



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**USO DE CARREADORES DE OXIGÊNIO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO- γ -
POLIGLUTÂMICO ATRAVÉS DO CULTIVO DE *Bacillus subtilis* BL53 E
CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO**

Alessandra de Cesaro

Porto Alegre, 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

**USO DE CARREADORES DE OXIGÊNIO NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO- γ -
POLIGLUTÂMICO ATRAVÉS DO CULTIVO DE *Bacillus subtilis* BL53 E
CARACTERIZAÇÃO DO BIOPOLÍMERO**

Alessandra de Cesaro
Engenheira de Alimentos – Unisinos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: PhD. Marco Antônio Záchia Ayub
Co-orientadora: Dr^a Suse Botelho da Silva

Porto Alegre, 2013

CIP - Catalogação na Publicação

de Cesaro, Alessandra

Uso de carreadores de oxigênio na produção de ácido gamma-poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53 e caracterização do biopolímero / Alessandra de Cesaro. -- 2013.
75 f.

Orientador: Marco Antônio Zachia Ayub.
Coorientadora: Suse Botelho da Silva.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. ácido gamma-poliglutâmico. 2. *Bacillus subtilis*. 3. polidimetilsiloxanos. 4. coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio. 5. análise térmica. I. Zachia Ayub, Marco Antônio, orient. II. Botelho da Silva, Suse, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

O que me fez escolher experimentar a área da pesquisa foi, além do perfil que eu acreditava ter, a nobreza que representa as descobertas de um pesquisador. O desafio de fazer parte, por menor que fosse minha contribuição, no desenvolvimento de um novo conhecimento me motivou a ingressar no mestrado. Ao iniciar o trabalho de fato, percebi que teria também um desafio pessoal. Enfrentei a decepção, seguida de raiva, de um experimento interrompido ou com resultado incoerente. Enfrentei a ansiedade de um recomeço. Mas também vibrei com por cada resultado que se reproduzia. Todas essas emoções me fizeram perceber a importância das pessoas que estiveram em minha volta durante esses dois últimos anos. Tenho a certeza de que, sem essa ajuda, minha caminhada teria sido muito mais difícil, se não impossível.

Aproveito, então, para agradecer ao meu orientador, Prof. PhD Marco Antônio Záchia Ayub e à minha coorientadora, Dra. Suse Botelho da Silva, por terem me guiado quando eu não acreditava encontrar a solução.

Obrigada às colegas de laboratório e à bolsista, Vanessa Zimmer da Silva, pelas contribuições técnicas e, acima de tudo, por terem compartilhado os momentos vividos no Bioteclab, com todos os sentimentos que trouxeram.

Ao meu noivo, Lucas Dehnhardt, agradeço pela companhia incansável, compreensão, paciência e apoio. Dividir minha vida e meus projetos contigo me deixa confiante de que tudo se resolve da melhor maneira possível.

Aos meus pais agradeço por todas as oportunidades e incentivos dados e confiança depositada, que me ajudaram a chegar onde estou.

A CAPES agradeço pelo apoio financeiro. Ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do mestrado.

Por fim, mas não menos importante, agradeço pela força e energia que me fizeram continuar quando a vontade era de desistir.

RESUMO

O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é uma homopoliamida aniônica, biodegradável, comestível e atóxica, sintetizada por bactérias do gênero *Bacillus*, podendo ser utilizado nas indústrias alimentícia e de cosméticos, na medicina e no tratamento de águas residuais. Este trabalho teve como objetivo caracterizar e identificar potenciais aplicações para o γ -PGA obtido através do cultivo submerso de *Bacillus subtilis* BL53, conduzido sob condições otimizadas em trabalhos anteriores. Além disso, foi avaliado o efeito de diferentes inóculos e da adição de precursores da rota metabólica na produção do biopolímero. A melhor condição obtida foi testada em biorreatores com adição de polidimetilsiloxano (PDMS) como carreador de oxigênio, com o objetivo de aumentar a produtividade do biopolímero. A massa molar média (M_w), obtida através de espalhamento de luz estático, na ordem de 10^6 g mol⁻¹ não apresentou diferenças significativas para o biopolímero obtido após 48 e 96 h de cultivo. As análises reológicas conduzidas em viscosímetro rotacional indicaram que os polímeros obtidos após 48 e 96 horas apresentaram comportamento Newtoniano, sendo que após 96 horas a viscosidade absoluta foi maior. As análises térmicas (calorimetria diferencial exploratória e análise termogravimétrica) indicaram a temperatura de fusão (T_m) de 134 °C e 128 °C e o intervalo de degradação (T_d) entre 120 °C - 190 °C e 120 °C - 215 °C, para os biopolímeros obtidos após 48 e 96 horas de cultivo respectivamente. O caldo LB apresentou-se como o melhor inóculo para a produção de γ -PGA. A adição dos precursores L-glutamina e ácido α -cetoglutárico aumentou em 20 % a produção do biopolímero. A adição de 10 % de PDMS nos cultivos em biorreatores aumentou o coeficiente volumétrico de transferência de massa (K_{La}) e a produção e produtividade do γ -PGA, sendo produzidos 23.5 g L⁻¹ do biopolímero em 24 horas de cultivo, uma produtividade aproximadamente 40 % superior às obtidas por outros autores utilizando o mesmo microrganismo.

Palavras-chave: ácido γ -poliglutâmico, *Bacillus subtilis*, massa molecular, viscosidade, análise térmica, polidimetilsiloxanos, coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}).

ABSTRACT

Poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) is an anionic, biodegradable, non-toxic and edible homopolyamide, synthesized by bacteria of the genus *Bacillus*, being used in food, cosmetics, medicine and waste water treatment. The aim of this study is to characterize and identify potential applications for the γ -PGA obtained by submerged cultivation of *Bacillus subtilis* BL53, conducted under optimized conditions in previous studies. We also evaluated the effect of different inoculants and addition of precursors in the metabolic pathway of production of the biopolymer. The best condition obtained yet been tested in bioreactors with addition of polydimethylsiloxane (PDMS) as a carrier of oxygen in order to further increase the productivity of biopolymer. The average molecular weight (M_w) obtained by static light scattering, on the order of 10^6 g mol⁻¹, showed no significant differences for biopolymer obtained after 48 and 96 h of cultivation. Analyses conducted in rotational viscometer indicated that biopolymers after 48 and 96 h have a Newtonian behavior, and the 96 hours had higher absolute viscosity. The thermal analysis (differential scanning calorimetry and thermo gravimetric analysis) indicated the melting temperature (T_m) as 134 °C and 128 °C and degradation temperature range (T_d) of 120 °C - 190 °C and 120 °C - 215 °C, after 48 and 96 hours respectively. It was found that the best inoculum medium for biopolymer production was the LB broth. The addition of the precursors L-glutamine and α -ketoglutaric acid increased in 20% the γ -PGA production. The addition of 10% of PDMS in bioreactors cultures increased the mass transfer volumetric coefficient (K_{La}) and the production and productivity of γ -PGA, being produced 23.5 g l⁻¹ of the biopolymer in 24 hours of cultivation, a productivity about 40 % higher than those obtained by other authors using the same microorganism.

Key words: poly- γ -glutamic acid, *Bacillus subtilis*, molecular mass, viscosity, thermal analysis, polydimethylsiloxanes, oxygen transfer volumetric coefficient (K_{La}).

SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 O ÁCIDO γ -POLIGLUTÂMICO (γ -PGA).....	3
2.1.1 Propriedades físico-químicas, reológicas e térmicas do γ -PGA	4
2.1.2 Microrganismos e Via Metabólica de Obtenção do γ -PGA.....	8
2.1.3 Produção do γ -PGA e aspectos que potencializam seu rendimento	13
2.1.4 Separação e purificação do γ -PGA	16
2.1.5 Aplicações tecnológicas do γ -PGA	17
2.2 TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM CULTIVO SUBMERSO	20
2.3 CARREADORES DE OXIGÊNIO.....	23
3. RESULTADOS.....	26
3.1 Resultados I - Molecular mass, rheological and thermal analysis of γ -PGA by Bacillus subtilis BL53 and potential applications.....	26
3.2 Resultados II - Kinetics of γ -PGA production by Bacillus subtilis BL53 and improvement of biopolymer yield using polydimethylsiloxane (PDMS) in bioreactor.....	45
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	64
5. PERSPECTIVAS	66
6. REFERÊNCIAS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas químicas do (a) ácido glutâmico e do (b) ácido γ -poliglutâmico (b).	4
Figura 2: Estrutura α -hélice em (a) vista superior e em (b) vista lateral.	5
Figura 3: Conformação de folha pregueada, ou β -sheet, em (a) vista superior e (b) vista lateral.....	5
Figura 4: Ciclo TCA, com as duas possíveis rotas metabólicas de obtenção do γ -PGA. (1) GD, (2) GOGAT e (3) GS.	11
Figura 5: Mecanismo de conversão do ácido L-glutâmico em seu D-isômero.	11
Figura 6: Esquema da síntese de γ -PGA onde o biopolímero: A) fica aderido à membrana celular e B) fica livre no meio extracelular. O complexo enzimático Cap é responsável pela síntese do γ -PGA ancorado a membrana celular, como ocorre no caso do <i>B. anthracis</i> . O complexo enzimático Pgs é responsável pela síntese do γ -PGA que é liberado extracelularmente, como ocorre no caso do <i>B. subtilis</i> e do <i>B. licheniformis</i>	12
Figura 7: Variação do oxigênio dissolvido durante um ensaio.....	22
Figura 8: Gráfico representativo da determinação do $k_L a$ pelo método dinâmico.	23
Figura 9: Estrutura química do PDMS.....	24

Resultados I

Figure 1: (a) Relationship between apparent viscosity and shear rate for both samples, at 20 °C. (b) Relationship between shear stress and shear rate for both samples, at 20 °C. Close symbols for 48 h samples and open symbols for 96 h samples. Different concentrations are: (■) 10 g L ⁻¹ , (●) 15 g L ⁻¹ and (▲) 20 g L ⁻¹ . Production of γ -PGA (■) and viable cells (●) by <i>Bacillus subtilis</i> BL53 carried out in bioreactor.....	36
--	----

Figure 2: Correlation between γ -PGA solutions with different concentrations and its relative apparent viscosity, at 20 °C. (●) 48 h sample (line equation $y = 2.62x - 16.6$ and $R^2 = 0.9923$) and (■) 96 h (line equation $y = 3.90x - 26.2$ and $R^2 = 0.9925$)37

Figure 3: Correlation between γ -PGA solutions at 20 g L⁻¹ in different temperatures and apparent viscosity. (●) 48 h sample (line equation $y = -0.51x + 42.13$ and $R^2 = 0.9935$) and (■) 96 h (line equation $y = -0.77x + 67.3$ and $R^2 = 0.9896$).....37

Figure 4: Curves obtained in DSC analysis by Perking Elmer equipment, at a heating rate of 10 °C min⁻¹. Two samples were analyzed: (a) 48 h and (b) 96 h.....40

Figure 5: Curves obtained in TGA analysis at a heating rate of 10 °C min⁻¹. Two samples were analyzed: (a) 48 h and (b) 96 h.....41

Resultados II

Figure 1: Kinetics of γ -PGA production by *Bacillus subtilis* BL53 carried out in rotatory shaker at 37 °C and 180 rpm, using cultivation medium E and different inocula media: (a) LB, (b) E, and (c) LBGlu. γ -PGA (■), number of viable cells (★), L-glutamic acid (○), citric acid (Δ), and glycerol (□). Results are the mean of duplicate runs.....54

Figure 2: Kinetics of γ -PGA production by *B. subtilis* BL53 carried out in rotatory shaker at 37 °C and 180 rpm, using LB as pre-inoculum and (a) LBG, (b) E(-glu) and (c) E(+pec) as production medium. γ -PGA yield (■), number of viable cells (★), L-glutamic acid (○), citric acid (Δ), and glycerol (□). Results are the mean of duplicates runs.57

Figure 3: γ -PGA production using different media: (□) medium E; (■) medium E added of PDMS; (○) medium E(+prec); (●) medium E(+prec) added of PDMS. Plotted results are the mean of duplicate runs.58

LISTA DE TABELAS

Resultados I

Table 1: Mass average molecular mass (M_w), second virial coefficient (A_2), and radius of gyration of the molecules (R_g) obtained in SLS by Zimm plot, for γ -PGA samples obtained in 48 h and 96 h of cultivation of *B. subtilis* BL53, in bioreactor at 37 °C, 1 000 rpm and 2 vvm.....33

Resultados II

Table 1: Volumetric oxygen transfer coefficient (kLa) for *Bacillus subtilis* BL53 cultures performed at 2 vvm, and 1 000 rpm as function of PDMS addition (10 % volume fraction) measured at mid-exponential growth phase. Results are the mean of duplicate runs.....59

1. INTRODUÇÃO

A busca por alternativas que reduzam a exploração de fontes não renováveis bem como o desenvolvimento de produtos que não representem impactos negativos ao meio ambiente se faz cada vez mais importantes em nossa sociedade. Um dos maiores desafios enfrentados atualmente são aplicações tecnológicas que dependem de materiais derivados do petróleo, principalmente dos polímeros, que constituem os plásticos e adesivos. Esses materiais estão amplamente inseridos nos processos tecnológicos e apresentam longa vida pós-utilização e são característicos por gerarem resíduos não biodegradáveis, o que causa graves danos ao meio ambiente, uma vez que geralmente são descartados de forma inadequada. O desenvolvimento de biopolímeros obtidos a partir de fontes renováveis surge como alternativa, principalmente quando biodegradáveis e biocompatíveis.

O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é uma homopoliamida natural constituída de monômeros de D e L-ácido glutâmico unidos por ligações amida entre os grupos α -amina e γ -carboxílico. Primeiramente encontrado na cápsula celular do *Bacillus anthracis*, atualmente sabe-se que este biopolímero é um produto extracelular obtido do cultivo de outras espécies do gênero *Bacillus*, principalmente *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis*, além de outros microrganismos. O *B. subtilis* é uma bactéria gram positiva, atrativa do ponto de vista industrial, uma vez que apresenta altas taxas de crescimento em ciclos curtos de cultivo, além de secretar proteínas e outros metabólitos de interesse para o meio extracelular, facilitando sua separação posterior. Outra característica importante do microrganismo é sua classificação como GRAS (*generaly regarded as safe*).

As características do γ -PGA, como solubilidade em água, biodegradabilidade, comestibilidade e não toxicidade para humanos e meio ambiente fazem deste biopolímero um produto de grande interesse, aplicável em diversos setores industriais, como nas áreas de alimentos, cosmética, médica, tratamento de águas, agricultura e construção civil. O γ -PGA pode atuar nos alimentos como espessante, umectante, agente crioprotetor e mascarando o sabor amargo. Em outras áreas pode ser utilizado como adesivo biológico, veículo de medicamentos, floculante, seqüestrador de íons metálicos, hidrogéis absorventes de água, aditivos em tintas e em concreto.

A produção de biopolímeros a partir de cultivo submerso de microrganismos excretores é característica por apresentar um aumento muito significativo na viscosidade do meio, ao longo do tempo de cultivo. Os biopolímeros são moléculas de alta massa molar e, quando excretados para o meio, como no caso da produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis*, alteram a reologia do meio, dificultando a transferência de massa. Sendo o *B. subtilis* um microrganismo aeróbio, alternativas que diminuam essa resistência na transferência de oxigênio podem contribuir para o aumento da produção e da produtividade do biopolímero. O uso de carreadores de oxigênio representa uma dessas alternativas.

Neste contexto, o trabalho tem como objetivo geral a caracterização do ácido γ -poliglutâmico, produzido por *Bacillus subtilis* BL53, isolado de ambiente amazônico e avaliar o efeito do uso de diferentes inóculos, da adição de precursores metabólicos e de carreadores de oxigênio na produção do biopolímero. Os objetivos específicos deste trabalho são:

1. caracterizar quanto à massa molar, comportamento reológico e temperaturas de transição e degradação o γ -PGA produzido após 48 e 96 h de cultivo em condições otimizadas em trabalhos anteriores;
2. avaliar o efeito de diferentes meios de inóculo e de precursores metabólicos na cinética de produção do γ -PGA por *B. subtilis* BL53 em cultivo submerso;
3. avaliar a influência do uso de polidimetilsiloxano (PDMS) como carreador de oxigênio em biorreator sobre o coeficiente de transferência de oxigênio ($k_L a$), produção e produtividade do biopolímero produzido por *B. subtilis* BL53.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O ÁCIDO γ -POLIGLUTÂMICO (γ -PGA)

Os polímeros constituídos de aminoácidos unidos quimicamente por ligações amida podem ser referidos como poliamidas, sendo essas divididas em duas categorias: as homopoliamidas (ou poliaminoácidos) e as proteínas (SHI; XU; CEN, 2007). As proteínas são constituídas por diferentes aminoácidos que são unidos de modo a formar uma seqüência específica, dando origem à molécula, enquanto que as homopoliamidas são constituídas por um único tipo de aminoácido (BAJAJ; SINGHAL, 2011). Além disso, ainda há outra diferença, referente às ligações químicas entre os aminoácidos dos dois tipos de poliamidas. Nas proteínas, as ligações amidas ocorrem somente entre os grupos α -amino e α -carboxilílico, enquanto que nas homopoliamidas essas ligações podem ocorrer entre outros grupos, como β -, γ -carboxílicos e ϵ -amínicos (CANDELA; FOUET, 2006).

O γ -PGA é uma homopoliamida aniônica, que ocorre naturalmente, sendo sintetizada como principal componente da cápsula de bactérias do gênero *Bacillus* (YAO, et al., 2009). Essa poliamida caracteriza-se por ser constituída dos monômeros D- e L-ácido glutâmico, unidos por ligações amida entre os grupos α -amino e γ -carboxilílico (YOON, et al., 2000). A Figura 1 ilustra a estrutura do ácido glutâmico e do γ -PGA com as ligações características desta homopoliamida.

As principais características do γ -PGA (biodegradável, comestível e não-tóxico para humanos e meio ambiente) fazem dele um biopolímero de relevante interesse industrial, podendo ser utilizado em diversos setores, como cosméticos, alimentos, medicina, tratamento de águas residuais, entre outros usos (SHIH; VAN, 2001).

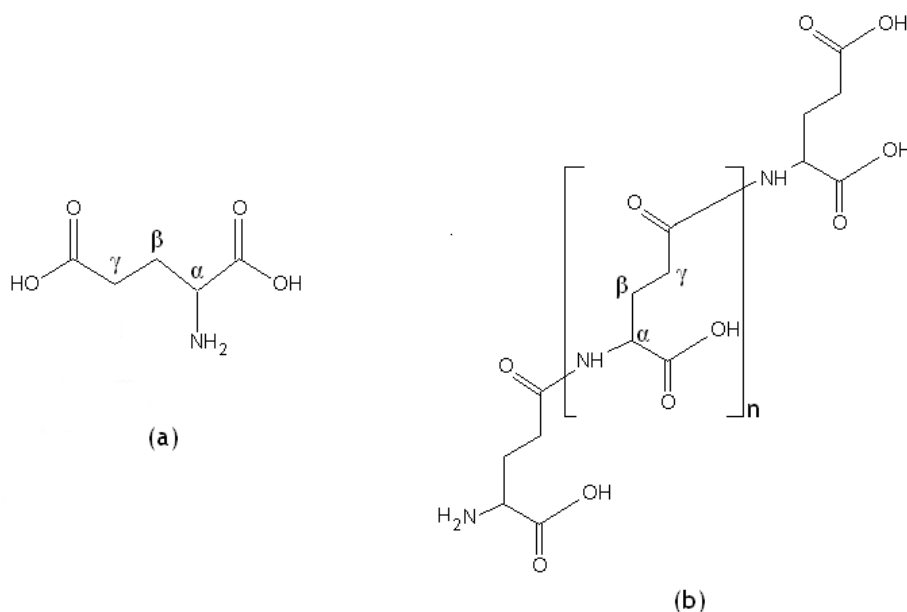


Figura 1: Estruturas químicas do (a) ácido glutâmico e do (b) ácido γ -poliglutâmico (b).

FONTE: Adaptado de Candela e Fouet (2006)

2.1.1 Propriedades físico-químicas, reológicas e térmicas do γ -PGA

O γ -PGA é um polímero que pode ser composto apenas por unidades D-glutamato ou L-glutamato, ou ainda pelas duas formas enantioméricas do aminoácido. O biopolímero, devido às ligações amida entre os grupos α e γ , apresenta resistência ao ataque de proteases, uma vez que a enzima só é capaz de clivar ligações amida entre os grupos α , característico de proteínas (CANDELA; FOUET, 2006).

