metallic ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 76, n. 5, p. 499-503, 1958.
- LUCAS, E. F., SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: E-papers, 2001. 366 p.
- MAC FADIN, J.F. **Biochemical test for identification of medical bacteria**. 2nd. Baltimore: Williams & Wilkins, 1980. 527 p.
- MAHMOUD, D. A. R. Isolation of polyglutamic acid flocculant producing bacteria from extreme Egyptian environments. **Journal of Applied Science Research**, v. 2, n. 9, p. 608-612, 2006.
- MAKINO, S. et al. Molecular characterization and protein analysis of the cap region which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 722-730, 1989.
- MAKINO, S. et al. Effect of the low molecular capsule released from the cell surface of *Bacillus anthracis* on the pathogenesis of anthrax. **The Journal of Infectious Diseases**, v.186, p. 227-233, 2002.
- MANOCHA, B.; MARGARITIS, A. Production and characterization of γ -polyglutamic acid nanoparticles for controlled anticancer drug release. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p. 83-89, 2008.
- MCLEAN, R. J. C. et al. Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. **Applied Environment Microbiology**, v. 56, p. 3671, 1990.

- MITSUIKI, M. et al. Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of oligo- and poly(glutamic acid)s. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 891–895, 1998.
- MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A.; GONÇALVES, V. L. C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639-648, 2009.
- MOCK, M.; FOUET, A. Anthrax. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 647-671, 2001.
- NATTO BIOSCIENCES. **Gamma PGA**: industry applications. Disponível em: <http://www.nattobiosciences.com/gamma_pga.html>. Acesso em: 1 set. 2008.
- NIPPON POLY-GLU CO. **NPG Products**. Disponível em: <http://www.poly-glu.com/eng/product_infomation/index.htm>. Acesso em: 17 fev. 2006.
- OGAWA, Y. et al. Efficient production of gamma-polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* (natto) in jar fermenters. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 10, p. 1684-1687, 1997.
- OH, S. M. et al. Characterization of γ -polyglutamic acid produced from the solid-state fermentation of soybean milk cake using *Bacillus* sp. **Food Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 509-514, 2007.
- OLDSHUE, J. K. Agitation. In: VOGEL, H. C.; TODARO, C. L. **Fermentation and biochemical engineering handbook**: principles, process design, and equipment. 2.nd. New Jersey: Noyes, 1997. cap. 5, p. 181-241.
- OPPERMANN-SANIO, F.; STEINBÜCHEL, A. Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 1, p. 11-22, 2002.
- PARK, C. et al. Synthesis of super-high-molecular-weight poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* subsp. chungkookjang. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 35, p. 128-133, 2005a.
- PARK, C. et al. Effect of high-molecular-weight poly-gamma-glutamic acid from *Bacillus subtilis* (chungkookjang) on Ca solubility and intestinal absorption. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 4, p. 855-858, 2005b.
- PORWAL, S. et al. Phylogeny in aid of the present and novel microbial lineages: diversity in *Bacillus*. **PLoS ONE**, v. 4, n. 2, e4438, 2009.
- PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M.; TODD, C. A numerical classification of the genus *Bacillus*. **Journal of General Microbiology**, v. 134, p. 1847-1882, 1998.

- RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2-3, p. 127-135, 2003.
- REIS JUNIOR, F. B.; REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. S. Restrição do 16S-23S DNAr intergênico para avaliação da diversidade de *Azospirillum amazonense* isolado de *Brachiaria* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 431-438, 2006.
- REVA, O.N.; SOROKULOVA, I. B.; SMIRNOV, V. V. Simplified technique for identification of the aerobic spore-forming bacteria by phenotype. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1361-1371, 2001.
- RICHARD, A.; MARGARITIS A. Production and mass transfer characteristics of non-newtonian biopolymers for biomedical applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 22, p. 374-355, 2002.
- RICHARD, A.; MARGARITIS, A. Optimization of cell growth and poly(glutamic acid) production in batch fermentation by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 465-468, 2003a.
- RICHARD, A.; MARGARITIS, A. Rheological, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 3, p. 299-305, 2003b.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. Campinas: Casa do Pão Editora, 2005. 326 p.
- SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal Microbiology**, 50, p. 1–17, 2004.
- SCHMIDELL, W. et al. (Coord.). Engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541 p. (Biotecnologia industrial, v. 2)
- SHIH, I. L. et al. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 267–272, 2001.
- SHIH, I.L; VAN Y.T. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 3, p. 207-225, 2001.
- SHIH, I.L.; VAN, Y.T.; CHANG, Y.N. Application of statistical experimental methods to optimize production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 213-220, 2002.
- SHIH, I. L.; VAN, Y. T.; SHEN, M. H. Biomedical applications of chemically and microbiologically synthesized poly(glutamic acid) and poly(lysine). **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 2, 2004.