A conformação estrutural do γ -PGA é influenciada pela ionização de suas cadeias laterais, o que está relacionado com a concentração do biopolímero em solução, com a temperatura e com o pH. Em pH ácido (abaixo de 4,5) e temperatura de 25 °C, o γ -PGA encontra-se em uma conformação de α -hélice, estabilizada por ligações de hidrogênio intramoleculares, conforme representado na Figura 2. Com o aumento da temperatura para 35 °C, nesse mesmo pH, a conformação passa para folha pregueada, ou β -sheet, devido a uma possível agregação. A Figura 3 apresenta uma representação da estrutura β -sheet. Com o aumento da temperatura para 90 °C, a estrutura β -sheet torna-se mais compacta devido à diminuição do espaço entre as folhas. Em pH de 5,5, o γ -PGA encontra-se em uma conformação de α -hélice em temperaturas de 5 a 50 °C. A partir dos 50 °C, as moléculas passam para uma conformação randômica, ou seja, formam um

emaranhado desorganizado. É possível que, pelo aumento do pH e conseqüente ionização dos grupos carboxílicos, as moléculas permaneçam mais estáveis, não ocorrendo agregação e, por isso, não se organizam de modo a formar a estrutura β -sheet. Em pH maior de 6,5, as moléculas de γ -PGA encontram-se na conformação randômica, sendo que a variação da temperatura não provoca mudanças significativas (KREJTSCHI; HAUSER, 2011).

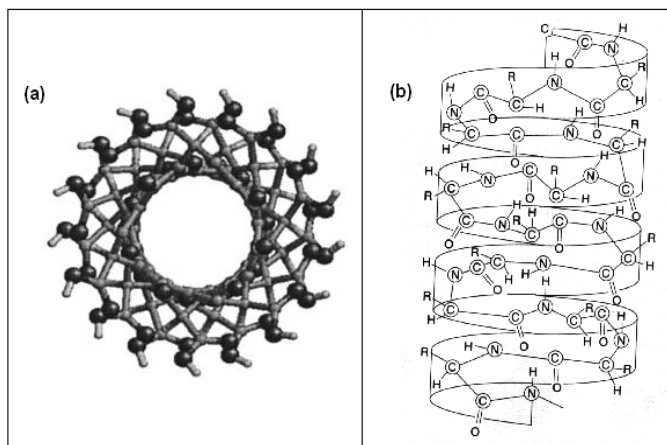


Figura 2: Estrutura α -hélice em (a) vista superior e em (b) vista lateral.

FONTE: Adaptado de Candela e Fouet (2006)

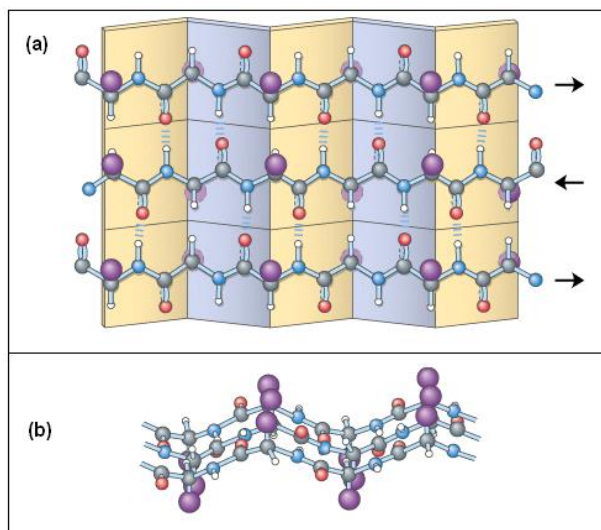


Figura 3: Conformação de folha pregueada, ou β -sheet, em (a) vista superior e (b) vista lateral.

FONTE: Adaptado de Nelson e Cox (2005).

Sendo a síntese do γ -PGA um processo biotecnológico, a massa molar do biopolímero não pode ser facilmente controlada, de modo que filamentos de diferentes massas molares são produzidos. Essa distribuição de diferentes massas molares é chamada de polidispersividade, sendo esta propriedade determinada com o uso da massa molar média como referência (HIEMENZ, 1984). Segundo Shih e Van (2001), a massa molar média do γ -PGA pode variar de 10^5 a 8×10^6 Da. A polidispersividade pode variar entre 2 e 5. A variação da massa molar e a conseqüente polidispersividade do γ -PGA pode estar relacionada com o microrganismo produtor, as condições de cultivo e ainda com a ação de enzimas secretadas pelo microrganismo no final da fase estacionária de crescimento (SHIH; VAN, 2001; CANDELA; FOUET, 2006). Sung et al. (2005) produziram γ -PGA a partir do cultivo de *Bacillus subtilis* subsp. *Chungkookjang* e obtiveram filamentos com massa molar de 10^6 Da quando o meio apresentava baixas concentrações de NaCl, enquanto que, em concentrações superiores a 10%, a massa molar dos filamentos diminuiu, ficando entre 10^4 e 10^5 . Utilizando o mesmo microrganismo, Park et al. (2005) também observaram que a adição de cloreto de amônio em altas concentrações contribuía para a produção de filamentos com massa molar mais elevadas (2×10^6 e 7×10^6 Da).

Uma das funções do γ -PGA nas bactérias é sua utilização como fonte de carbono e nitrogênio, caso haja escassez de nutrientes no meio. Para tanto, o microrganismo produtor sintetiza enzimas capazes de clivar a molécula do biopolímero em frações menores, para que sua utilização como fonte de energia seja possível. Segundo Yao et al. (2009), as bactérias do gênero *Bacillus*, principalmente das espécies *B. licheniformis* e *B. subtilis* apresentam dois tipos de depolimerases: a endo- γ -glutamil-peptidase, que atua nas regiões internas da cadeia, e a exo- γ -glutamil-peptidase, que ataca as extremidades da cadeia, liberando um único resíduo de ácido glutâmico ou até três unidades do aminoácido. King, Blacker e Bugg (2000) identificaram a ação de uma hidrolase, polyglutamil- γ -hidrolase, sobre o γ -PGA, dando origem a moléculas de ácido glutâmico. A ação das enzimas descritas acima contribui para a polidispersividade encontrada.

A produção de γ -PGA é característica por apresentar um aumento na viscosidade do meio ao longo do tempo de cultivo, devido ao polímero de alta massa molar estar sendo excretado pelas células para esse meio. Portanto, alguns estudos têm sido realizados com o intuito de caracterizar o comportamento reológico do γ -PGA durante o tempo de cultivo. Reologia é a ciência que estuda a deformação e o escoamento da

matéria. O comportamento de escoamento de um fluido é caracterizado pela relação entre tensão e taxa de cisalhamento.

Um fluido é chamado Newtoniano quando a taxa de cisalhamento é diretamente proporcional à tensão de cisalhamento aplicada, sendo a constante de proporcionalidade representada pela viscosidade absoluta (μ). O fluido Newtoniano é descrito pela equação

$$\sigma = \mu \gamma$$

onde σ é a tensão de cisalhamento, γ é a taxa de cisalhamento e μ é a viscosidade absoluta. Quando a relação entre taxa e tensão de cisalhamento não é linear e a viscosidade diminui com o aumento da taxa de cisalhamento, o fluido é chamado Pseudoplástico e pode ser descrito pela Lei das Potências, conforme equação

$$\eta = k \gamma^{n-1}$$

onde η é a viscosidade aparente, k é o índice de consistência, γ é a taxa de cisalhamento e n é o índice de comportamento do fluido. O índice de consistência k e o índice de comportamento do fluido n são termos independentes. Segundo a Lei das Potências, quando o n é igual a 1, o fluido é Newtoniano e, para valores de n menores do que 1 o fluido é Pseudoplástico. No caso de fluidos Pseudoplásticos, a viscosidade não é absoluta e sim aparente (η), pois varia com a taxa de cisalhamento e depende dos valores de K e n (STEFFE; DAUBERT, 2006; BAJAJ; SINGHAL, 2011).

No início do cultivo, quando a concentração do γ -PGA é baixa, o meio de cultivo se comporta como um fluido newtoniano. Avançando o tempo e, conseqüentemente, a concentração do biopolímero, o meio de cultivo assume características de um fluido pseudoplástico (BAJAJ; SINGHAL, 2011).

Em solução, o γ -PGA purificado apresenta um comportamento pseudoplástico bem característico, com valores de n menores do que 1. Irurzun et al. (2011) estudaram o comportamento reológico do γ -PGA em solução e observaram uma relação linear entre a viscosidade aparente e a concentração da solução. O comportamento reológico de fluidos é fortemente influenciado pela temperatura.

A temperatura e a viscosidade apresentam uma relação inversamente proporcional, de modo que enquanto a primeira aumenta a outra diminui. Da mesma forma, fluidos apresentam baixa viscosidade quando sujeitos a altas temperaturas. Em soluções poliméricas, a viscosidade aumenta quando a temperatura se aproxima da temperatura de transição vítrea T_g (do inglês glass transition temperature). A T_g é a

temperatura em que ocorre uma mudança no comportamento de um material, passando de um estado sólido desordenado, onde as cadeias poliméricas encontram-se imóveis, apresentando apenas uma vibração em torno de seu estado de equilíbrio, para um líquido muito viscoso, ainda incapaz de escoar, porém com maior flexibilidade. Essa mudança ocorre em uma faixa muito estreita de temperatura, por isso é descrita como uma transição, apesar de não ser considerada uma verdadeira fase de transição termodinâmica. A temperatura de fusão T_m (do inglês *crystal melting temperature*), por outro lado, é a temperatura cuja qual um material polimérico encontra-se completamente amorfo, apresentando total mobilidade das cadeias, devido ao rompimento de interações inter e intramoleculares provocadas pelo aumento da temperatura, passando a escoar (KHACHATOORIAN; PETRISOR; YEN, 2004). A T_m é uma transição termodinâmica, característica por ocorrer em um processo endotérmico. Ho et al. (2006) determinaram a T_m do γ -PGA produzido por *Bacillus subtilis* (natto) como 206 °C.

2.1.2 Microrganismos e Via Metabólica de Obtenção do γ -PGA

Apesar de o α -PGA ser facilmente sintetizado quimicamente, através da polimerização por adição nucleofílica do N-carboxianidrido do ácido L-glutâmico, a síntese química do γ -PGA é praticamente impossível, sendo este obtido através de cultivo microbiano (BUECHER; MARGARITIS, 2007; SHIH; VAN, 2001).

O γ -PGA foi primeiramente descoberto por Ivanovics e colaboradores, em 1937, como componente da cápsula celular do *Bacillus anthracis* (SHI; XU; CEN, 2007). Muitos estudos também foram realizados com o objetivo de investigar o microrganismo responsável pela produção de *natto*, um alimento fermentado a base de soja, tradicional da cultura japonesa, caracterizado pela sua viscosidade. Em 1905, uma bactéria gram-positiva foi isolada do *natto* e chamada *Bacillus natto*, pelo pesquisador Sawamura, que posteriormente constatou a presença do ácido poliglutâmico no alimento (KUNIOKA, 1997). Mais tarde definiu-se que o *natto* é constituído de uma mistura de ácido γ -poliglutâmico e frutanos (XU et al, 2006).

Atualmente sabe-se que diversas cepas de *Bacillus* são capazes de produzir extracelularmente o γ -PGA, como o *B. licheniformis*, o *B. subtilis*, o *B. megaterium*, o *B. pumilus*, o *B. mojavensis* e o *B. amyloliquefaciens* (HEZAYEN et al, 2001). Além de *Bacillus spp*, conhecem-se outras bactérias excretoras de γ -PGA, todas gram-positivas.

Entre as arqueobactérias também encontram-se produtoras deste biopolímero, como por exemplo as espécies *Sporosarcina halophila*, *Natrialba aegyptiaca* e *Planococcus halophila*. O γ -PGA também pode ser encontrado, em quantidades significativas, nos nematócidos de animais do filo *Cnidaria* (CANDELA; FOUET, 2007; SHI; XU; CEN, 2007).

As funções fisiológicas do γ -PGA nas bactérias variam de acordo com a espécie que o sintetiza e com o meio em que é sintetizado. Em bactérias do solo, principalmente as do gênero *Bacillus*, exceto *Bacillus anthracis*, o γ -PGA excretado seqüestra íons metálicos tóxicos, o que contribui aumentando a resistência do microrganismo em condições adversas (BAJAJ; SINGHAL, 2011). O biopolímero atua ainda neutralizando o pH próximo à superfície celular e evitando uma drástica desidratação quando o meio apresenta altas concentrações de sal, possibilitando assim sua sobrevivência em ambientes hostis (ASHIUCHI; MISONO, 2002). Segundo Ashiuchi e Misono (2002), devido aos diversos grupos carboxílicos que compõe o γ -PGA, o biopolímero atua também como agente crioprotetor. No final da fase estacionária de crescimento do microrganismo, caracterizada pela escassez de nutrientes, o γ -PGA serve como fonte de carbono e nitrogênio, sendo então um polímero de reserva. Para a utilização do biopolímero como fonte de nutrientes este é hidrolizado através da enzima γ -glutamil hidrolase (KIMURA et al, 2004; CANDELA; FOUET, 2007), além das descritas no item 2.1.1 desta dissertação.

Além de contribuir para a sobrevivência em condições e ambientes adversos, o γ -PGA está relacionado com a virulência do microrganismo, protegendo-o do sistema imune do hospedeiro. O *B. anthracis* (causador do anthrax, doença letal na maioria dos casos, que atinge herbívoros e mamíferos, inclusive humanos) é capaz de produzir uma cápsula composta unicamente de γ -PGA, que impede o acesso de anticorpos do hospedeiro, potencializando sua virulência (BAJAJ; SINGHAL, 2011; CANDELA; FOUET, 2007). O *Staphylococcus epidermidis*, causador de uma séria infecção, após penetrar a epiderme do corpo humano, utiliza o γ -PGA sintetizado para escapar da fagocitose (KOCIANOVA et al, 2005).

Para a biossíntese do γ -PGA, primeiramente são sintetizados os monômeros de ácido D- e L-glutâmico, que posteriormente são unidos, formando a molécula do biopolímero. Os monômeros também podem ser fornecidos através do meio de cultivo.

O ácido L-glutâmico (L-glu) é produzido a partir do ácido cítrico que é convertido à ácido isocítrico e ácido α -cetoglutárico, através do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA).

A polimerização desse L-glu origina o γ -PGA. Duas rotas metabólicas são conhecidas para a obtenção do L-glu (KUNIOKA, 2007). Na ausência da glutamina, a síntese ocorre através da rota da glutamato desidrogenase (GD), onde o L-glu é formado a partir do ácido α -cetoglutárico e sulfato de amônio, sendo a reação catalisada pela enzima GD. Quando a glutamina está presente no meio, o L-glu é sintetizado através do ácido α -cetoglutárico e da L-glutamina, sendo a reação catalisada pela enzima glutamina-2-oxoglutarato aminotransferase (GOGAT). A L-glutamina pode ser regenerada a partir do L-glu e do sulfato de amônia, sendo essa reação catalisada pela enzima glutamina sintetase (GS) (SHIH; VAN, 2001). A Figura 5 mostra o ciclo TCA, com as duas possíveis rotas metabólicas de obtenção do γ -PGA.

A conversão do L-glu em seu isômero ácido D-glutâmico pode ser realizada através de duas rotas metabólicas, a direta e a indireta. Na rota direta, o L-glu é ativado por uma molécula de ATP e convertido ao seu D-isômero, sendo a reação catalisada pela enzima glutamil isomerase. A rota indireta ocorre em três etapas. Primeiramente ocorre uma transaminação entre o ácido pirúvico e o L-glu, dando origem à L-alanina. A L-alanina formada é convertida à D-alanina pela ação da alanina racemase. E, por fim, a enzima D-aminoácido aminotransferase catalisa a transaminação entre o ácido α -cetoglutárico e a D-alanina, formando o ácido D-glutâmico (BAJAJ; SINGAL, 2009). A Figura 6 ilustra os três passos para a conversão do L-glu em seu D-isômero. Segundo Kunioka (1997), uma molécula de γ -PGA é composta por isômeros de ácido D- e L-glutâmico na proporção média de 2:8, respectivamente.

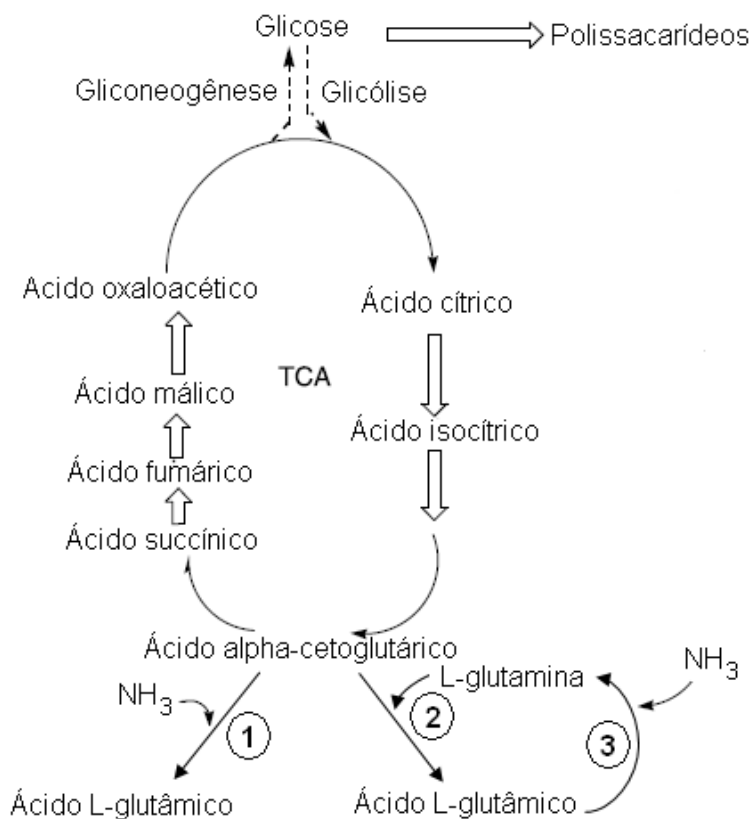


Figura 4: Ciclo TCA, com as duas possíveis rotas metabólicas de obtenção do γ -PGA. (1) GD, (2) GOGAT e (3) GS.
 FONTE: Adaptado de Shih e Van (2001).

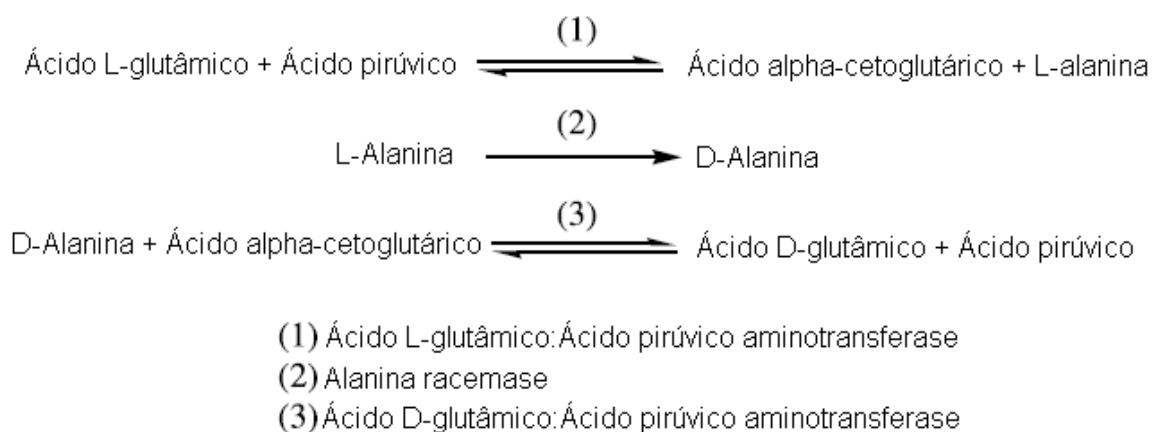


Figura 5: Mecanismo de conversão do ácido L-glutâmico em seu D-isômero.
 FONTE: Adaptado de Shih e Van (2001).

A síntese do γ -PGA ocorre através de complexos enzimáticos presentes na membrana celular e utiliza, além do ácido glutâmico, ATP como substrato. O processo é dividido em duas etapas, sendo a primeira a polimerização dos monômeros, formando a molécula de γ -PGA e a segunda o transporte dessa molécula para o meio extracelular, através da membrana plasmática (CANDELA; FOUET, 2006). A Figura 7 apresenta um esquema desse processo.

Conforme o esquema desenvolvido por Candela e Fouet (2006), após ser sintetizado e excretado para o exterior da célula, o γ -PGA pode ficar aderido à membrana celular, através do peptidoglicano, como mostra a Figura 6A, ou ser completamente liberado para o meio extracelular, como mostra a Figura 6B.

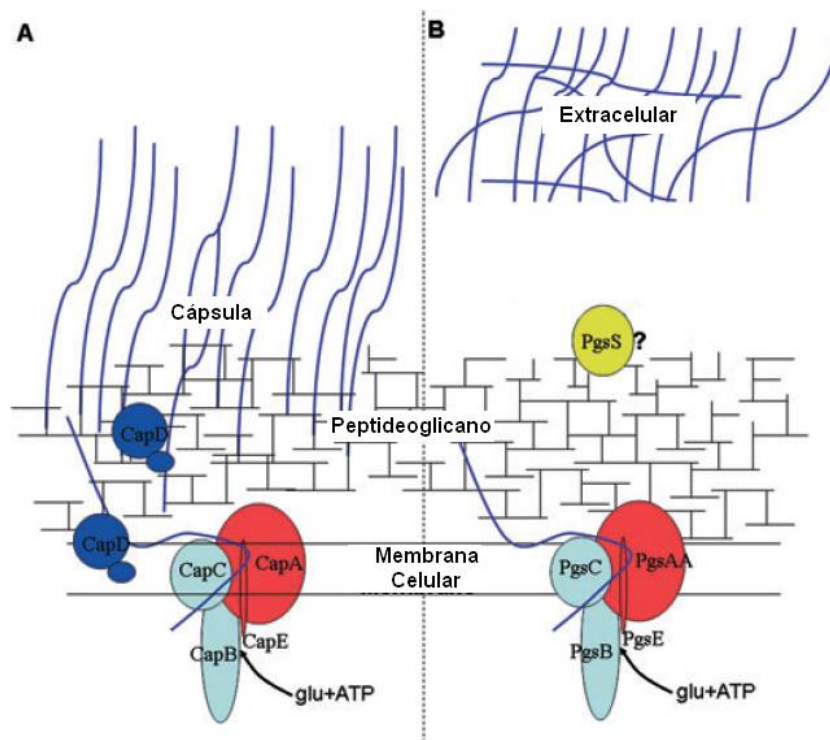


Figura 6: Esquema da síntese de γ -PGA onde o biopolímero: A) fica aderido à membrana celular e B) fica livre no meio extracelular. O complexo enzimático Cap é responsável pela síntese do γ -PGA ancorado a membrana celular, como ocorre no caso do *B. anthracis*. O complexo enzimático Pgs é responsável pela síntese do γ -PGA que é liberado extracelularmente, como ocorre no caso do *B. subtilis* e do *B. licheniformis*.

FOTNTE: Adaptado de Candela e Fouet (2006)

Quando o biopolímero encontra-se aderido à célula, formando uma cápsula, o complexo enzimático responsável pela síntese e transporte é denominado Cap, oriundo de cápsula. Nesse caso, a função do biopolímero está relacionada com a virulência, sendo o caso do *B. anthracis*. E, quando o γ -PGA é completamente liberado para o meio extracelular, o complexo enzimático é denominado Pgs, de poliglutamato sintetase, sendo que nesse caso, a função do biopolímero é a adaptação ao meio em condições adversas e a reserva de nutrientes (CANDELA; FOUET, 2006).

As enzimas CapB, CapC, PgsB e PgsC estão envolvidos na síntese do γ -PGA, que ocorre em três etapas. Primeiramente, uma molécula de ATP ativa o glutamato, de modo que este fique ancorado a uma molécula de ADP através de uma ligação γ . Esse processo fornece energia para a polimerização. Após, o glutamato ativado é transferido a uma proteína que contém um grupo tioéster (proteína S) e, por fim, o glutamato é transferido da proteína S para o filamento de PGA (CANDELA; FOUET, 2006).

CapA, CapE, PgsA e PgsE estão envolvidas no transporte do biopolímero do interior da célula, para o meio extracelular. Segundo Ashiuchi et al. (2004; 2001), as subunidades A e E são responsáveis por remover a cadeia ADP + glutamato do sítio ativo formado pelas subunidades B e C, permitindo que um novo monômero seja adicionado.

Segundo Candela e Fouet (2006), CapD é responsável por manter o γ -PGA associado à membrana celular, sendo essa subunidade localizada no peptidoglicado, para as bactérias em que o biopolímero forma a cápsula. Nas bactérias em que o biopolímero é completamente liberado para o meio extracelular, a subunidade PgsS possivelmente facilita o transporte.

2.1.3 Produção do γ -PGA e aspectos que potencializam seu rendimento

Para a obtenção do γ -PGA dois métodos de cultivo podem ser empregados: cultivo em estado sólido (CES) e cultivo submerso (CS). Devido às limitações do CES, como dificuldades na transferência de calor e massa, o que geralmente resulta em produções mais baixas, além de dificuldades na extração do biopolímero, a maior parte dos estudos realizados na produção do γ -PGA utiliza o método do CS. Com o intuito de otimizar o rendimento da produção do biopolímero, estudos investigaram os fatores que

influenciam no processo, como as exigências nutricionais das bactérias do gênero *Bacillus*, que depende de cepa, o pH, a aeração e a agitação (LU et al., 2004).

O meio de cultura mais utilizado para a produção do γ -PGA em cultivo submerso e também o que apresenta maior produção é o Caldo E, constituído de elevada concentração de fonte de carbono. O Caldo E é composto por ácido glutâmico, ácido cítrico, glicerol, cloreto de amônio, sulfato de magnésio, cloreto de ferro, fosfato de potássio, cloreto de cálcio e sulfato de manganês (LEONARD et al., 1958, apud OPPERMANN-SANIO; STEINBÜCHEL, 2002).

O ácido glutâmico e o ácido cítrico são os precursores do biopolímero, conforme a rota metabólica da síntese de produção γ -PGA, como já mostrado. O glicerol atua como um co-substrato, além de aumentar a permeabilidade da membrana celular pelo aumento da concentração de ácidos graxos insaturados e diminuição dos saturados, facilitando a excreção do γ -PGA para o meio extracelular, (CROMWICK; BIRRER; GROSS, 1996). Segundo Wu et al. (2010a), o glicerol atua também diminuindo a massa molar do biopolímero.

Segundo Lu et al. (2004), a ação do cloreto de amônio é semelhante à do sulfato de amônio, que aumenta a produção do γ -PGA quando aumenta sua concentração no meio, porém concentrações maiores do que 2,5 g/L podem estressar a célula. O composto atua como fonte de nitrogênio e também é utilizado nas duas rotas metabólicas de obtenção do L-glu (NH_3).

Segundo Huang et al. (2010), os íons K^+ e Mg^{+2} estimulam a produção do γ -PGA, pela ativação de complexos enzimáticos. Ainda de acordo com o mesmo autor, o íon Ca^{+2} , além de aumentar a atividade de enzimas relacionadas com a síntese do biopolímero, atua diminuindo a viscosidade do meio. Segundo Bajaj, Lee e Singhal (2009), o íon Mn^+ prolonga a viabilidade celular, aumentando a produção do biopolímero. Segundo Ashiuchi et al. (2004), o Zn^{+2} potencializa a ação do Mg^{+2} na ativação de complexos enzimáticos envolvidos na síntese do γ -PGA. Estudos realizados por Silva (2010) demonstram o efeito positivo do íon Zn^{+2} na produção do biopolímero. Bajaj e Singhal (2009) estudaram o efeito da adição de diversos aminoácidos e de intermediários do ciclo TCA como precursores metabólicos na produção de γ -PGA em cultivo submerso, por *B. licheniformis* NCIM2324. Com meio suplementado com L-glutamina e ácido α -cetoglutárico, a produção do biopolímero foi de 35,75 g/L, contra 26,12 g/L do meio controle (Caldo E sem os precursores).

O valor do pH do meio de cultivo influencia tanto na produção de biomassa e γ -PGA, quanto no consumo do ácido glutâmico. Cromwick, Birrer e Gross (1996) estudaram a influência do pH na taxa de produção do γ -PGA, por *B. licheniformis* ATCC 9945A, obtendo os melhores resultados em pH de 6,5. Para o *B. subtilis* IFO3335 estudado por Richard e Margaritis (2003), a maior produção de γ -PGA ocorreu em pH 7,0. Wu et al. (2010b) observaram a influência do pH no consumo de substratos de ácido glutâmico, sendo em pH 7,0 o melhor aproveitamento do amino ácido. Os melhores resultados para a produção de γ -PGA pelo *B. subtilis* CGMCC 0833 ocorreram quando o pH do meio foi alternado entre dois estágios. Nas primeiras 24h, o pH foi mantido em 7,0, ideal para a máxima produção de biomassa, sendo depois reduzido para 6,5, onde foi obtido o maior consumo de ácido glutâmico e conseqüente aumento na produção de γ -PGA.

A aeração e a agitação são aspectos que influenciam qualquer bioprocessos aeróbico, apresentando efeitos significativos nos principais biopolímeros, como por exemplo na goma xantana e no ácido hialurônico. Tanto a agitação quanto a aeração estão envolvidas nos processos de transferência de massa e oxigênio, porém de maneiras diferentes. A agitação contribui na transferência de nutrientes e na distribuição do oxigênio, enquanto que a aeração determina a oxigenação do cultivo, contribuindo ainda na homogeneização do meio de cultivo, principalmente em baixas velocidades de agitação (BAJAJ; SINGHAL, 2010). Segundo estudos de Bajaj e Singhal (2010), altas taxas de aeração e altas velocidades de agitação aumentam o crescimento do *B. licheniformis* NCIM 2324, mas nem sempre aumentam a produção de γ -PGA. A máxima produção do γ -PGA foi obtida a 750 rpm e 1vvm e o aumento da taxa de aeração diminuiu a massa molar do biopolímero. No trabalho de Silva (2010), o aumento da agitação de 500 para 1000 rpm a 2vvm não aumentou grandemente a produção do polímero, mas aumentou sua produtividade. Usando uma aeração de 1000 rpm, o tempo de cultivo pode ser reduzido para menos de 48 h, 50% do tempo requerido a 500 rpm.

Sendo o γ -PGA uma homopoliamida de elevada massa molar, sua excreção para o meio extracelular torna o meio viscoso. O aumento da viscosidade dificulta a transferência de oxigênio, limitando a utilização do gás pelo microrganismo. Sendo as bactérias do gênero *Bacillus* aeróbicas, essa viscosidade irá interferir na produção do biopolímero (YOON, et al., 2000). Dessa forma, qualquer estratégia que melhore a transferência de oxigênio para o microrganismo pode impactar positivamente na produção de biomassa e do biopolímero.

A produção industrial do γ -PGA está concentrada nos países asiáticos, onde se destacam o Japão, a China, a Coreia do Sul e a Índia. O primeiro relato da produção em larga escala do biopolímero data dos anos 90. Após estudos realizados pela Universidade de Osaka, no Japão, onde as condições do cultivo da cepa *B. subtilis* F-2-01 e produção de γ -PGA foram otimizadas, a empresa japonesa Meiji Seika Kaisha Co. adquiriu o processo de produção em escala industrial (SHIH; VAN, 2001).

A Ajinomoto Co. produz o γ -PGA em larga escala através de cultivo submerso, utilizando *B. subtilis* AJ12757. Em 2010 o biopolímero produzido pela companhia foi reconhecido como seguro (GRAS), sendo classificado como grau alimentício pela FDA (Food and Drug Administration) (FDA, 2012).

Outras duas companhias produzem o biopolímero industrialmente: a Nippon Poly-glu Co., e a Natto Biosciences. A Nippon Poly-glu Co., além de produzir o γ -PGA, comercializa também produtos para tratamento de águas e suplementos nutricionais a base do biopolímero (NIPPON POLY-GLU, 2012). A Natto Biosciences comercializa γ -PGA e seus derivados, além de oferecer parceria com empresas para o desenvolvimento de produtos que utilizam o biopolímero como matéria-prima (NATTO BIOSCIENCES, 2012).

2.1.4 Separação e purificação do γ -PGA

Uma vez que o γ -PGA sintetizado por bactérias do gênero *Bacillus* é excretado para o meio extracelular, a separação do biopolímero se torna facilitada, não havendo a necessidade do rompimento das células. A purificação do γ -PGA geralmente é feita em três etapas (SHIH; VAN, 2001), conforme descrito abaixo.

- Remoção das células: realizada através de centrifugação ou filtração (SHIH; VAN, 2001).
- Precipitação do γ -PGA: o meio, livre de células, é adicionado de solvente orgânico, em geral etanol, metanol ou propanol. A adição do solvente reduz a atividade de água, precipitando o biopolímero. A precipitação com álcool é considerada pouco seletiva, uma vez que permite a precipitação de proteínas e polissacarídeos, juntamente com o γ -PGA. O precipitado é centrifugado e solubilizado em água destilada para posterior purificação e caracterização (BUESCHER; MARGARITIS, 2007).

- Diálise de impurezas de baixa massa molar: a filtração por membrana semipermeável separa impurezas de baixa massa molecular, sendo a massa molecular limite pré-estabelecida e determinada pelos poros das membranas (BAJAJ; SINGHAL, 2011).

Em pH neutro, as células envoltas pelo γ -PGA apresentam cargas negativas, devido à ionização dos grupos carboxílicos presentes nas moléculas do biopolímero. Essa carga negativa presente na superfície das células faz com que elas apresentem uma alta estabilidade, dificultando sua sedimentação no processo de separação, o que já é prejudicado pela alta viscosidade do meio de cultivo. Em valores de pH baixos (cerca de 3), a carga da superfície das células é modificada, diminuindo sua estabilidade e facilitando o processo de sedimentação (DO; CHANG; LEE, 2001).

A quantificação do γ -PGA pode ser feita através de vários métodos, entre eles a cromatografia líquida de alta performance, eletroforese em gel de poliacrilamida e método colorimétrico rápido baseado na precipitação do γ -PGA, induzida por safranina (ASHIUCHI, 2011). Outro método de quantificação rápido e eficiente é o método espectrofotométrico de complexação do γ -PGA pelo brometo de cetiltrimetilamônio, que gera turvação do meio (ASHIUCHI, 2011). O método foi adaptado por Kanno e Takamaisu (1995) e já foi utilizado por Kada et al. 2004 e Silva (2010). Através de uma curva padrão é possível determinar a concentração de γ -PGA da solução, via espectrofotometria a 400 nm.

2.1.5 Aplicações tecnológicas do γ -PGA

O γ -PGA é uma homopoliamida solúvel, biodegradável, seqüestradora de íons metálicos, comestível e atóxica para seres humanos e para o meio ambiente. Essas características tornam esse biopolímero útil para várias aplicações tecnológicas (XIONG et al., 2005). Segundo Kunioka (2004), a biodegradabilidade do biopolímero o torna um potencial substituto de polímeros derivados do petróleo e que apresentam dificuldade na reciclagem, como por exemplo, polímeros absorvedores de fraldas descartáveis. Além disso, o desenvolvimento de filmes e embalagens derivados do γ -PGA é uma alternativa à exploração de fontes não-renováveis. Estudos relatam a aplicação desse biopolímero em diversas áreas industriais, como alimentos, cosméticos, medicina e tratamento de água (LU et al., 2004).

a) Aplicação na indústria de alimentos

O congelamento causa deteriorações indesejáveis em alimentos e células vivas. Para proteger alimentos congelados do efeito do congelamento, substâncias crioprotetoras são adicionadas em sua formulação, como sacarídeos, aminoácidos e sais derivados de aminoácidos. A atividade crioprotetora do γ -PGA está relacionada à sua capacidade de adsorver e, conseqüentemente, imobilizar moléculas de água (MITSUIKI et al., 1998). Segundo Mitsuiki et al. (1998), o γ -PGA com massa molar menor de 20 kDa apresenta uma maior atividade anticongelante quando comparado com a glicose, considerada uma substância de elevado poder anticongelante. Yokoigawa, Sato e Soda (2006), avaliaram o efeito da adição de γ -PGA na massa de pão francês congelada sobre a viabilidade celular da levedura. Os autores constataram que, após o descongelamento, a massa contendo o biopolímero apresentou maior quantidade de CO₂ produzido, em menos tempo de fermentação, indicando uma maior viabilidade celular das leveduras.

O γ -PGA também pode ser adicionado em formulações com o objetivo de mascarar sabores amargos. Os ingredientes que apresentam sabores amargos são alguns aminoácidos, peptídeos contendo aminoácidos N ou C-terminais, cafeína, alguns minerais e vitaminas. Sonoda, Sakai e Murase (2000) adicionaram um mascarador de sabor amargo composto por γ -PGA a uma solução contendo uma mistura de aminoácidos (L-lisina, L-iso-lisina e L-valina) e verificaram a ausência de sabor amargo, após administração oral.

A adição do γ -PGA em alimentos contendo amido, principalmente produtos de panificação e massas, contribui aumentando a vida de prateleira, além de melhorar a textura (SHIH; VAN, 2001). Shyu e Sung (2010) avaliaram as propriedades de um bolo amanteigado com a adição de γ -PGA. Os autores observaram que a adição do biopolímero aumentou a viscosidade, a estabilidade da emulsão e a estabilidade da espuma da massa, bem como melhorou a textura do bolo assado, retardando o endurecimento do miolo.

Lim et al.(2012) adicionaram γ -PGA na formulação de rosquinhas tipo doughnuts e verificaram que a absorção de óleo em 4 minutos de fritura foi de 0,2 g/g de massa, contra 0,7 g/g de massa do controle (sem a adição de γ -PGA). Portanto, o biopolímero pode ser utilizado como auxiliar na redução do teor de gordura em alimentos fritos, atuando na diminuição de absorção de óleo.

Devido à sua alta massa molar, o γ -PGA também pode ser adicionado como espessante. Yamanaka et al. (1991) cultivaram uma cepa de *B. subtilis* em meio composto por ácido glutâmico, glicose, fosfato de manganês e biotina, obtendo como resultado γ -PGA de massa molar entre 10^3 e 10^6 Da. O biopolímero produzido foi adicionado em sucos de frutas, aumentando a viscosidade da bebida, contribuindo na aceitabilidade do produto.

Segundo Tanimoto et al. (2007) o γ -PGA aumenta a biodisponibilidade do cálcio, uma vez que aumenta a solubilidade do mineral e sua absorção pelo intestino. O aumento da solubilidade ocorre devido ao biopolímero impedir a formação de um composto insolúvel (fosfato de cálcio). Esse efeito também pode ser observado em rações animais adicionadas do biopolímero, que promovem a absorção de minerais, como fósforo, aumentando a resistência da casca de ovos ou diminuindo o acúmulo de gordura corporal de aves (BAJAJ; SINGHAL, 2011).

b) Outras aplicações

O γ -PGA é um excelente umectante hidrofílico, que acentua os efeitos hidratantes de compostos naturais, como ácido láctico e ácido urocânico. O biopolímero atua ainda como inibidor da enzima hialuronidase, responsável por degradar o ácido hialurônico, componente do tecido conjuntivo, mantendo assim a elasticidade da pele. Em produtos para cabelo, o biopolímero pode atuar aumentando a capacidade de retenção de umidade, o que torna os fios mais fortes, principalmente no processo de branqueamento causado pelo envelhecimento. Além disso, o γ -PGA forma uma barreira contra a interação entre os compostos químicos presentes nas tinturas e as proteínas que compõem os fios, prolongando o efeito da coloração e aumentando a resistência aos danos causados (BEN-ZUR; GOLDMAN, 2007).

Na medicina, a aplicação do γ -PGA como veículo de medicamento tem despertado interesse, principalmente devido às suas características de biocompatibilidade e biodegradabilidade. Sua estrutura química característica, que apresenta grupos carboxílicos nas extremidades da cadeia, torna facilitada a conjugação de agentes quimioterápicos, contribuindo na solubilidade da droga e facilitando sua administração (BAJAJ; SINGHAL, 2011). O biopolímero forma um complexo com a droga, capaz de entrar nas células cancerosas e liberar ao longo do tempo a droga, uma vez que o γ -PGA é biodegradável. O produto da degradação do γ -PGA é o ácido glutâmico, metabolizado naturalmente pelas células, diminuindo a sobrecarga metabólica hepática e

a sobrecarga de excreção renal (SINGER, 2005). Ligações cruzadas entre gelatina e γ -PGA formam um gel que apresenta características que o torna um potencial adesivo cirúrgico e agente hemostático. O hidrogel formado apresenta degradação lenta, sem a indução de processos inflamatórios (BAJAJ; SINGHAL, 2011).

O γ -PGA é considerado um biofloculante em potencial, devido à sua capacidade de atuar sobre uma grande variedade de compostos orgânicos e inorgânicos. A atividade floculante do γ -PGA é influenciada pela concentração do biopolímero, pela adição de cátions multivalentes (Ca^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} aumentam sua atividade floculante) e pelo pH do meio. Os hidrogéis de γ -PGA, formados por ligações cruzadas induzidas por radiação gama também aumentam seu poder floculante (BAJAJ; SINGHAL, 2011). Essa característica o torna uma alternativa ao uso dos floculantes atualmente utilizados no tratamento de águas, que apresentam danos à saúde e meio ambiente, principalmente pelos resíduos formados na sua degradação. O biopolímero também pode ser utilizado como agente quelante em águas contaminadas por metais pesados. O γ -PGA aniônico apresenta alta afinidade com metais pesados, sendo ligação química facilitada com uma grande variedade deles, como Ni^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Al^{3+} e Cr^{3+} . O Fe, no seu estado oxidado também apresenta afinidade pelo γ -PGA (SHIH; VAN, 2001).

Ésteres derivados de γ -PGA têm sido estudados quanto à sua capacidade de formar filmes e fibras biodegradáveis, o que tornaria o biopolímero um potencial substituto de polímeros derivados do petróleo. O γ -PGA esterificado pode ser um excelente termoplástico, apresentando características necessárias para o processamento de polímeros, como ótima resistência, transparência e elasticidade (SHIH; VAN, 2001).

Outras aplicações do biopolímero também estão sendo estudadas, como agente de contraste, adjuvante de vacinas, agente imobilizador de proteínas, através de ligações covalentes agente microencapsulador de licopeno (BAJAJ; SINGHAL, 2011).