SHIH, I. L.; WU, P. J.; SHIEH, C. J. Microbial production of a poly (gamma-glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2827-2832, 2005.

SNEATH, P. H. A. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In: SNEATH, P. H. A. et al. (Eds.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v.2. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986. p. 1104-1207.

SOARES, L. H. D. ; ASSMANN, F. AYUB, M. A. Z. Production of transglutaminase from *Bacillus circulans* on solid-state and submerged cultivations. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 23, p. 2029-2033, 2003.

SOLIMAN, N. A.; BEREKAA, M.M.; ABDEL-FATTAH, Y. R. Polyglutamic acid (PGA) production by *Bacillus* sp. SAB-26: application of Plackett-Burman experimental design to evaluate culture requirements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 3, p. 259-67, 2005.

SUNG, M. H. et al. Natural and edible biopolymer poly- γ -glutamic acid: synthesis, production, and application. **The Chemical Record**, v. 5, p. 352-366, 2005.

TANAKA, T. et al. Existence of an optically heterogeneous peptide unit in poly(gamma-glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 4, p. 361-364, 1997.

TANIGUCHI, M. et al. Flocculating activity of cross-linked poly- γ -glutamic acid against bentonite and *Escherichia coli* suspension pretreated with FeCl_3 and its interaction with Fe^{3+} . **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n.2, p. 207-211, 2005a.

TANIGUCHI, M. et al. Physicochemical properties of cross-linked poly- γ -glutamic acid and its flocculating activity against kaolin suspension. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 2, p.130-135, 2005b.

TANIGUCHI, M. et al. Proposals for wastewater treatment by applying flocculating activity of cross-linked poly- γ -glutamic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 3, p. 245-251, 2005c.

WELKER, N. E.; CAMPBELL, L. L. Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 94, p. 1124-1130, 1967.

WILDE, F.D. (Ed.). Field measurements. In: U.S. GEOLOGICAL SURVEY. **National field manual for the collection of water-quality data**: U.S. geological survey techniques of water-resources investigations, Book 9, 2006. Disponível em: <<http://pubs.water.usgs.gov/twri9A6>>. Acesso em: 30 set. 2010.

- WU, Q. et al. Improvement of poly(γ -glutamic acid) biosynthesis and redistribution of metabolic flux with the presence of different additives in *Bacillus subtilis* CGMCC 0833. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 527-535, 2008.
- XU, J.; CHEN, S.; YU, Z. Optimization of process parameters for poly γ -glutamate production under solid state fermentation from *Bacillus subtilis* CCTCC202048. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 3075-3081, 2005.
- XU, D.; CÔTÉ, J. C. Phylogenetic relationships between *Bacillus* species and related genera inferred from comparison of 3' end 16S rDNA and 5' end 16S-23S ITS nucleotide sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 695-704, 2003.
- XU, H. et al. Efficient production of poly-(γ -glutamic acid) by newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2. **Process Biochemistry**, v.40, n. 519-523, 2005.
- YAMANAKA, S. / Ajinomoto. **New gamma-polyglutamic acid, production therefore and drinking agent containing the same**. JP3047087, 28 fev. 1991.
- YOKOI, H. et al. Characteristics of a biopolymer flocculant produced by *Bacillus* sp. PY-90. **Journal Fermentation of Bioengineering**, v. 79, p. 378-380, 1995.
- YOKOI, H. et al. Flocculation properties of poly(γ glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. **Journal Fermentation of Bioengineering**, v. 82, p. 84-87, 1996.
- YOON, S.H. et al. Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v. 22, n. 7, p. 585-588, 2000.
- YOON, S.H.; LEE S.Y. Comparison of transcript levels by DNA microarray and metabolic flux based on flux analysis for the production of poly- γ -glutamic acid in recombinant *Escherichia coli*. **Genome Informatics**, v. 13, p. 587-588, 2002.
- ZANUY, D.; ALEMAN, C. Poly(γ -glutamic acid) in aqueous solution: molecular dynamics simulations of 10- and 20-residue chains at different temperatures. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 651-657, 2001.
- ZWIETERING, M. H., I. et al. Modeling of the bacterial-growth curve. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 6, p. 1875-1881, 1990.