2.2 TRANSFERÊNCIA DE OXIGÊNIO EM CULTIVO SUBMERSO

Em microrganismos aeróbios o oxigênio apresenta um papel fundamental, uma vez que é o último aceptor de elétrons na cadeia respiratória, permitindo o armazenamento de energia na forma de ATP, contribuindo para a multiplicação microbiana e conseqüente obtenção de produtos de interesse (SHIMIDELL, 2001).

Para que o oxigênio fornecido ao meio de cultivo possa ser utilizado pelas células, uma série de resistências de transporte deve ser superada. Primeiramente, a bolha de gás formada pelas moléculas de oxigênio deve ser dissolvida no meio líquido, sendo que, para isso, deve superar a resistência mais representativa do processo, gerada pelo filme de líquido formado ao redor da bolha, também chamado de área de estagnação. Uma vez que o oxigênio esteja dissolvido no meio, ele pode ser transferido por difusão, através da membrana celular, para o interior da célula, sendo utilizado na rota metabólica do microrganismo. A escassez de oxigênio dissolvido no meio de cultivo afeta o crescimento de microrganismos aeróbios, bem como a geração de produtos provenientes desse metabolismo (HIXSON; GADEN, 1995).

O aumento das taxas de transferência do oxigênio para o meio líquido pode ser obtido através do projeto do biorreator, da velocidade de agitação ou do aumento da pressão do gás oxigênio que está sendo injetado ao sistema (ELIBOL, 1999). O biorreator tipo tanque agitado padrão apresenta altura do líquido igual ao diâmetro do tanque e é composto de um agitador tipo turbina centralizado e localizado logo acima do aerador, que dispersa bolhas de ar sobre ele (SILVA, 2010). Dessa forma, o ar que fornece o oxigênio é disperso através do líquido. A agitação controla a distribuição de nutrientes e do oxigênio, favorecendo a homogeneização. A aeração determina a oxigenação do meio de cultivo, contribuindo também na dispersão de partículas sólidas, principalmente nos casos em que a agitação é muito baixa (BAJAJ; SINGHAL, 2010).

Na produção de biopolímeros extracelulares, o meio de cultura assume um comportamento não-newtoniano ao longo do tempo de cultivo, devido à massa molar do produto ser muito elevada, acarretando no aumento da viscosidade aparente do meio. Nesse caso, a transferência de oxigênio é ainda mais dificultada, sendo a agitação um fator ainda mais relevante, pois, em fluidos pseudoplásticos, a velocidade de agitação diminui a viscosidade aparente do meio (ZHANG et al., 2012) e pode dessa forma aumentar a transferência de oxigênio.

Um dos parâmetros mais importantes em processos aeróbios é o coeficiente de transferência de oxigênio $k_L a$. O $k_L a$ representa a capacidade apresentada pelo biorreator de fornecer oxigênio às células, sendo também um parâmetro de comparação, além de poder servir como um critério para o escalonamento de processos (ELIBOL, 1999).

Dentre os diversos métodos de determinação do $k_L a$ existentes, o mais encontrado na literatura é o método dinâmico, sendo este baseado no balanço de massa para o oxigênio em estado transiente. O método consiste na utilização de um sensor de oxigênio dissolvido (OD), que monitora a concentração de OD no meio, durante o procedimento de medida. O procedimento consiste na interrupção do fluxo de ar no

biorreator, bem como a agitação, impedindo a transferência de oxigênio. Como consequência, a concentração de OD decai. A seguir, o fluxo de ar e a agitação serão restabelecidos, causando o aumento na concentração do oxigênio dissolvido até um valor estacionário de concentração (C_e). A Figura 8 apresenta o perfil da curva que representa a variação da concentração de OD durante o processo de medida do k_La .

A partir da determinação da curva, uma reta é construída, sendo o eixo das abscissas representando por valores de $(t_k - t_i)$ e o eixo das ordenadas pelo $\ln(C_e - C_i / C_e - C_k)$, onde t_k e t_i representam dois instantes genéricos compreendidos após o restabelecimento do fluxo de ar e equivalentes à concentrações C_i e C_k de oxigênio dissolvido. O k_La será determinado através do cálculo da inclinação da reta construída. Exemplo da reta obtida é ilustrado na Figura 9.

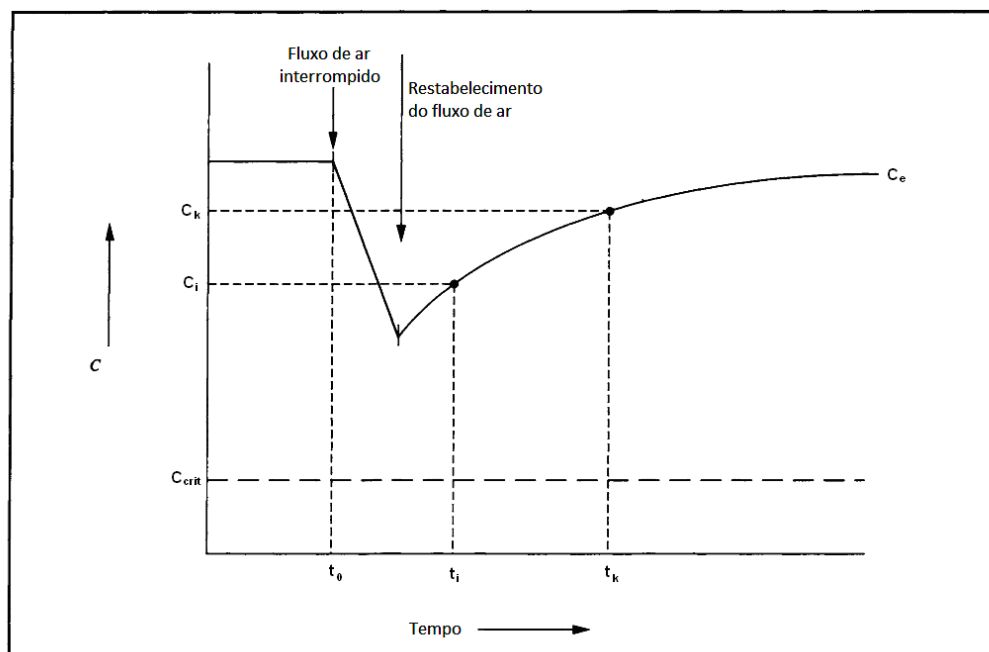


Figura 7: Variação do oxigênio dissolvido durante um ensaio.

FONTE: Adaptado de Doran (1995).

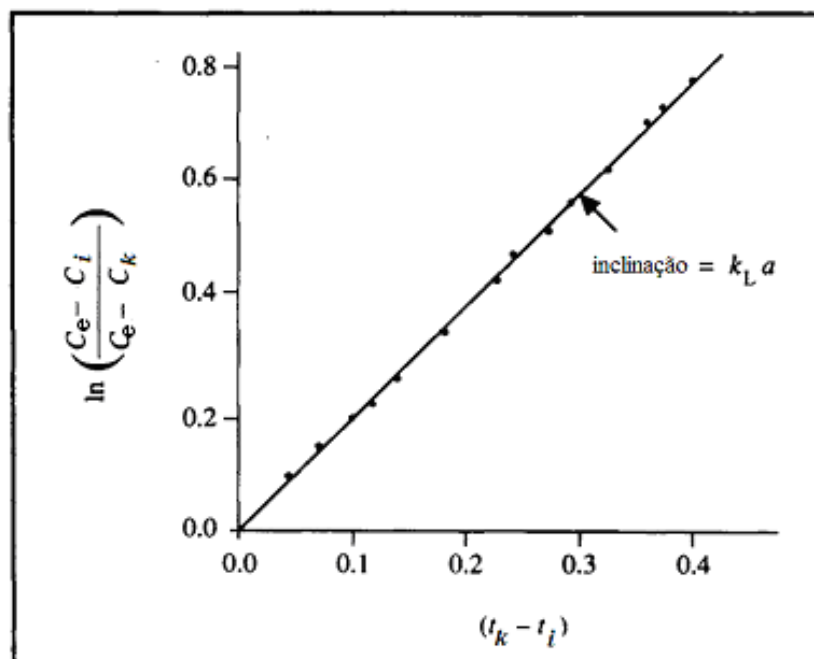


Figura 8: Gráfico representativo da determinação do $k_L a$ pelo método dinâmico.

FONTE: Adaptado de Doran (1995).

2.3 CARREADORES DE OXIGÊNIO

A transferência de oxigênio para o meio líquido pode ser um fator limitante nos bioprocessos de cultivo submerso. Estudos apontam que o uso de carreadores de oxigênio como uma alternativa para suprir a demanda do gás por microrganismos aeróbios em cultivos submersos se mostra bastante eficiente (ELIBOL, 1997). Os carreadores de oxigênio são compostos que atuam aumentando a solubilidade do gás no meio líquido, quando adicionados a ele. Exemplos de carreadores são os hidrocarbonetos, a hemoglobina, os silicones e os perfluorocarbonos.

Os perfluorocarbonos (PFCs) são compostos oriundos do petróleo, sintetizados pela substituição de átomos de hidrogênio por átomos de flúor, na molécula do hidrocarboneto. São termicamente estáveis e quimicamente inertes, devido a força das ligações entre carbono e flúor. A solubilidade do oxigênio nos PFCs é de 10 a 20 vezes maior do que em água (AMARAL et al., 2006). Sendo também inertes frente a sistemas

biológicos e enzimáticos, os PFCs compostos não apresentam toxicidade aos microrganismos (PILAREK; SZEWCZYK, 2008).

Elibol (1999) adicionou PFC no meio de cultivo para fermentação por leveduras e constatou que houve aumento da transferência de oxigênio no meio, resultando no prolongamento da fase lag do microrganismo, porém não alterando a concentração final da biomassa. Por outro lado, Pilarek e Szewczyk (2008), observaram que o cultivo submerso por *Saccharomyces cerevisiae* com adição de PFC apresentou aumento de 110% na biomassa, quando comparado a sistemas com aeração convencional. Liu et al. (2009) avaliaram a influência do oxigênio dissolvido na produção de ácido hialurônico por *Streptococcus zooepidemicus* e constataram que a adição de PFC aumentou a transferência de oxigênio ao meio líquido, sem a necessidade de altas velocidades de agitação, além de aumentar em 32% a produção do ácido.

O silicone é o segundo elemento mais abundante da natureza, sendo encontrado ligado ao oxigênio em várias estruturas de silicato. O silicone mais comum encontrado na natureza é o polidimetilsiloxano (PDMS): polímero que apresenta repetidas unidades de silicone e átomos de oxigênio unidos alternadamente por ligações siloxano na cadeia principal, além de dois grupos metílicos ligados a cada átomo de silicone. A Figura 10 ilustra a fórmula estrutural do PDMS. Ao contrário dos polímeros sintéticos oriundos do petróleo, os PDMS são obtidos através de uma fonte de sílica e metanol (GRAIVER; FARMINER; NARAYAN, 2003).

A solubilidade do gás oxigênio nos PDMS é de 45 a 50 vezes maior do que a solubilidade do gás em água. Sendo os PDMS quimicamente inertes e resistentes ao calor, esses polímeros representam uma boa alternativa aos PFCs (DEY; NORRLÖW; LIU, 2004).

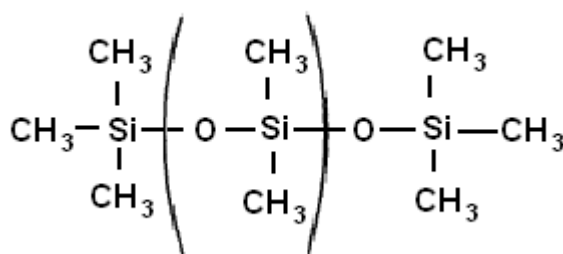


Figura 9: Estrutura química do PDMS.

FONTE: Adaptado de Graiver, Farminer e Narayan (2003).

As vantagens da utilização dos PDMS em relação aos PFCs são sua não-toxicidade a seres humanos e seu custo mais baixo. Além disso, como a solubilidade do oxigênio é menor nos PFCs, maiores quantidades do polímero derivado do petróleo são necessárias para efeitos similares no crescimento da biomassa (DEY; NORRLÖW; LIU, 2004).

Dey, Norrlöw e Liu (2004) adicionaram PDMS ao meio de cultivo de *Bacillus thuringiensis* e verificaram que houve aumento na taxa de transferência de oxigênio para o meio líquido e, conseqüentemente, aumento da biomassa em 1,5 vezes, quando comparado ao meio controle (sem adição do silicone).

Rech (2010) avaliou o efeito da adição de PDMS ao meio de cultivo na produção de lipases em cultivo submerso de *Staphylococcus warneri* EX17. A adição de 13,5% (v/v) de PDMS ao meio de cultivo aumentou em 3,8 vezes o coeficiente de transferência de oxigênio (K_{La}) e a produção máxima de lipase ocorreu na metade do tempo, quando comparado a um cultivo sem a adição do silicone.

Visto que, na produção de γ -PGA, o meio de cultivo se torna altamente viscoso e a transferência de oxigênio passa a ser dificultada, o uso de carreadores de oxigênio seriam uma alternativa para o aumento da produção desse biopolímero, fazendo com que o oxigênio não fosse mais o fator limitante na produção, ou que sua limitação fosse retardada. Zhang et al. (2012) investigaram o uso de carreadores de oxigênio (n-hexano, n-heptano, n-hexadecano e n-dodecano) na produção e na massa molar do γ -PGA. Esses autores concluíram que a adição do n-hexano, do n-heptano e do n-hexadecano aumentaram a produção do biopolímero, mas o uso do n-dodecano, além de diminuir a produção do biopolímero, gerou moléculas de menor massa molar. Não foram encontrados estudos que avaliaram a produção do γ -PGA com a adição de PDMS.

3. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigos científicos que serão submetidos à publicação. Os artigos constituintes desse capítulo estão apresentados nos itens Resultados I e II, respectivamente.

3.1 Resultados I – Characterization of γ -PGA produced by *Bacillus subtilis* BL53.

O primeiro artigo, intitulado “Characterization of γ -PGA produced by *Bacillus subtilis* BL53” consiste na caracterização do γ -PGA produzido a partir de cultivo submerso de *B. subtilis* BL53 em biorreatores. Caracterizou-se o biopolímero quanto sua massa molar, seu comportamento reológico e suas temperaturas de transição e decomposição, em dois tempos de cultivo. Identificaram-se suas possíveis aplicações, conforme as características encontradas.

Characterization of γ -PGA produced by *Bacillus subtilis* BL53

Alessandra de Cesaro¹, Suse Botelho da Silva², Marco Antônio Záchia Ayub^{1*}

¹Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves 9500, PO Box 15090, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil; ²Food Engineering, Polytechnic School, Vale do Rio dos Sinos University, Av. Unisinos, 950. São Leopoldo, RS 93022-000, Brazil.

Abstract

The aim of this research was to characterize the γ -PGA produced by *Bacillus subtilis* BL53 in order to identify its potential applications. Bacterial cultivations were carried out in bioreactors on medium E at 37 °C, 2 vvm and 1000 rpm. γ -PGA was extracted from culture broth after 48 and 96 h of cultivation. The biopolymer was characterized by measurements of the average molecular mass (M_w) by static light scattering, melting (T_m) and deterioration (T_d) temperatures, and rheological properties of biopolymer solutions. There was no significant difference in M_w for biopolymers obtained in different cultivation times (M_w $(1.47 \pm 0.30) \times 10^6$ g mol⁻¹ at 48 h; $(1.49 \pm 0.23) \times 10^6$ g mol⁻¹ at 96 h). Both solutions of biopolymers obtained at 48 h and 96 h presented a Newtonian behaviour. The viscosity was higher for the 96 h biopolymer solutions, indicating a wider molecular mass distribution. Thermal analysis showed a T_m of 134 °C and 128 °C and a T_d range of 130 - 190 °C and 130 - 215 °C for 48 h and 96 h biopolymers, respectively. T_m peak area and fusion enthalpy were higher for 96 h biopolymer, indicating a higher crystallinity compared to 48 h γ -PGA. These characteristics of γ -PGA produced by *Bacillus subtilis* BL53 support the possibility of its use as thickener and functional ingredient in food, antitumor agent, and biological adhesives in medicine.

Key-words: Poly- γ -glutamic acid, biopolymers, average molecular mass, melting temperature, deterioration temperature, viscosity.

(*) Corresponding author: (MAZ Ayub); e-mail: mazayub@ufrgs.br; Phone +55 (51)

33086685

1. Introduction

Poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) is a water-soluble biodegradable biopolymer consisting of D and L-glutamic acid, connected by amide linkages between α -amino and γ -carboxyl groups. First reported as a capsule of *Bacillus anthracis*, it is known that the biopolymer is produced by microbial fermentation, mainly by strains of *Bacillus sp.* (SHIH; VAN, 2001; BAJAJ; SINGHAL, 2011; XU, et al., 2005).

The γ -PGA characteristics, as edible and non-toxic toward humans and the environment (BAJAJ; SINGHAL, 2011) allows for the biopolymer application in several industry sectors. In the food industry for instance, it may be used as thickener, bitterness relieving agent and cryoprotectant (SHIH; VAN, 2001); in medicine, γ -PGA has found applications as sustained-release material, drug carrier (LI et al., 1998) and biological adhesives (OTANI; TABATA; IKADA, 1999); in agriculture, it has been used as heavy metal absorber and fertilizer (KING; FISTER; NORRIS, 2007), and in wastewater treatment as flocculants (SHIH; VAN, 2001). For the development of applications, the characterization of γ -PGA produced by the microorganism is very important, because each application is based on specific properties of the biopolymer.

Since the γ -PGA synthesis is a biotechnological process, the molecular mass of biopolymer cannot be easily controlled and fractions of different sizes are produced. According to Shih and Van (2001), the average molecular weight of γ -PGA can vary from 10^5 to 10^7 g mol⁻¹ and the polydispersity from 2 to 5. The molecular mass and polydispersity variation are related to the producer organism, growing conditions, and the action of enzymes secreted by the microorganism in the late stationary phase of growth (SHIH; VAN, 2001; CANDELA; FOUET, 2006). Most of the molecular mass determinations of γ -PGA have been performed by gel permeation chromatography (GPC) (BAJAJ; SINGHAL, 2011). However, weight average molecular weight may be determined by static light scattering (SLS), without molecular mass standard as in GPC.

Some studies have been conducted in order to characterize the rheological behavior of γ -PGA during the microbial cultivation time. In solution, the purified γ -PGA generally presents a pseudoplastic behavior (IRURZUN et al., 2011). On the other hand, the thermal analyses are used to determine the crystal melting temperature (T_m) and the degradation temperature (T_d) of a biopolymer. T_m is generally determined by differential scanning calorimetry (DSC), which monitors the heat exchange involved in the heating or cooling of a sample. T_d may be determined by thermogravimetric analysis (TGA), thought

the loss of sample mass as a function of temperature (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005). Both T_m and T_d are used to define the use of the biopolymer during products development.

The aims of this study were to characterize the γ -PGA produced by *B. subtilis* BL53, a strain isolated from Amazonian environment, in order to provide insights for the application development. The molecular weight, rheological properties of solution, and thermal properties of γ -PGA were determined. The γ -PGA characterized in this work was obtained from culture broth after 48 h and 96 h of cultivation. The influence of the cultivation time on the biopolymer characteristics was also investigated.

2. Materials and methods

2.1 Strain

The strain used in this research was isolated in the aquatic Amazonian environment and subsequently identified as *Bacillus subtilis* (strain BL53) (SILVA, 2010). Certified stocks are kept at the Microbiology Culture Collection of BiotechLab (UFRGS, Brazil). The 16S rDNA sequence was deposited in NCBI GenBank database under the accession number JQ359757. Working stocks of cultures were maintained frozen at -18 °C in 20 % glycerol suspensions, while for immediate use, cells were kept at 4 °C on Luria-Bertani agar plate containing (in g L⁻¹): peptone, 10; yeast extract, 5; NaCl, 10; agar, 23.

2.2 Cultivation conditions for γ -PGA production

For the pre-inoculum, a loopful of cells was transferred from the plate to an Erlenmeyer flask containing LB broth (peptone, 10 g L⁻¹; yeast extract, 5 g L⁻¹; NaCl, 10 g L⁻¹) and incubated at 37 °C and 180 rpm on a rotary shaker, until reaching a optical density of 1.0 ± 0.1 at 600 nm. 10 % (volume fraction) of the pre-inoculum was transferred to a 5 L working volume stirred-tank bioreactor (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Germany). Broth culture medium was 2.5 L of medium E of Leonard (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958), supplemented with Zn²⁺ (SILVA, 2010), comprising (in g L⁻¹): glutamic acid, 20; citric acid, 12; glycerol, 80; NH₄Cl, 7; MgSO₄·7H₂O, 0.5; FeCl₃·6H₂O, 0.04; K₂HPO₄, 0.5; CaCl₂·2H₂O, 0.15; MnSO₄·H₂O, 0.04;

ZnSO₄·7H₂O, 0.35. The cultivations were carried out in duplicate at 37 °C, pH 7.0, 1 000 rpm stirring, and 2 vvm of aeration, which corresponds to an oxygen volumetric mass transfer (k_La) of 33 h⁻¹.

Samples were taken along the cultivation to quantify poly- γ -glutamic acid and viable cells. For γ -PGA characterization, samples were collected at 48 h and 96 h, because the maximum production yield was reached at 48 h of cultivation and kept constant along 96 h.

2.3 Extraction and quantification of γ -PGA

A 50 % (mass fraction) trichloroacetic solution was added to broth culture until pH 3.0 was achieved, kept under agitation at 50 °C for another 20 min. The solution was then centrifuged at 15 000 g, 15 °C and 30 min. The supernatant was collected, the pH was adjusted to 7.0 and five volumes of ethanol were added. A further centrifugation was conducted at 15 000 g, 4 °C and 30 min. After the second centrifugation, the pellet was dissolved in phosphate buffered pH 7.0 \pm 0.1 at ionic strength 0.13 M. All dilutions cited in the characterization analyzes were made with this same buffer as the solvent.

The γ -PGA solutions obtained were quantified by the complexation spectrophotometric method with cetyltrimethylammonium bromide, adapted from Kanno and Takamatsu (1995). γ -PGA (MM: 70-100 kDa, Sigma-Aldrich) was used as spectrophotometric standard and the absorbance of the complex was measured at 400 nm.

γ -PGA stock solutions obtained from extraction of broth culture at 48 h and 96 h cultivations were used for the subsequent characterization of the biopolymer.

2.4 Static Light Scattering (SLS)

Static Light Scattering (SLS) was performed using a Brookhaven Instruments ALV-5000 system, comprising a BI 200M goniometer and multi- τ real-time digital correlator (AL-Laser Vertriebsgesellschaft mbH, Langen, Germany). The instrument was equipped with a 22 mW He-Ne laser source, operating at a wavelength of 632.8 nm. Runs were carried out using an angular range from 50 ° to 135 ° at 25 °C. Samples for examination by SLS were placed in cylindrical light scattering cuvettes (Pyrex disposable culture tubes;

Corning Inc., Corning, New York) and the specific refractive increment used was 0.14 mL g^{-1} , according to Irurzun et al. (2001)

In order to prepare samples for analysis, γ -PGA stock solutions with concentration ranging from 50 to 1000 mg L^{-1} were filtered through a $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ cellulose acetate membrane. To minimize dust contamination, all operations involved in the preparation of the samples for SLS were performed in a laminar airflow cabinet.

From SLS data were calculated the mass average molecular mass (M_w), the second virial coefficient (A_2), and radius of gyration (R_g), using Zimm Plot. M_w was calculated as the average based on the mass fraction of the molecules of a specific molecular mass (HIEMENZ, 1984).

2.5 Rheology

In order to evaluate the effect of γ -PGA concentration on the system rheology, biopolymer solutions were prepared in three different concentrations (in g L^{-1}): 10, 15, and 20. The effects of temperature on the rheology of γ -PGA solution were also evaluated (10, 20, 40 and $60 \text{ }^\circ\text{C}$). Rheological measurements were performed using a Brookfield viscometer Model DV-II+Pro Digital (Brookfield Engineering, USA) and the data acquisition and analysis were carried out using Rheocalc software (Brookfield Engineering, USA).

2.6 Thermal Analysis

For the thermal analysis, aliquots from stock solutions were lyophilized, and the powder obtained was used as samples in the subsequent analysis.

Melting temperature (T_m) was determined by differential scanning calorimetry (DSC). DSC experiments were performed using a DSC 6000 (Perking Elmer, USA). Samples were deposited in aluminium pans and heated at a heating rate of $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$. Argon was used as purge gas at a flow of 20 mL min^{-1} . An empty aluminium pan was used as the reference sample and the calibration gas was indium. T_m was determined through the endothermic peak obtained and data analysis was treated mathematically using Pyris software (Perking Elmer, USA). Crystal melting occurs in an endothermic reaction and the peak temperature is associated with the temperature at which maximum reaction rate occurs.

Degradation temperature (T_d) was determined by thermal gravimetric analysis (TGA). TGA were performed with TGA Q5000IR (TA Instruments, USA), at a heating rate of $10\text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ under a nitrogen atmosphere flow of 25 mL min^{-1} , in a temperature range of 0 to $250\text{ }^\circ\text{C}$.

3. Results and discussion

The maximum yield of γ -PGA produced by *B. subtilis* BL53 was 15 g L^{-1} , in 48 h of cultivation, at the end of the exponential growth phase; during the stationary phase, γ -PGA production apparently stops, but its concentration stayed constant. Considering the biopolymer yield, the cultivation should be discontinued after 48 h. However, some aspects along cultivation could influence the properties of γ -PGA, justifying a longer kinetics in order to investigate whether continued polymerization or the formation of aggregates by intermolecular interactions could generate longer molecular chains. Other aspects worth investigating in longer kinetics are that the high stirring rate ($1\ 000\text{ rpm}$) necessary to oxygen transfer in the high viscous broth, and the action of degrading enzymes could cleave γ -PGA, which would become accessible to cells as energy source, therefore reducing its molecular size or concentration.

3.1 Static Light Scattering (SLS)

Table 1 shows the results obtained in SLS by Zimm plot for both times of cultivation. There is no significant difference for M_w and R_g between the biopolymers obtained. The positive values of A_2 found in SLS for both samples, indicate that the phosphate buffer of pH 7.0 at 0.13 ionic strength used as solvent in this study is adequate. A solvent considered good extends biopolymer chains, favoring biopolymer-solvent interaction (HIEMENZ, 1984). The higher value for A_2 found for 96 h biopolymer suggests the presence of more fractions with lower molecular weight, which contributes for better interactions of biopolymer-solvent. This is an indicative that the biopolymer obtained in 96 h presents higher molecular mass distribution around the M_w than the in 48 h.

Table 1: Mass average molecular weight (M_w), second virial coefficient (A_2), and radius of gyration of the molecules (R_g) obtained in SLS by Zimm plot, for γ -PGA samples obtained in 48 h and 96 h of cultivation of *B. subtilis* BL53, in bioreactor at 37 °C, 1000 rpm and 2 vvm.

Sample	M_w ($\times 10^6$) g mol ⁻¹	R_g nm	A_2 cm ³ mol g ⁻²
48 h	1.47 ± 0.30	108 ± 17	(1.44 ± 0.20) × 10 ⁻³
96 h	1.49 ± 0.23	105 ± 14	(4.50 ± 0.40) × 10 ⁻³

The molecular size is the most important characteristic of biopolymers, since it affects properties in solutions and, consequently, its use in a variety of applications. The polymerization process results in molecules of different sizes, naturally exhibiting a molecular size distribution. Therefore, the techniques used to measure molecular size of biopolymers will always measure an average molecular mass (HIEMENZ, 1984). In biological systems, as in the case of γ -PGA production, the polydispersity is even more difficult to control, since it depends on the bacterial strain, the cultivation conditions, the growth phase, and the enzymes secreted by the microorganism capable to cleave the biopolymer molecule (CANDELA; FOUET, 2006). Under similar cultivation conditions (1 vvm and 1000 rpm), Bajaj and Singhal (2010) obtained a γ -PGA with a M_w of 7.4×10^5 g mol⁻¹ at 48 h and a M_w of 8.9×10^4 g mol⁻¹ at 96 h.

According to Sung et al (2005), γ -PGA with high molecular weight increases the calcium solubility and absorption in the small intestine, and may be used as functional additive in development of new products in the food industry. The same authors held a study injecting Transmissible GastroEnteritis Virus Nucleocapside (TGEN) with γ -PGA in rabbits booster and observed that the animals that received the highest molecular mass γ -PGA presented a higher antibody production. High molecular weight γ -PGA may be a potential antitumor agent that can modulate the immune system (SUNG et al., 2005). Furthermore, the application of high molecular mass γ -PGA might be used in the development of biodegradable plastics (BAJAJ; SINGHAL, 2011).

R_g is defined as the average distance between each small segment of the biopolymer chain to its mass center and it is related with the molecular conformation (BREWER; STRIEGEL, 2011). It means that the smaller the R_g , more compact is the molecule, in a random coil. According to the results shown in Table 1, no significant difference was found between the 48 h and 96 h biopolymer, suggesting that there was no

difference in the molecular conformation over cultivation time. The structural conformation of γ -PGA is influenced by ionization of their side chains, which is related to the biopolymer concentration and pH; in aqueous solutions of pH higher than 6.5, γ -PGA molecules present a random coil conformation (KREJTSCHI; HAUSER, 2011). Since both samples present the same pH, the only factor that could influence in the molecular conformation was the cultivation time, which was not observed.

3.2 Rheology

In order to evaluate the rheological behavior of γ -PGA solutions in different concentrations, the relationship between apparent viscosity and shear rate (Figure 1a), and stress and shear rate (Figure 1b) for each biopolymer solution was evaluated. Data from γ -PGA solutions obtained with 48 h and 96 h biopolymer with concentrations of 10, 15, and 20 g L⁻¹ are shown.

In Newtonian fluids, shear rate is directly proportional to shear stress and the proportionality constant is the absolute viscosity. This is the behavior observed in γ -PGA solutions tested. The apparent viscosity of solutions of 48 h biopolymer in all concentrations studied is lower than for samples of 96 h (Figure 1a). Generally, the difference in apparent viscosity is related to the molecular mass. However, the M_w for biopolymer obtained after 48 h and 96 h have no difference. Since the M_w represents the average of various fractions found in a biopolymer solution, the results obtained to apparent viscosity suggests that the 96 h biopolymer has a higher polydispersivity. Probably, in 48 h, the polymeric mixture presents less variation around the average molecular mass obtained in SLS, while in 96 h the polymeric mixture presents bigger and smaller fractions than the average value (high polydispersivity). The fractions with higher molecular mass reflected in the higher apparent viscosity of the 96 h biopolymer.

The biopolymer chain can further elongate during the stationary phase generating aggregates by intermolecular interactions, producing higher molecular weight fractions. The lower molecular weight fractions obtained are probably products of enzymatic activity, common for bacteria of the genus *Bacillus*, enzymes that are capable of cleaving the biopolymer molecule into small fractions, allowing the microorganism to use them as energy source (YAO et al., 2009). High stirring rates are also related with low molecular weight fractions formation, duo to the shear effect (BAJAJ; SINGAL, 2010).

The viscosity of γ -PGA solutions in different concentrations is shown in Figure 2, where it is possible to observe a linear correlation between biopolymer concentration and viscosity. Based on this fact it is possible to predict the solution viscosity for concentrations between 10 and 25 g L⁻¹, which is very useful in the application development.

Biopolymers presenting high viscosities are important in the food industry. Yamanaka et al. (1991) patented a γ -PGA solution with high viscosity as a drink agent. The drink agent was added to fruit juices beverages improving the drinkability; added to sport drinks, it improved the sensorial qualities. According to Shyu and Sung (2010) the addition of γ -PGA with high viscosity in sponge cake increased the emulsion and foam stability of the dough, delayed staling of cake crumb, as well as improved the texture of cooked cake. In the medicine, high viscous solutions of γ -PGA may be used to the development of biological adhesives (BAJAJ; SINGHAL, 2011).

Figure 3 shows the influence of temperature on viscosity of 20 g L⁻¹ solutions of 48 h and 96 h biopolymer. Similar behavior was observed for lower concentrations. Fit data to a linear model allowed the prediction of viscosity of biopolymer solution as a function of temperature in the range from 10 to 60 °C. The reduction of viscosity with increasing temperatures is well reported and, in the case of biopolymers, results from the cleavage of intermolecular interaction bounds and alleviation of the tensions, allowing greater chain mobility. The chain segments slides over each other (plastic deformation), the chain undergoes a stretching (elastic deformation) and the random coil conformation expands facilitating chain mobility and hence the fluid flows more easily, resulting in a lower viscosity (HO et al., 2006).

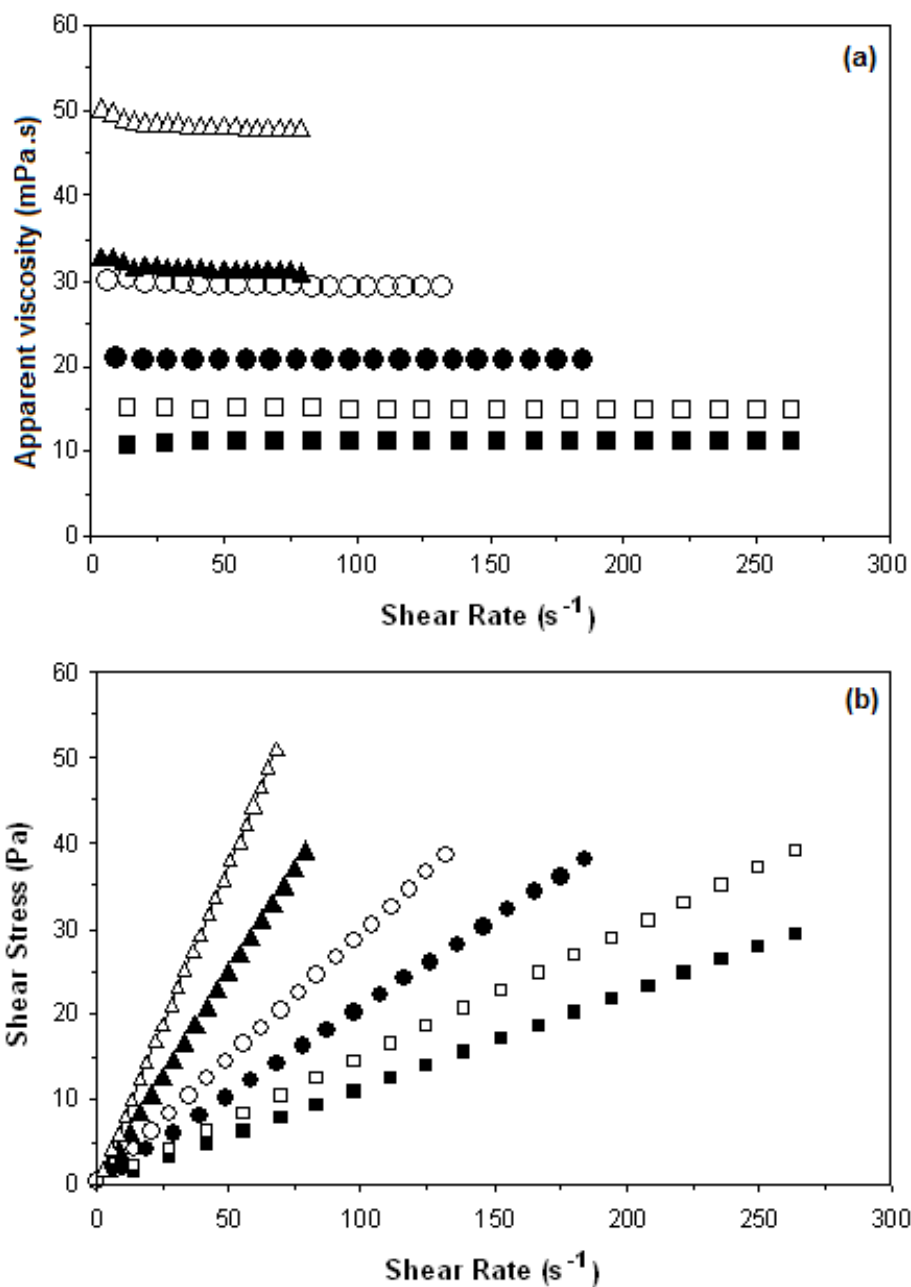


Figure 1: (a) Relationship between apparent viscosity and shear rate for both samples, at 20 °C. (b) Relationship between shear stress and shear rate for both samples, at 20 °C. Closed symbols for 48 h samples and open symbols for 96 h samples. Different concentrations are: (■) 10 $g L^{-1}$, (●) 15 $g L^{-1}$ and (▲) 20 $g L^{-1}$.

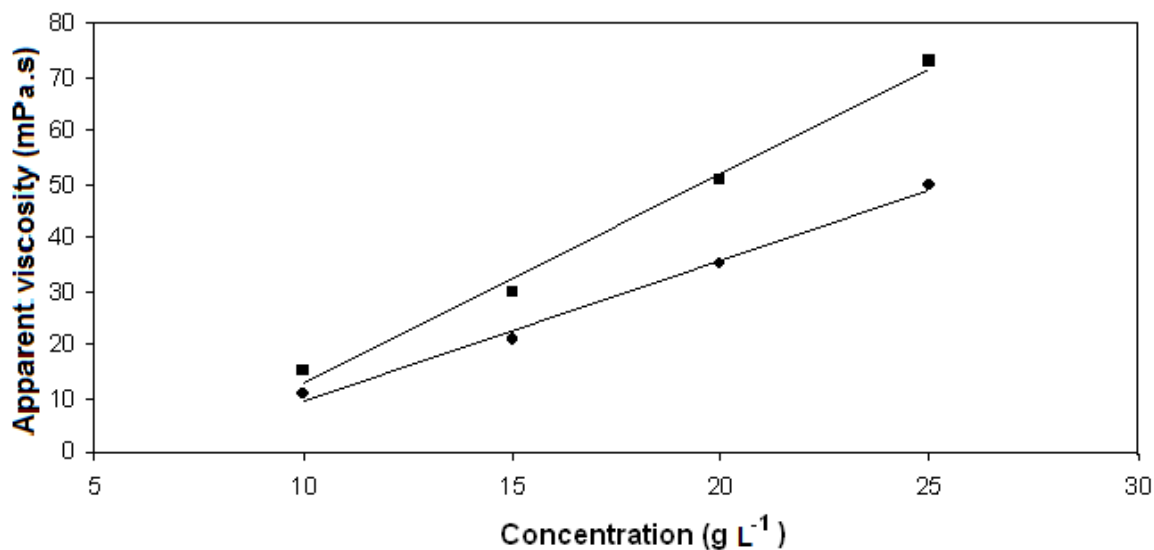


Figure 2: Correlation between γ -PGA solutions with different concentrations and its relative apparent viscosity, at 20 °C. (●) 48 h sample (line equation $y = 2.62x - 16.6$ and $R^2 = 0.9923$) and (■) 96 h (line equation $y = 3.90x - 26.2$ and $R^2 = 0.9925$).

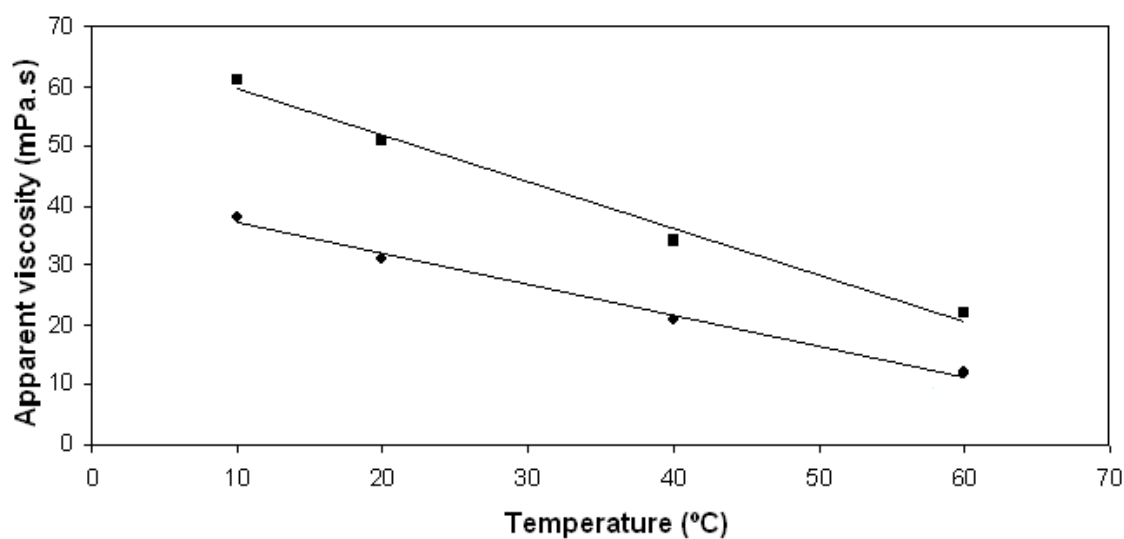


Figure 3: Correlation between γ -PGA solutions at 20 g L⁻¹ in different temperatures and apparent viscosity. (●) 48 h sample (line equation $y = -0.51x + 42.13$ and $R^2 = 0.9935$) and (■) 96 h (line equation $y = -0.77x + 67.3$ and $R^2 = 0.9896$).

3.3 Thermal Analysis

Crystal melting is characterized for the melting temperature (T_m), in which the biopolymer becomes completely amorphous, with full mobility of the chains, due to intra and intermolecular bound disruptions, caused by temperature rise. T_m is a thermodynamic transition and occurs in an endothermic process (KHACHATOORIAN; PETRISOR; YEN, 2004).

The biopolymer degradation is characterized by its loss of mass, decreasing in average molecular mass (M_w), and the loss of mechanical properties, such as tensile and compressive (BARBANTI; ZAVAGLIA; DUEK, 2005). TGA is able to determine the degradation temperature (T_d) of a sample.