Apêndice A

Determinação de ácido γ -poliglutâmico

A metodologia descrita a seguir está baseada no trabalho de Kanno e Takamatsu (1995).

PARTE 1 - Extração do ácido γ -poliglutâmico

- a) Adicionar 10 mL de ácido tricloroacético 6,25 % a um balão de 25 mL e elevar volume com o caldo de cultivo com auxílio de uma pipeta de Pasteur.
- b) Transferir para erlenmeyer de 125 mL e levar a banho de 50 °C com agitação por 20 min.
- c) Centrifugar a 20.000 g por 20 min.
- d) Coletar 10 mL do sobrenadante e ajustar pH até 7,0 com auxílio de NaOH 1M e 0,1M.
- e) Elevar em balão de 25 mL.
- f) Tomar uma alíquota de 5 mL e adicionar 25 mL de etanol absoluto em um tubo de centrifuga. Misturar lentamente e deixar repousar por 10 min.
- g) Centrifugar a 25.000 g por 30min, 4 °C.
- h) Descartar o sobrenadante e ressolubilizar o precipitado com pequeno volume de tampão fosfato pH 7,0.
- i) Adicionar 25 mL de etanol absoluto. Misturar lentamente e deixar repousar por 10 min.
- j) Centrifugar a 25.000 g por 30min, 4 °C.

- k) Descartar sobrenadante e adicionar tampão fosfato pH 7,0 e elevar volume em balão de acordo com quantidade prevista de polímero.

PARTE 2 - Quantificação do ácido γ -poliglutâmico (Complexação com Brometo de cetiltrimetilamônio)

- a) Num tubo de ensaio, adicionar 1 mL de solução de extrato de γ -PGA obtida a partir do caldo de cultivo na PARTE 1 desta metodologia.
- b) Adicionar 4 mL de tampão fosfato pH 7,0
- c) Adicionar 1mL de CET (Brometo de Cetiltrimetilamônio 0,1 M / NaCl 1M)
- d) Agitar em agitar e deixar repousar em banho a 30 °C por 20min.
- e) Ler absorbância a 400 nm.
- f) Calcular a quantidade de γ -PGA no caldo de cultivo, através de curva padrão de γ -PGA (MM: 70-100 kDa, Sigma-Aldrich)

Apêndice B

Laudo do glicerol residual de biodiesel



Laudo Analítico

Produto:

Glicerina Bruta

Data de carregamento:

06.05.2010

Lote:

Amostra Grátis

Item Analítico	Unidade	Resultado	Especificação	Métodos
Glicerol	% massa	82,61	mínimo 80	Official Monographs USP XXI
Cinzas	% massa	6,54	máximo 8,0	Official Monographs USP XXI
Cloreto de sódio	% massa	6,89	máximo 7,0	Mohr
Umidade	% massa	10,24	máximo 13,0	Karl Fisher
MONG	% massa	0,61	máximo 2,0	cálculo
pH	-	5,72	4,5 - 9,0	***

Origem do produto: 100% de origem vegetal - Óleo degomado de soja.

Larissa Garibotti

CRQ 05302605 - 5ª Região / CREA 10.471D

VERIFICADO
Controle de Qualidade
BSBIOS

Passo Fundo, 06 de maio de 2010.