Table 2 shows the results obtained in DSC for 48 h and 96 h biopolymers. For the sample 48 h, the endothermic peak occurs between 132 °C and 149 °C and for the 96 h sample, between 120 °C and 159 °C. Despite the T_m for both samples present similar values, the 96 h sample showed a peak with higher area and melting enthalpy. This result suggests that the 96 h sample presents more crystalline regions than the 48 h one. When a biopolymer has more crystalline regions (a higher crystallinity degree), the crystal melting will occur in a higher time interval because higher energy will be necessary to melt the more organized regions. (BANNACH et al., 2011); thus, higher melting enthalpy indicates more crystallinity. These results corroborate the hypothesis of the 96 h biopolymer presents more fractions of higher molecular weight than 48 h one, because longer chains are able to arrange themselves in a more organized way, contributing for the increasing of biopolymer crystallinity degree.

Table 2: Melting temperature (T_m), peak area and melting enthalpy obtained in differential scanning calorimetry (DSC), γ -PGA samples obtained in 48 h and 96 h of cultivation of *B. subtilis* BL53, in bioreactor at 37 °C, 1 000 rpm and 2 vvm.

Sample	T_m (°C)	Peak area (mJ)	ΔH (J/g)
48 h	134	808	112
96 h	128	944	138

The knowledge of the crystal melting temperature is important for the development of product suffering heat treatment. When γ -PGA is used as drug carrier, for example, the biopolymer must be heated above its melting temperature. In this way it becomes amorphous, ensuring the liberation of carboxyl groups. Carboxyl groups offer attachment points for the conjugation of drugs, mainly chemotherapeutic agents, thereby rendering the drug more soluble and easier to administer (BAJAJ; SINGHAL, 2011). The crystallinity degree is important in the biofilms and plastic development. Higher crystallinity results in a harder and more thermally stable material, but also more brittle, whereas the amorphous regions provide certain elasticity and impact resistance (CHARLES; CARRAHER, 2005; MENGES et al., 2002; BONNET, 2008).

Figure 4a shows the TGA curve for the 48 h sample. It is seen a loss of mass, between 120 °C and 190 °C, with a residue of 42 %, in the process end. Figure 4b shows the TGA curve for the 96 h sample. It is also seen a unique loss of mass, between 120 °C and 215 °C, with a residue of 36 %, in the process end. The higher temperature interval in the 96 h sample probably is due to the higher crystallinity. Thermal decomposition of γ -PGA occurs through a mechanism consisting in an end-of-chain unzipping cyclodepolymerisation reaction. Depolymerisation takes place with releasing of pyroglutamic acid and gradually decreases of biopolymer length (PORTTILA-ARIAS et al., 2007).

The degradation temperatures found for the biopolymers studied in this work limits its application in products where treatment with high temperatures is necessary. However in applications where the treatment temperature is inferior to T_d , as thickener in fruit juices with pasteurization temperatures between 60 and 75 °C and biological adhesives, its degradation temperature do not presents a limit in its use. According to Portilla-Arias et al (2007), modifications of γ -PGA by esterification of carboxylic side groups may modify the biopolymer properties, and to become the biopolymer more resistant to thermal degradation.

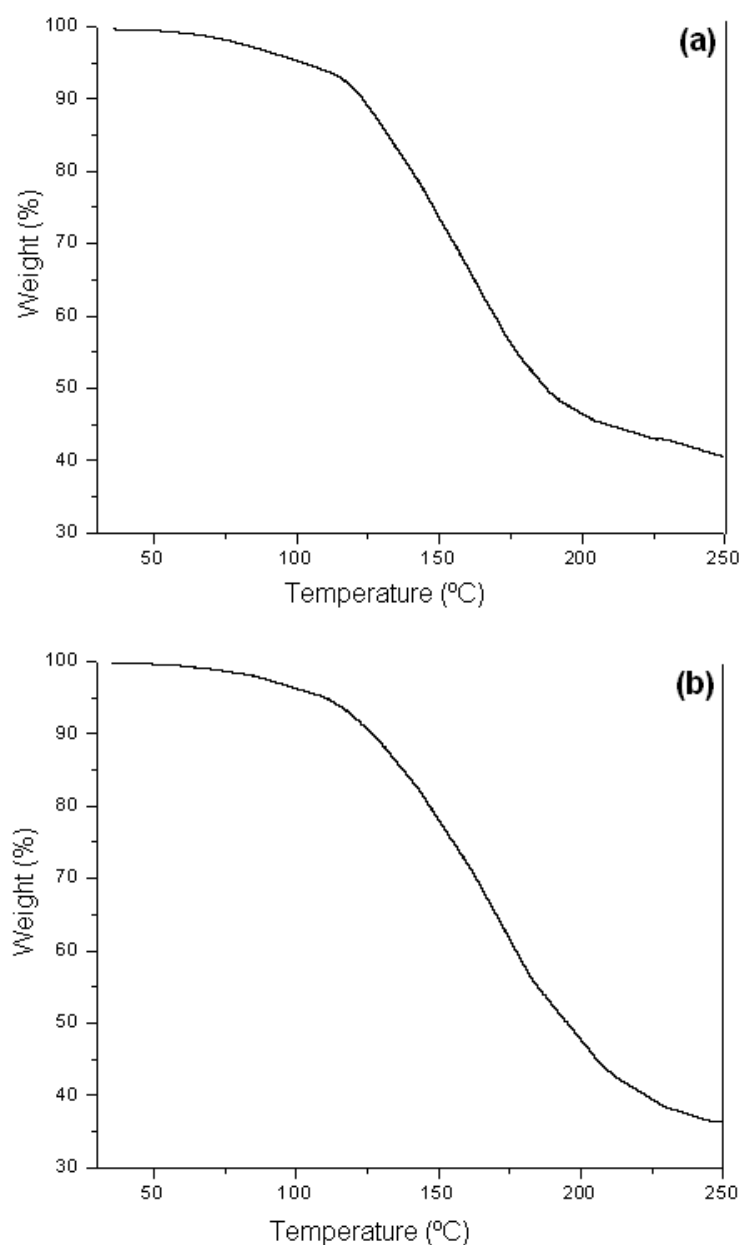


Figure 4: Curves obtained in TGA analysis at a heating rate of $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Two samples were analyzed: (a) 48 h and (b) 96 h.

4. Conclusion

γ -PGA produced by *B. subtilis* BL53 presents a mass average molecular weight on the order of 10^6 g mol^{-1} , and did not show significant differences between the biopolymers obtained at 48 h and 96 h. Rheology of γ -PGA solutions in concentrations of 10, 15 and 20 g L⁻¹ presented a Newtonian behavior. The viscosity was higher in the 96 h biopolymer

solutions, indicating a wider molecular weight distribution around the average found in the SLS. Thermal analysis indicated T_m of 134 °C and 128 °C and a T_d of between 120-190 °C and 120-215 °C for 48 h and 96 h biopolymer respectively. T_m peak area and fusion enthalpy were higher for 96 h biopolymer indicating a higher crystallinity comparing to 48 h samples. The characteristics of γ -PGA produced by *B. subtilis* BL53 suggest its possible use in the food industry, as thickener and functional ingredient, and as biodegradable plastics. In the medicine, the biopolymer produced in this study could be tested as a component of antitumoral agents and biological adhesive.

5. References

BAJAJ, I; SINGHAL, R. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. **Bioresource Technology**, v. 2, p. 5551-5561, 2011.

BAJAJ, I; SINGHAL, R. 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, p. 635-640, 2010.

BARBANTI, S. H; ZAVAGLIA, C. A. C; DUEK, E. A. R; Bioresorbable polymer in Tissue Engineering. **Polymers: science and Technology**, v. 15, n 1, p. 13-21, 2005.

BONNET, M. **Plastic in Engineering applications: properties, processing and practical use of polymeric materials**. Netherlands: Vieweg + Teubner Verlag, 2008. 282 p.

BREWER, A. K; STRIEGEL, A, M. Characterizing String-of-Pearls colloidal Silica by Multidetector Hydrodynamic Chromatography and Comparison to Multidetector Size-Exclusion Chromatography, Off-Line Multiangle Static Light Scattering, and Transmission Electron Microscopy. **Analytical Chemistry**, v. 83, p. 3068–3075, 2011.

CANDELA, T; FOUET, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, p. 1091-1098, 2006.

CHARLES, E; CARRAHER, J. **Polymer Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 2005. 893 p.

HIEMENZ, P. C. **Polymer Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1984. 722 p.

HO, G. H; HOC, T. I; HSIEHB, K. H; SUD, Y. C; LINE, P. Y; YANGA, J; YANGA, K, H; YANGA, S. C. Gamma-Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural Characteristics, Chemical Properties and Biological Functionalities. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 53, p. 1363-1384, 2006.

IRURZUN, I; BOU, J. J; CAMERO, G. P; ABAD, C; CAMPOS, A; GUERRA, S. M. Mark-Houwink Parameters of Biosynthetic Poly(gamma-glutamic acid) in Aqueous Solution. **Macromolecular Chemical Physics**, v. 202, p. 3253-3256, 2001.

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

KING, W.E; FISTER, R.P; NORRIS, S.J. Slow-release fertilizer and method of making and using same. **WO/024753**, 2007.

KREJTSCHI, C; HAUSER, K. Stability and folding dynamics of polyglutamic acid. **Journal of European Biophysics**, v. 40, p. 673–685, 2011.

LEONARD, C. G., HOUSEWRIGHT, R. D. ;THORNE, C. B. Effects of Some Metall iclonson Glutamyl Polypeptide Synthesis by Bacillus-Subtilis. **Journal of Bacteriology**, v. 76, n. 5, p. 499-503, 1958.

LI, C; YU, D.F; NEWMAN, A; CABRAL, F; STEPHENS, C; HUNTER, N; MILAS, L; WALLACE, S. Complete regression of well-established tumors using novel water soluble

poly (L-glutamic acid) – paclitaxel conjugate. **Cancer Research**, v. 58, p. 2404–2409, 1998.

MENGES, G; HABERSTROH, E; MICHAELI, W; SHMASHTENBERG, E. **Plastic Material Science**. Munich: Hanser Verlag, 2002.

OTANI, Y; TABATA, Y; IKADA, Y. Sealing effect of rapidly curable gelatin-poly (L-glutamic acid) hydrogel glue on lung air leak. **Anatomic Thoracic Surgery**, v. 67, p. 922–926, 1999.

PORTILLA-ARIAS, J. A; GARCÍA-ALVAREZ, M; ILARDUYA, A. M; MUÑOZ-GUERRA, S. Thermal decomposition of microbial poly(γ -glutamic acid) and poly(γ -glutamate)s. **Polymer Degradation and Stability**, v. 92, p. 1916-1924, 2007.

SHIH, I; VAN, Y. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. **Bioresource Technology**, v. 79, p. 207-225, 2001.

SHYU, YS; SUNG, WC. Improving the Emulsion Stability of Sponge Cake by the Addition of Gamma-Polyglutamic Acid. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 18, p. 895-900, 2010.

SILVA, S. B. **Produção e otimização do processo de obtenção de ácido γ -poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53**. Tese de doutorado – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SUNG, M. H; PARK, C; KIM, C. J; POO, H; SODA, K; ASHIUCHI, M. Natural and edible biopolymer poly- γ -glutamic acid: synthesis, production, and application. **The Chemical Record**, v. 5, p. 352-366, 2005.

XU, H; JIANG, M; LI, H; LU, D; OUYANG, P. Efficient production of poly(γ -glutamic acid) by newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2. **Process. Biochem**, v. 40, p. 519–523, 2005.

YAMANAKA, SHIGERU, KIKUCHI, REIKO. New Gamma-Polyglutamic Acid, Production Thereof and Drink Agent Containing the Same. **Japanese Patent JP1990000074192**, 1991.

YAO, J; JING,J; XU, H; LIANG, J. WU, Q; FENG, X. OUYANG, P. Investigation on enzymatic degradation of γ -polyglutamic acid from *Bacillus subtilis* NX-2. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 56, p. 158-164, 2009.

3.2 Resultados II - Bioreactor kinetics and the effects of polydimethylsiloxane (PDMS) on γ -PGA production by *Bacillus subtilis* BL53

O segundo artigo, intitulado “Bioreactor kinetics and the effects of polydimethylsiloxane (PDMS) on γ -PGA production by *Bacillus subtilis* BL53” consiste no estudo da cinética do cultivo submerso de *Bacillus subtilis* BL53, para obtenção de γ -PGA, utilizando diferentes meios de inóculo e adicionando precursores da rota metabólica ao meio de cultivo. Este estudo foi realizado em agitador orbital e a condição que apresentou a maior produção de γ -PGA foi escalonada para biorreator. Nos cultivos em biorreatores foram avaliados a produção do biopolímero com e sem a adição do PDMS e o efeito do carreador no coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (K_{La}).

**Bioreactor kinetics and the effects of polydimethylsiloxane (PDMS) on γ -PGA
production by *Bacillus subtilis* BL53**

Alessandra de Cesaro¹, Suse Botelho da Silva², Marco Antônio Záchia Ayub^{1*}

¹Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State, Av. Bento Gonçalves 9500, PO Box 15090, Porto Alegre, RS 91501-970, Brazil; ²Food Engineering, Polytechnic School, Vale do Rio dos Sinos University, Av. Unisinos, 950. São Leopoldo, RS 93022-000, Brazil.

Abstract

In this research the effect of different inocula and metabolic pathway precursors in the poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) production by *Bacillus subtilis* BL53 were evaluated through detailed analysis of the cultivation kinetics. In a second stage, the use of polydimethylsiloxane (PDMS) as an oxygen carrier in bioreactor cultivations was evaluated on the γ -PGA production and the best volumetric oxygen mass transfer coefficient (k_La) was defined. It was found that the best inoculum medium for biopolymer production was the LB broth. When metabolic pathway precursors L-glutamine and α -ketoglutaric acid were added to the culture medium, γ -PGA production increased 20 % in relation to the medium in the absence of precursors. The addition of 10 % (volumetric fraction) of PDMS to cultures as oxygen carrier produced enhanced oxygen mass transfer, with increased k_La , and improved γ -PGA production and productivities. The bioreactor culture of *B. subtilis* BL53 on medium *E* with glutamine and α -ketoglutaric acid and PDMS produced a productivity of 1 g L⁻¹ h⁻¹ of γ -PGA after only 24 h at 1 000 rpm, 2 vvm, and 37 °C. The results indicated that the *B. subtilis* BL53 strain is a good γ -PGA producer, showing a typical kinetics of exogenous glutamic acid-dependent strain.

Key-words: poly-gamma-glutamic acid; polydimethylsiloxane; oxygen carrier;
Bacillus subtilis

(*) Corresponding author: (MAZ Ayub); e-mail: mazayub@ufrgs.br; Phone +55 (51) 33086685

1. Introduction

Poly- γ -glutamic acid (γ -PGA) is an anionic naturally occurring homo-polyamide, which consists of D and L-glutamic acid monomers connected by amide linkages between α -amino group and γ -carboxyl group. Discovered by Ivanóvisc and co-workers as a capsule of *Bacillus anthracis*, γ -PGA is also found as an extracellular biopolymer produced predominantly by bacteria belonging to *Bacillus* sp. and other gram-positive genera. *B. subtilis* and *B. licheniformis* are the main strains used for the γ -PGA production, and they have been isolated mainly from soil and traditional foods in Asian countries (SHIH; VAN, 2001; BAJAJ; SINGHAL, 2011; XU; CHEN; YU, 2005). γ -PGA is water soluble, biodegradable, edible, non-toxic and environmentally safe (BAJAJ; SINGHAL, 2011). These characteristics make it a product of high interest, finding applications in several industry sectors, such as the food industry, used as thickener, bitterness reliving agent, and cryoprotectant (SHIH; VAN, 2001); it is also used in medicine, as a drug delayed-release carrier (LI et al., 1998), in agriculture, as a heavy metal absolver and in waste water treatment as biopolymer flocculants (SHIH; VAN, 2001).

The microbial biosynthesis of γ -PGA is carried out in two steps, with the formation of glutamic acid, which is then polymerized, yielding the biopolymer molecule. The synthesis occurs through the metabolic pathway of the TCA cycle (KUNIOKA, 1997), and culture medium components may influence the development of this enzymatic machinery. Medium "E" (ME), developed by Leonard and co-workers (LEONARD; HOUSEWRIGHT; THORNE, 1958) is frequently used to grow *Bacillus* for γ -PGA production in submerged cultivations. Glycerol, citric acid, and L-glutamic acid are the main components of ME, and are necessary for biomass and γ -PGA production. Citric and L- glutamic acids act as precursors of polymer (BUESCHER; MARGARITIS, 2007; SHIH; VAN, 2001), while glycerol acts as a co-substrate. Although glucose is an excellent carbon source for both cell growth and γ -PGA production by *Bacillus*, glycerol presents the advantage of stimulating polyglutamylsynthetase, the enzyme required to catalyze the polymerization of L-glutamic acid to γ -PGA. Intermediate metabolites of TCA cycle, such as L-glutamine and

α -ketoglutaric acid, can also stimulate the enzymatic activity necessary for the biopolymer production (BAJAJ; SINGHAL, 2009; KUNIOKA, 1995).

In γ -PGA production oxygen plays an important role since it is the last electron acceptor in the respiratory chain, and allows for the storage of energy in ATP form, essential for cell growth and the metabolite production (ZHANG et al., 2012b). Mass transport resistances must be overcome because during the course of cultivation the extracellular γ -PGA produced greatly increases the viscosity, due to its high molecular mass ($10^5 - 10^6$ Da) (RICHARD; MARGARITIS, 2003). One possible approach to enhance oxygen supply to culture is to increase the solubility of oxygen in the medium by the addition of oxygen carriers such as hydrocarbons, hemoglobin, perfluorocarbons and silicones (RECH; VOLPATO; AYUB, 2012; ZHANG et al., 2012b).

Recently, polydimethylsiloxane (PDMS) has been used in submerged bacteria cultures and proved to enhance oxygen supply, consequently improving cell metabolism and growth (RECH; VOLPATO; AYUB, 2012). PDMS is a chemically and enzymatically inert polymer of silicon and oxygen atoms, alternately linked by siloxane bonds in the main chain, with two methyl groups attached to each silicon atom (GRAIVER; FARMINER; NARAYAN, 2003). The solubility of oxygen in PDMS is 45-50 times higher than that in water (DEY; NORRLÖW; LIU, 2004).

The aim of this study was to evaluate the effects of different inocula and metabolic pathway precursors in the γ -PGA production by *Bacillus subtilis* BL53 through detailed analysis of the cultivation kinetics. Furthermore, cultures were scaled up to bioreactors and the use of PDMS as oxygen carrier was evaluated, analyzing the γ -PGA production and the impact on the oxygen mass transfer coefficients (k_{La}).

2. Materials and methods

2.1. Strain

The strain used in this research was isolated in the aquatic Amazonian environment and subsequently identified as *Bacillus subtilis* (strain BL53) (SILVA, 2010). Certified stocks are kept at the Microbiology Culture Collection of BiotecLab (UFRGS, Brazil). The 16S rDNA sequence was deposited in NCBI GenBank database under the accession number JQ359757. Working stocks of cultures were maintained frozen at -18 °C in 20 % glycerol suspensions, while for immediate use, cells were kept at 4 °C on

Luria-Bertani agar plate containing (in g L⁻¹): peptone, 10; yeast extract, 5; NaCl, 10; agar, 23.

2.2. Culture media

Besides the traditional Luria Bertani broth (LB, comprising peptone, 10 g L⁻¹; yeast extract, 5 g L⁻¹; NaCl, 10 g L⁻¹), the following media were tested: medium LB_{Glu} was the Luria Bertani broth supplemented with glutamic acid (20 g L⁻¹); medium E refers to medium E described by Leonard, Housewright and Thorne (1958) supplemented with Zn²⁺ (SILVA, 2010), comprising (in g L⁻¹): glutamic acid, 20; citric acid, 12; glycerol, 80; NH₄Cl, 7; MgSO₄·7H₂O, 0.5; FeCl₃·6H₂O, 0.04; K₂HPO₄, 0.5; CaCl₂·2H₂O, 0.15; MnSO₄·H₂O, 0.04; ZnSO₄·7H₂O, 0.35; medium E(-glu) was medium E without glutamic acid; finally, medium E(+prec) was medium E supplemented with metabolic pathway precursors, L-glutamine (0.075 g L⁻¹) and α-ketoglutaric acid (1.46 g L⁻¹), according to Bajaj and Singhal (2009). The pH of the media was adjusted to 7.0 with NaOH or HCl.

2.3. Pre-Inocula test

Three media were used (LB, E, and LB_{Glu}) for evaluation of the influence of the pre-inoculum medium on subsequent γ-PGA production (always carried out on medium E). For the preparation of inoculum, a loopful of cells was inoculated into Erlenmeyer flasks containing the specific medium, and they were incubated at 37 °C and 180 rpm on a rotary shaker. The inocula for all cultivation essays were standardized to 1.0 ± 0.1OD (optical density) at 600 nm and were added to culture medium at 10 % (volume fraction). The cultivation was carried out at 37 °C and 180 rpm, on a rotatory shaker during 96 h. Samples were taken along the time course of cultivations to quantify poly-γ-glutamic acid, viable cells, citric acid, glutamic acid, and glycerol. All the experiments were carried out in duplicate.

For all the subsequent essays in flask and in bioreactor, the inoculum medium was LB. The inocula for all cultivation were standardized as described above.

2.4. Flask culture

For the evaluation of the influence of L-glutamic acid in the culture medium to γ -PGA production, LBGlu and E(-glu) were used. To evaluate the effects of the addition of metabolic pathway precursors on γ -PGA production, culture media E and E(+prec) were used. Flask cultures were carried out in 125 mL Erlenmeyer flasks, each containing 30 mL of the specific medium. The flasks were incubated for 96 h on a rotary shaker at 37 °C and 180 rpm.

Samples were taken along the time course of cultivation to quantify poly- γ -glutamic acid, viable cells, citric acid, glutamic acid, and glycerol. All the experiments were carried out in duplicate.

2.5. Use of PDMS and metabolic pathway precursors in bioreactor

Batch cultivations were carried out in a 5 L working volume stirred tank bioreactor (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Germany) filled with 2.5 L of culture medium. The bioreactor was equipped with temperature, agitation, aeration, and pH controllers and two Rushton turbines with six flat-blades, 3 cm distant from each other. Dissolved oxygen in the culture broth was measured using a polarographic electrode (Mettler-Toledo, Germany). Four different culture medium were evaluated: E, E(+prec), E supplemented with 10 % (volume fraction) of polydimethylsiloxane (PDMS; 200Fluid, Food Grade, 350 cSt., Dow Corning, USA) and E(+prec) supplemented with 10 % (volume fraction) of PDMS. A small amount of 0.1 % (volume fraction) of Antifoam 204 (organic non-silicone Emulsion, Sigma, USA) was added for foaming control in cultures with medium E and E(+prec) without PDMS.

The cultivations were carried out at 37 °C, pH 7.0, 1 000 rpm and 2 vvm (volumes of air per volume of broth) of aeration, during 96 h. Samples were taken along the cultivation in order to quantify poly- γ -glutamic acid, viable cells, citric acid, glutamic acid and glycerol. Cultivations were carried out in duplicate.

2.6. Analytical methods

γ -PGA was quantified by complexation spectrophotometric method with cetyltrimethylammonium bromide, adapted from Kanno and Takamatsu (1995). γ -PGA (MM: 70-100 kDa, Sigma-Aldrich) was used as spectrophotometric standard and the absorbance of the complex was measured at 400 nm. For extraction of polymer from

culture medium, trichloroacetic acid solution (6.26 % in mass fraction) was added until the pH was reduced to 3.0. The mixture was centrifuged at 15000 g, 15 °C and 30 min. The supernatant was collected, the pH adjusted to 7.0 ± 0.1 and five volumes of ethanol were added. A further centrifugation was conducted at 15 000 g, 4 °C and 30 min. After the second centrifugation, the pellet was dissolved in buffer solution of pH 7.0 ± 0.1 and the complexation reaction was carried out.

The viable cells were quantified by the Spread Plate technique. After successive decimal dilutions of the culture broth, defined dilutions were inoculated in *Plate Count Agar* (PCA) and incubated at 37 °C for 18 h (APHA, 2001).

Citric acid, glycerol, and glutamic acid concentrations were determined using a HPLC (Shimadzu Corp. Japan) with a RID-10A refractive index detector. The stationary and mobile phases were an Aminex HPX-87H column (300 x 7.8 mm) (Bio-Rad, USA) and $0.005 \text{ mol L}^{-1} \text{ H}_2\text{SO}_4$ solution, at 0.6 mL min^{-1} respectively. The column temperature was controlled at 45 °C. The glutamic acid was quantified as α -hydroxy acid derivative, being possible to use the same column, according to Pleissner, Wimmer and Eriksen (2011). For the derivatization reaction, 1 mL of the filtrated sample was transferred to a 2.5 mL Eppendorf with 0.2 mL of 1M KNO_3 and 0.04 mL of 12M HCl. This mixture was maintained at 45 °C for 90 min. The reaction was finished by the addition of 0.43 mL of 2M NaOH.

2.7. Oxygen volumetric mass transfer coefficient (k_La)

The oxygen volumetric mass transfer coefficient (k_La) was determined by the dynamic method described by Doran (1995). This coefficient was measured from dissolved oxygen data at mid-exponential growth.

3. Results and discussion

3.1. Effects of the pre-inoculum medium on the γ -PGA production

Figure 1 shows the kinetics of the cultivations in the three different inocula media (LB, E, and LBG) used to evaluate the production of γ -PGA. It is possible to identify the consumption of glycerol, citric acid and glutamic acid, indicating that the cells are using the TCA metabolic pathway to form γ -PGA. Using LB as pre-inoculum medium, the subsequent γ -PGA production on medium E was the highest when compared with media

E and LB_{Glu} (Figure 1a). Surprisingly, pre-inoculum made up with medium E (Figure 1b), in turn, showed a faster growth and more vigorous biomass production, but γ -PGA production was about 40 % smaller than for LB. Usually, the use of the same medium for pre-inoculum and culture produces better results in terms of cell formation and product yield, since cell adaptation is faster, reducing or suppressing the lag phase. *Bacillus* produces γ -PGA as a glutamate source in starvation during stationary phase, or under stressed conditions (CANDELA; FOUET, 2006), thus an abrupt change from LB (pre-inoculum) to medium E (cultivation medium) might have stimulated higher γ -PGA yields. Other authors reported the use of a modified LB pre-inoculum by replacing the yeast extract for beef extract, inducing the spore formation (SHIH; VAN; CHANG, 2002; SUNG et al., 2005).

Figure 1c shows the kinetics for cultures pre-inoculated with LB_{Glu}. The glutamic acid was added, since it is a precursor of γ -PGA and could stimulate the biopolymer production. Results, however, showed that the culture deviated its metabolism towards biomass formation and the complete suppression of γ -PGA production. Kambourova, Tangney and Priest (2001) reported that glutamic acid showed different responses for specific strains of *B. subtilis* and *B. licheniformis*, either repressing the expression of γ -PGA biosynthetic enzymes genes when added to early cultures of some strains, while inducing this expression for others (KAMBOUROVA; TANGNEY; PRIEST, 2001).

Accordingly to these results, the pre-inoculum medium chosen for the next experiments was LB.

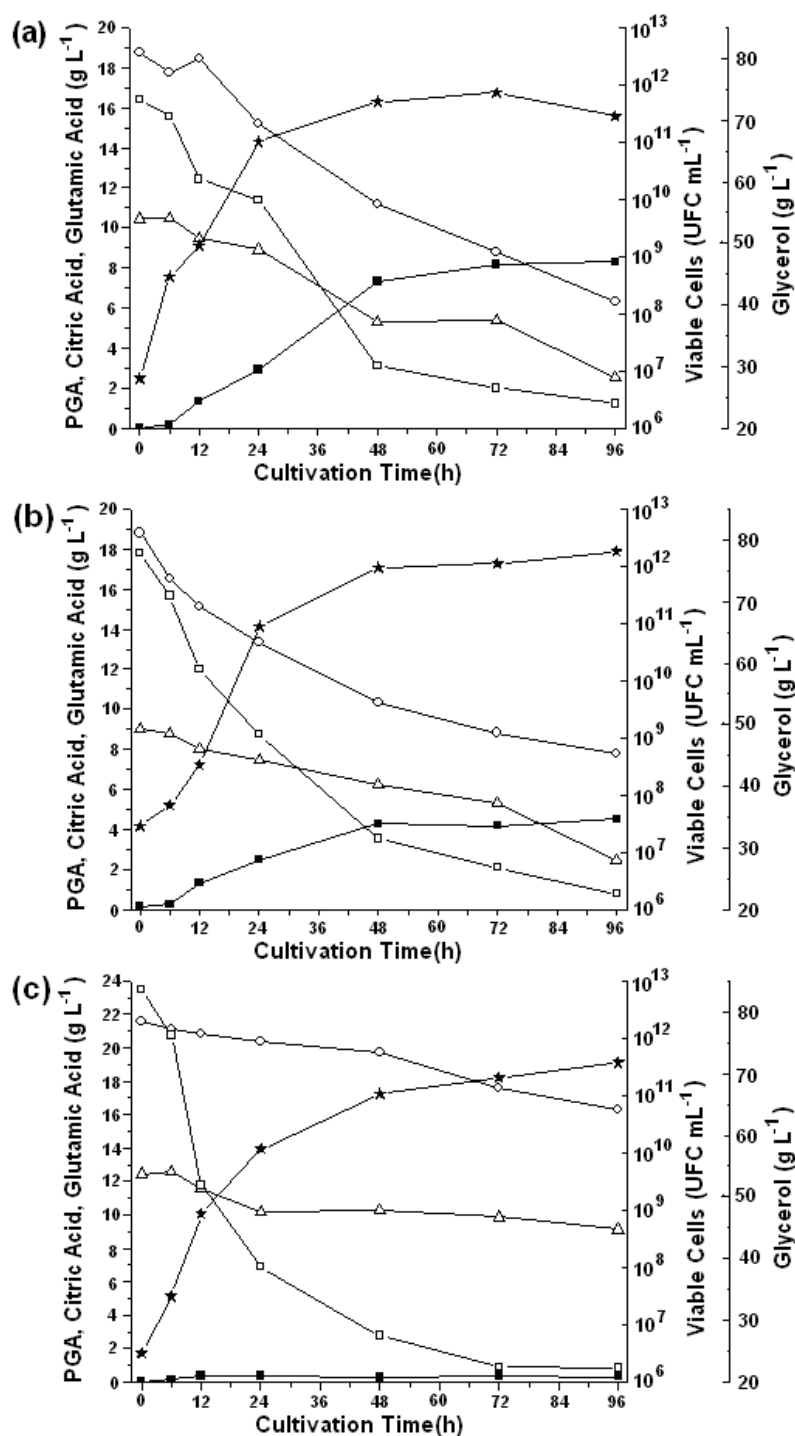


Figure 16: Kinetics of γ -PGA production by *Bacillus subtilis* BL53 carried out in rotatory shaker at 37 °C and 180 rpm, using cultivation medium E and different inocula media: (a) LB, (b) E, and (c) LBGlu. γ -PGA (■), number of viable cells (★), L-glutamic acid (○), citric acid (Δ), and glycerol (□). Results are the mean of duplicate runs.

3.2. Effects of media composition on the γ -PGA production

Figure 2 shows the kinetics of the cultivations in the three different cultivation media: LBGlu, E(-glu), and E(+prec). When LBGlu was used as cultivation medium, γ -PGA has not been produced and only a low quantity of glutamic acid was consumed (Figure 2a). Data obtained suggests that the main components of LBGlu are used by the cells to produce biomass. The absence of readily assimilable carbon or metabolic pathway intermediate sources not enable the γ -PGA production (SHIH; XU; CHEN, 2006). The complete metabolic pathway for endogenous glutamic acid synthesis and all the enzymes involved was well described by Shih and Van (2001). In short, glucose is converted to acetyl-CoA through glycolysis, entering in the TCA cycle and producing endogenous glutamic acid from citric acid and α -ketoglutaric acid. The pyruvate dehydrogenase (PDH) connects the glycolysis to the TCA cycle and glutamate dehydrogenase (GDH) converts α -ketoglutarate (arising from citrate) into glutamic acid. Both enzymes are stimulated by the presence of citric acid in the medium (ZHANG et al., 2012a).

Medium E(-glu) was tested to evaluate the dependence of exogenous glutamic acid on γ -PGA production by *B. subtilis* BL53, and data are shown in Figure 2b. With this medium, the γ -PGA production was insignificant compared to the medium comprising glutamic acid (Figure 1a). Glutamic acid-dependent strains cannot produce γ -PGA in the absence of glutamic acid, although the amino acid is not always consumed in large quantities. Glutamic acid units forming γ -PGA are mainly produced from citric acid through the TCA cycle and the glutamic acid added to the medium acts often just an activator for enzymes in the pathway of the biopolymer synthesis (ZHANG et al., 2012a; GOTO; KUNIOKA, 1992; JUNG et al., 2005; WU et al., 2008; GOTO; KUNIOKA, 1994). According to Zhang et al (2012a), α -ketoglutaric acid catalyzed by 2-oxoglutarate dehydrogenase complex can be deviate the carbon flux, producing energy and biomass. The consumption of glycerol and the higher biomass production (comparing with Figure 1a) suggest that the carbon flux are been deviated, reflecting the decreasing in γ -PGA production, and indicate that *B. subtilis* BL53 is a glutamic acid-dependent strain.

In order to evaluate the effect of metabolic pathway precursors of γ -PGA synthesis by *B. subtilis* BL53 in the biopolymer production, results obtained from medium E (Figure 1a) were used to compare with results from medium E(+prec) (Figure 2c). It can be observed that glutamic acid and citric acid were consumed faster when metabolic pathway precursors (L-glutamine and α -ketoglutaric acid) were added, otherwise glycerol was less

consumed. The cell growth was lower but γ -PGA production was about 20% higher. α -ketoglutaric acid can be converted to endogenous glutamic acid through two different pathways, well described to Bajaj and Singhal (2009). Glutamate can be formed from α -ketoglutaric acid and ammonium sulfate via GDH pathway or from α -ketoglutaric acid and glutamine by glutamine-2-oxoglutarate aminotransferase (GOGAT) catalysis. GDH and GOGAT are stimulated by L-glutamine and α -ketoglutaric acid presence in the cultivation medium, and glutamine may be regenerated from glutamate and ammonium sulfate by glutamine synthetase (GS) (SHIH; VAN, 2001; BAJAJ; SINGHAL, 2009).

The improvement of the γ -PGA production through addition of TCA cycle precursors has already been reported for other *Bacilli* strains. Kunioka (1995) had observed higher yield of γ -PGA without any by-products by *B. subtilis* IFO3335 when L-glutamine was used instead of glutamic acid. Bajaj and Singhal (2009) observed that the combined addition of L-glutamine (0.5 mM) and α -ketoglutaric acid (10 mM) enhanced γ -PGA production, in relation to the medium in the absence of these precursors.

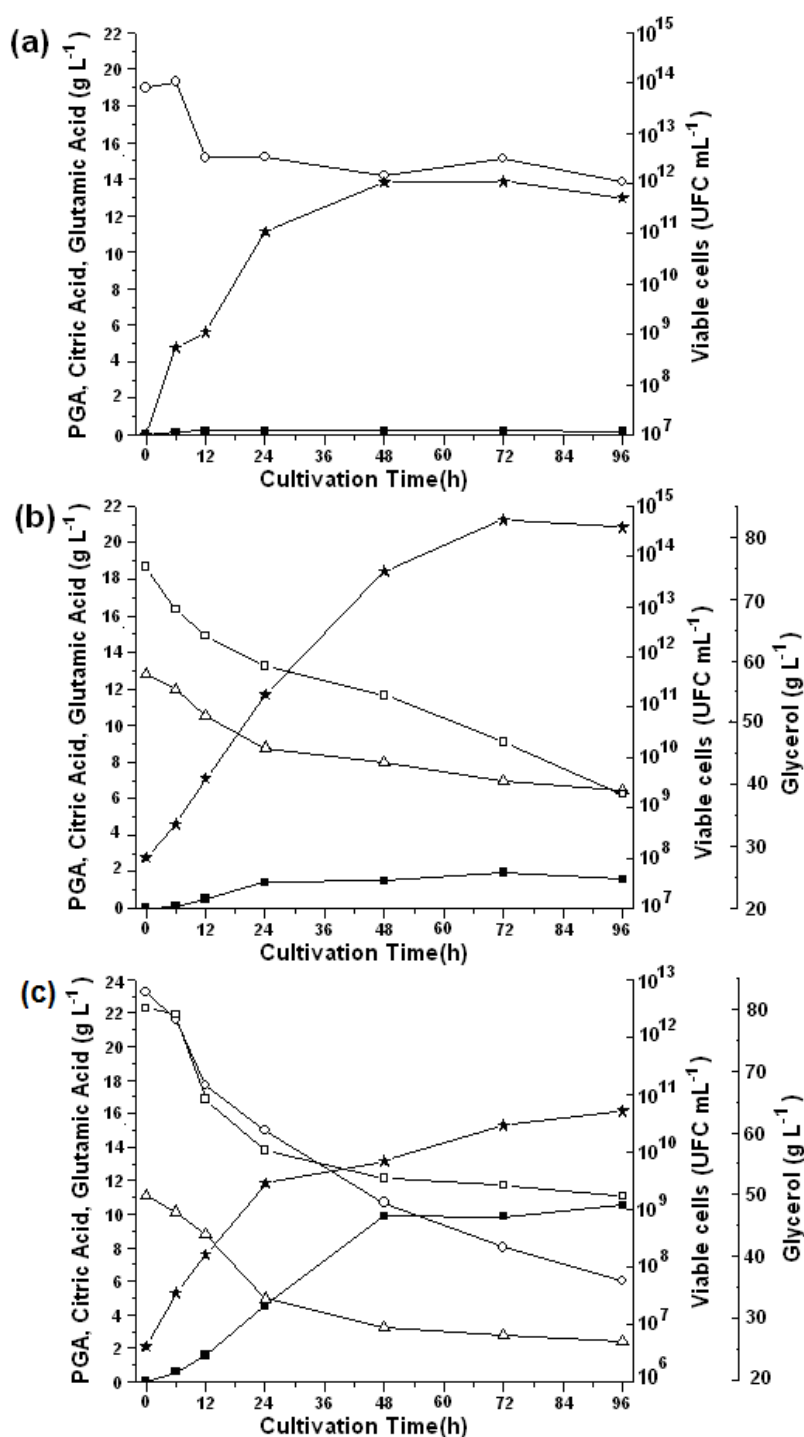


Figure 2: Kinetics of γ -PGA production by *B. subtilis* BL53 carried out in rotatory shaker at 37 °C and 180 rpm, using *LB* as pre-inoculum and (a) LBGLu, (b) E(-glu) and (c) E(+pec) as production medium. γ -PGA yield (■), number of viable cells (★), L-glutamic acid (○), citric acid (Δ), and glycerol (□). Results are the mean of duplicates runs.

3.3. Effects of the addition of oxygen carrier on the γ -PGA production in bioreactors

The best culture media for γ -PGA production (medium E and medium E(+prec)) were tested with the addition of PDMS as an oxygen carrier in bioreactor, in order to observe the effects of this chemical on γ -PGA production and on the oxygen mass transfer coefficient (k_{La}) of the system. Results are depicted in Figure 3, clearly showing the enhanced production of γ -PGA in both culture media in the presence of PDMS. For medium E, PDMS also had a marked effect on productivity, reducing the total time of production from 48 to 36 h. Medium E without PDMS showed γ -PGA maximum yield of 14.8 g L^{-1} and $0.30 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ of productivity, compared to yields of 17.2 g L^{-1} and productivity of $0.48 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ when the oxygen carrier was present. Medium E(+prec) presented a maximum yield of 19.7 g L^{-1} and $0.82 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ of productivity in the absence of PDMS and 23.5 g L^{-1} and $0.98 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ in the presence of the oxygen carrier.

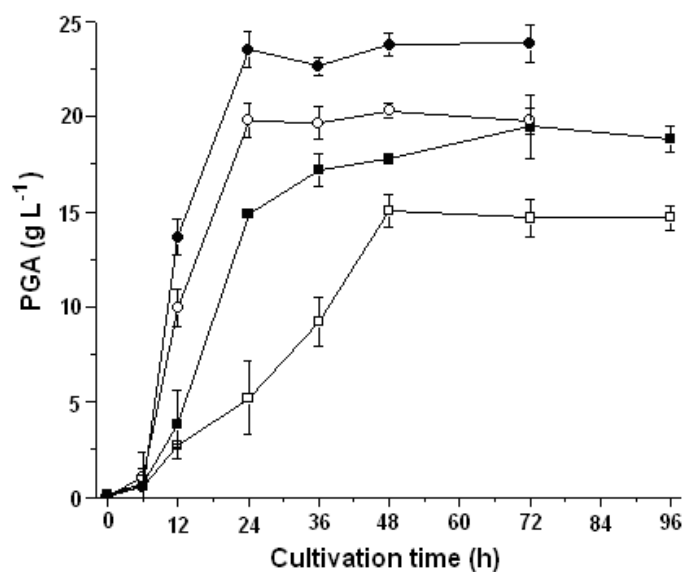


Figure 3: γ -PGA production using different media: (\square) medium E; (\blacksquare) medium E added of PDMS; (\circ) medium E(+prec); (\bullet) medium E(+prec) added of PDMS. Plotted results are the mean of duplicate runs.

In aerobic cultivations two main resistances may control the overall mass rate of oxygen: the transfer resistance from the gas to the liquid phase, and the biochemical reaction in the cell. When the biochemical reaction occurs faster than the physical mass transfer, oxygen availability to the cell will be controlled by the mass transfer rate of the

system, consequently limiting cell metabolism (BANDAIPHET; PRASERTSAN, 2006). Therefore, oxygen transfer rate is vitally important, particularly in the production of highly viscous biopolymers, such as γ -PGA, where the viscosity of the culture broth increases with biopolymer concentration, resulting in oxygen limitations (RICHARD; MARGARITIS, 2003).

Table 1 shows the volumetric mass transfer coefficient (k_{La}) for media E and E(+prec) with and without the additions of PDMS, measured at the physiological state of mid-exponential growth phases. Although there was an increase in the k_{La} of E(+prec) in relation to E, probably as a consequence of enhanced metabolism of cells, the results clearly show that the addition of PDMS greatly enhanced k_{La} of cultures, possibly explaining the higher γ -PGA productions shown in Figure 3. Moreover, k_{La} decreased over time when PDMS was not added due to the increase of medium viscosity, effect that was not observed when the oxygen carrier was added (results not shown).

Table 1: Volumetric oxygen transfer coefficient (k_{La}) for *Bacillus subtilis* BL53 cultures performed at 2 vvm, and 1 000 rpm as function of PDMS addition (10 % volume fraction) measured at mid-exponential growth phase. Results are the mean of duplicate runs.

Medium	k_{La} (h^{-1})	
	Mid-exponential growth phase	Increase percentage*
E	33.0 (\pm 2.3)	
E + PDMS	205 (\pm 2)	521 %
E + Prec	61.4 (\pm 3.1)	
E + Prec + PDMS	222 (\pm 2)	262 %

*In relation to the same medium, without the addition of PDMS

This work is the first report on the literature on the use of PDMS in *B. subtilis* cultures in order to enhance γ -PGA production. Dey, Norrolöv and Liu (2004) tested the addition of PDMS in cultures of *B. thuringiensis* A3 for biomass formation and reported an increasing of about 50 % in biomass production. Zhang et al. (2012b) observed that the addition of n-hexane, n-heptane or n-hexadecane increased γ -PGA concentration and its molecular weight. Rech, Volpato and Ayub (2012) studied the effects of the addition of emulsified PMDS on k_{La} of submerged cultures of *Staphylococcus warneri* EX17 for lipase production. The addition of about 13 % of PDMS improved the lipase production by 300 % and culture k_{La} was approximately 4 higher than in medium without the oxygen carrier.

PDMS, being immiscible with water, will form droplets into culture, originating a liquid biphasic system, dynamically interacting at the liquid boundary layer around the gas

bubbles (provided by air supply and agitation), increasing the turbulence or mixing in this layer (RECH; VOLPATO; AYUB, 2012). The resistance in the liquid layer and the gas bubble is decreased, greatly enhancing the transference from the gas phase to the liquid phase. Moreover, since the oxygen solubility in oxygen carriers such as PDMS are higher than in water, oxygen permeability within the biphasic liquid boundary layer is also enhanced. (RECH; VOLPATO; AYUB, 2012). According to Zhang et al. (2012b), oxygen carriers can also stimulate the aerobic respiratory pathways in *B. subtilis* NX-2 to regulate the NADH/NAD⁺ ratio and the ATP concentration. Oxygen carriers may also influence related enzymes such as PGA synthetase, responsible for the molecule polymerization. Cofactors such as NADH and NAD⁺ have major roles in microbial catabolism. The cofactor pair NADH/NAD⁺ is crucial for cell growth, during which NADH is oxidized to NAD⁺ and a redox balance is achieved (ZHANG et al., 2012b).

4. Conclusions

B. subtilis BL53 is a good γ -PGA producer, showing to be an exogenous glutamic acid dependent strain. Medium E added of metabolic pathway precursors glutamine and α -ketolglutaric acid proved to be the best culture medium to enhance γ -PGA production by *B. subtilis* BL53, stimulating enzymes involved in the biopolymer synthesis system. However, best results are achieved only when the traditional bacterial medium LB is used as pre-inoculum. PDMS, added as oxygen carrier, enhanced mass transport in the medium, increasing k_{La} by 521 % for medium E and 262 % to E(+prec), improving γ -PGA production and productivity. The results presented in this work could be a promising technology for γ -PGA production by new bacteria strains.

5. References

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. Technical committee on microbiological methods for food. In: VANDERZANT, C.; SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4 ed. Washington: American Public Health Association, 2001.
- BAJAJ, I; SINGHAL, R. Enhanced Production of Poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by Using Metabolic Precursors. **ApplBiochemBiotechnol**, v. 159, p. 133–141, 2009.

BAJAJ, I; SINGHAL, R. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5551–5561, 2011.

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.

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.

CANDELA, T; FOUET, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, p. 1091-1098, 2006.

DEY, E.S; NORRLÖW, O; LIU, Y. Artificial carrier for oxygen supply in biological systems. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 64, p. 187–191, 2004.

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

GOTO, A; KUNIOKA, M. Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v. 56, p. 1031–1035, 1992.

GRAIVER, D; FARMINER, K. W; NARAYAN, R. A Review of the Fate and Effects of Silicones in the Environment. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 11, p. 129-136, 2003.

JUNG, D.Y; JUNG, S; YUN, J.S; KIM, J.N; WEE, Y.J; JANG, H.G; RYU, H.W. Influences of cultural medium component on the production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus sp.* RKY3. **Biotechnol. Bioprocess. Eng**, v. 10, p. 289–295, 2005.

KAMBOUROVA, M; TANGNEY, M; PRIEST, F. G. Regulation of Polyglutamic Acid Synthesis by Glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 2, p. 1004-1007, 2001.

KANNO, A.; TAKAMATSU, H. Determination of polyglutamic acid in "Natto" using cetyltrimethylammonium bromide (Studies on "Natto" part V). **NipponShokuhin Kagaku KogakuKaishi**, v. 42, p. 878–886, 1995.

KUNIOKA, M. Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid) from L-glutamine, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 44, p. 501-505, 1995.

KUNIOKA, M. Biosynthesis and chemical reactions of poly (amino acid)s from microorganisms. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 47, p. 469–475, 1997.

KUNIOKA, M; GOTO, A. Biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 40, p. 867-872, 1994.

LEONARD, C. G; HOUSEWRIGHT, R. D; THORNE, C. B. Effects of Some Metal Ions on Glutamyl Polypeptide Synthesis by *Bacillus Subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 76, n. 5, p. 499-503, 1958.

LI, C., YU, D.F., NEWMAN, A., CABRAL, F., STEPHENS, C., HUNTER, N., MILAS, L., WALLACE, S. Complete regression of well-established tumors using novel water soluble poly (γ -glutamic acid)–paclitaxel conjugate. *Cancer Res.*, v. 58, p. 2404–2409, 1998.

PLEISSNER, D; WIMMER, R; ERIKSEN, N, T. Quantification of Amino Acids in Fermentation Media by Isocratic HPLC Analysis of Their α -Hydroxy Acid Derivatives. **Anal. Chem**, v. 83, p. 175–181, 2011.

RECH, F. R; VOLPATO, G; AYUB, M. A. Z. The effects of emulsified polydimethylsiloxane FG-10 on the oxygen transfer coefficient (k_La) and lipase production by *Staphylococcus warneri* EX17. **J. Chem. Technol. Biotechnol**, v.87, p. 990–995, 2012.

RICHARD, A; MARGARITIS, A. Rheology, Oxygen Transfer, and Molecular Weight Characteristics of Polyglutamic acid Fermentation by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 82, n. 3, p. 299-305, 2003.

SHIH, F; XU, Z.N; CHEN, P.L. Optimization of γ -polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis* ZJU-7 using a surface response methodology. **Biotechnol. Bioprocess. Eng.**, v. 11, p. 251–257, 2006.

SHIH, I.L; VAN, Y.T. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. **Bioresour. Technol.**, v. 79, 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, p. 213–220, 2002.

SILVA, S. B. **Produção e otimização do processo de obtenção de ácido γ -poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53**. Tese de doutorado – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

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.

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.

WU, Q; XU, H; SHI, N.N; YAO, J; LI, S; OUYANG, P. Improvement of poly(γ -glutamic acid) biosynthesis and redistribution of metabolic flux with the presence of different additives in *Bacillus subtilis* CGMCC 0833. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 79, p. 527–535, 2008.

ZHANG, H; ZHU, J; ZHU, X; CAI, X; ZHANG, A; HONG, Y; HUANG, J; HUANG, L; XU, Z. High-level exogenous glutamic acid-independent production of poly-(γ -glutamic acid) with organic acid addition in a new isolated *Bacillus subtilis* C10. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 241–246, 2012a.

ZHANG, D; FENG, X; LI, S; CHEN, F; XU, H. Effects of oxygen vectors on the synthesis and molecular weight of poly(γ -glutamic acid) and the metabolic characterization of *Bacillus subtilis* NX-2. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2103–2109, 2012b.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, o ácido- γ -poliglutâmico, produzido por *B. subtilis* BL53, foi caracterizado quanto a sua massa molar, seu comportamento reológico e suas temperaturas de fusão e decomposição. A caracterização foi realizada em dois diferentes tempos de cultivo: 48 e 96 horas. Possíveis aplicações do biopolímero foram sugeridas, conforme as características encontradas. Além da caracterização, estudou-se o melhor meio de inóculo e a adição de precursors da rota metabólica para obtenção de γ -PGA, através do cultivo da mesma cepa, em agitador orbital. As melhores condições obtidas nesses experimentos foram conduzidas em biorreatores, para avaliação do efeito da adição de polidimetilsiloxano (PDMS), um silicone utilizado como carreador de oxigênio.

De acordo com os resultados obtidos no primeiro artigo, intitulado “Molecular mass, rheological and thermal analysis of γ -PGA by *Bacillus subtilis* BL53 and potential applications”, a massa molar ponderal média, determinada através de espalhamento de luz estático, não apresentou diferenças significativas entre os biopolímeros produzidos em 48 e 96 horas, sendo $1,47 (\pm 0,30) \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$ e $1,49 (\pm 0,23) \times 10^6 \text{ g mol}^{-1}$, para as amostras de 48 e 96 horas de cultivo respectivamente.

A reologia mostrou que as soluções de γ -PGA de concentrações de 10, 15 e 20 g L⁻¹ apresentam um comportamento Newtoniano. Para todas as concentrações estudadas, as amostras de 96 horas de cultivo, apresentaram viscosidade maior quando comparadas às de 48 horas. Esse resultado indica que há uma maior distribuição da massa molar em torno da massa molar média encontrada no espalhamento de luz, para o γ -PGA obtido em cultivos de 96 horas. Provavelmente, frações de massa molar mais elevadas causem esse efeito na viscosidade.

Conforme as análises térmicas, a amostra de 48 horas de cultivo apresenta uma temperatura de fusão dos cristais (T_m) de 134 °C e temperatura de decomposição (T_d) entre 120 e 190 °C. Enquanto que a amostra de 96 horas de cultivo apresentou T_m de 128 °C e T_d entre 120 e 215 °C. Apesar de as T_m das duas amostras serem semelhantes, a entalpia de fusão e a área do pico encontradas para a amostra de 96 horas foram maiores, indicando que o biopolímero produzido nesse tempo de cultivo apresenta maior cristalinidade. A maior cristalinidade pode ser explicada pelas frações de maior massa molar, que apresentam maior capacidade de se organizar, formando os cristais.

De acordo com as características encontradas, o γ -PGA produzido por *B. subtilis* BL53 pode ser usado na indústria de alimentos como ingrediente funcional, espessante e marcador de sabor em bebidas energéticas. Na medicina, o biopolímero pode ser utilizado como agente antitumoral e adesivo biológico. Com o melhoramento de suas características térmicas, através da esterificação de seus grupos carboxílicos, o biopolímero obtido poderia ainda ser utilizado no desenvolvimento de plásticos biodegradáveis.

Os resultados obtidos no primeiro estudo do segundo artigo, intitulado “Bioreactor kinetics and the effects of polydimethylsiloxane (PDMS) on γ -PGA production by *Bacillus subtilis* BL53” mostram que a cepa isolada de ambiente amazônico *B. subtilis* BL53 apresenta um comportamento típico de cepa dependente de ácido glutâmico para a produção de γ -PGA. Além disso, o meio de inóculo que apresentou maior rendimento na produção do biopolímero foi o Caldo Luria Bertani. A adição de precursores da rota metabólica (L-glutamina e ácido α -cetoglutárico) ao Caldo E de Leonard (meio de cultivo) aumentou a produção e produtividade do biopolímero.

A melhor condição obtida nos ensaios em agitador orbital foram conduzidas em biorreator com a adição de PDMS, que aumentou a produção e a produtividade do γ -PGA, bem como o coeficiente de transferência de oxigênio ($K_L a$). O cultivo de *B. subtilis* BL53 em Caldo E, com adição de L-glutamina (0.075 g L^{-1}) e ácido α -cetoglutárico (1.46 g L^{-1}), adicionado de 10 % (fração volumétrica) de PDMS produziu 23.5 g L^{-1} de γ -PGA em 24 h de cultivo, em biorreatores a 1000 rpm de agitação, 2 vvm de aeração e $37 \text{ }^\circ\text{C}$. A adição do silicone mostrou-se inerte frente aos sistemas biológico e enzimático e diminuiu a resistência encontrada na solubilização das bolhas de oxigênio no meio líquido.

O estudo das características e da otimização da produção de γ -PGA é importante devido às diversas aplicações possíveis descritas nesse trabalho. O biopolímero obtido nesse estudo mostrou-se aplicável na indústria de alimentos e na medicina e melhorias na sua estrutura tornam-no um promissor substituto de polímeros derivados do petróleo no desenvolvimento de plásticos. O uso do PDMS como carreador de oxigênio é uma alternativa para o aumento da produção do biopolímero em cultivo submerso.

5. PERSPECTIVAS

Através do trabalho apresentado foi possível determinar características importantes do γ -PGA, produzido em cultivo submerso por *B. subtilis* BL53, sob condições otimizadas. Essas características são fundamentais para futuras aplicações do biopolímero, principalmente em alimentos, embalagens e medicamentos, onde a massa molar, o comportamento reológico e as temperaturas de transição determinarão sua utilização como matéria-prima.

Além da caracterização do biopolímero, este trabalho demonstrou o potencial do uso do PDMS como carreador de oxigênio, influenciando positivamente no K_La , produção e produtividade do cultivo, visando a produção de γ -PGA.

Neste contexto, novas explorações acerca dos resultados obtidos são sugeridas:

- 1) Caracterização do γ -PGA produzido com a adição de PDMS, para verificação da influência do carreador de oxigênio sobre as características do biopolímero.
- 2) Estudo de operações de purificação do γ -PGA tendo em vista as aplicações do biopolímero
- 3) Desenvolvimento de aplicações para o γ -PGA, em especial como ingrediente funcional em alimentos e material para elaboração de biofilmes.
- 4) Estudo da influência da agitação em cultivos com adição de PDMS.
- 5) Estudo da concentração de PDMS para aumento de produção e produtividade do γ -PGA.

6. REFERÊNCIAS

AMARAL, P; ALMEIDA, A. R; PEIXOTO, T; ROCHA-LEÃO, M. M; COUTINHO, J. A. P; COELHO, M. A. Z. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 23, p. 339–344, 2007.

ASHIUCHI, M. Analytical approaches to poly- γ -glutamate: Quantification, molecular size determination, and stereochemistry investigation. **Journal of Chromatography B**, v. 879, p. 3096– 3101, 2011.

ASHIUCHI, M; SHIMANOUCI, K; NAKAMURA, H; KAMEI, T; SODA, K; PARK, C; SUNG, M; MISONO, H. Enzymatic synthesis of high molecular-mass poly-gammaglutamate and regulation of its stereochemistry. **Applied Environment Microbiology**, v. 70, p. 4249–4255, 2004.

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

ASHIUCHI, M; KAMEI, T; BAEK, D . Isolation of *Bacillus subtilis* (chungkookjang), a poly gammaglutamate producer with high genetic competence. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 57, p. 764–769, 2001.

BAJAJ, I; SINGHAL, R. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5551-5561, 2011.

BAJAJ, I; SINGHAL, R. 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, p. 635-640, 2010.

BAJAJ, I; SINGHAL, R. Enhanced Production of Poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by Using Metabolic Precursors. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 159, p. 133–141, 2009.

BARBANTI, S; ZAVAGLIA, C; DUEK, E. Bioresorbable Polymers in Tissue Engineering. **Polymers: Science and Technology**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BEN-ZUR, N; GOLDMAN, D. M. γ -Poly glutamic acid: a novel peptide for skin care. **Cosmetics Toiletries Magazine**, v. 122, n. 4, p. 64–72, 2007.

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.

CANDELA, T; FOUET, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, p. 1091-1098, 2006.

CROMWICK, A. M; BIRRER, G. A; GROSS, R. A. Effects of pH and Aeration on γ - Poly(glutamic acid) Formation by *Bacillus licheniformis* in Controlled Batch Fermentor Cultures. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 50, p. 222-227, 1996.

DEY, E.S; NORRLÖW, O; LIU, Y. Artificial carrier for oxygen supply in biological systems. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 64, p. 187–191, 2004.

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, 2001.

ELIBOL, M. Culture of yeast in a perfluorocarbon/water system. **Biotechnology Techniques**, v. 34, n. 8, p. 593–596, 1997.

ELIBOL, M. Mass transfer characteristics of yeast fermentation broth in the presence of pluronic F-68. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 557–561, 1999.

FDA. **GRAS Notice Inventory**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm235933.htm>>. Acesso em: 24 dez. 2012.

GRAIVER, D; FARMINER, K. W; NARAYAN, R. A Review of the Fate and Effects of Silicones in the Environment. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 11, p. 129-136, 2003.

HEZAYEN, F. F; REHM, B.H; TINDALL, B.J; STEINBUCHER, A; EBERHARDT, R. Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented member of the Archaea from Egypt that produces extracellular poly (glutamic acid). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1133-1142, 2001.

HIEMENZ, P. C. **Polymer Chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1984. 722 p.

HIXSON, A. W; GADEN, E. L. Oxygen transfer in submerged fermentation. **Ind. Eng. Chem.**, v. 42, n. 9, p. 1792–1801, 1995.

HO, G. H; HOC, T. I; HSIEHB, K. H; SUD, Y. C; LINE, P. Y; YANGA, J; YANGA, K, H; YANGA, S. C. Gamma-Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural Characteristics, Chemical Properties and Biological Functionalities. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 53, p. 1363-1384, 2006.

IRURZUN, I; BOU, J. J; CAMERO, G. P; ABAD, C; CAMPOS, A; GUERRA, S. M. Mark-Houwink Parameters of Biosynthetic Poly(gamma-glutamic acid) in Aqueous Solution. **Macromol. Chem. Phys**, v. 202, p. 3253-3256, 2001.

KHACHATOORIAN, R; PETRISOR, I. G; YEN, T. F. Prediction of plugging effect of biopolymers using their glass transition temperatures. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 41, p. 243– 251, 2004.

KIMURA, K; TRAN, L. P. S; UCHIDA, I. Characterization of *Bacillus subtilis* gamma-glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly-gamma-glutamate. **Microbiology-SGM**, v. 150, p. 4115-4123, 2004.

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

KOCIANOVA, S; VUONG, C; YAO, Y; VOYICH, J. M; FISCHER, E. R; DELEO, F. R; OTTO, M. Key role of poly- γ -DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 115, n. 3, p. 688-694, 2005.

KREJTSCHI, C; HAUSER, K. Stability and folding dynamics of polyglutamic acid. **Journal of European Biophysics**, v. 40, p. 673–685, 2011.

KUNIOKA, M. Biosynthesis and chemical reactions of poly(amino acid)s from microorganisms. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 47, p. 469-475, 1997.

LIM, SM; KIM, J; SHIM, JY; IMM, BY; SUNG, MH; IMM, JY. Effect of Poly-gamma-glutamic Acids (PGA) on Oil Uptake and Sensory Quality in Doughnuts. **Food Science and Biotechnology**, v. 21, p. 247-252. 2012.

LIU, L; DU, G; CHEN, J; WANG, M; SUN, J. Comparative study on the influence of dissolved oxygen control approaches on the microbial hyaluronic acid production of *Streptococcus zooepidemicus*. **Bioprocess Biosyst Eng**, v. 32, p. 755–763, 2009.

LU, W. K; CHIU, T. Y; HUNG, S. H; SHIH, I. L; CHANG, Y. N. Use of Response Surface Methodology to Optimize Culture Medium for Production of Poly- γ -glutamic Acid by *Bacillus licheniformis*. **International Journal of Applied Science and Engineering**, v. 2, p. 49-58, 2004.

MITSUIKI, M; MIZUNO, A; TANIMOTO, H; MOTOKI, M. Relationship between the Antifreeze Activities and the Chemical Structures of Oligo- and Poly(glutamic acid)s. **J. Agric. Food Chem**, v. 46, p. 891-895, 1998.

NATTO BIOSCIENCES. **Gamma PGA**: industry applications. Disponível em: <http://www.nattobiosciences.com/gamma_pga.html>. Acesso em: 24 dez. 2012.

NELSON, D.L; COX, M. M. Lehninger principles of biochemistry. In: KENDREW, J. Protein secondary structure. New York: W. M. Freeman and Company, 2005. p. 123.

NIPPON POLY-GLU CO. **NPG Products**. Disponível em: <http://www.polyglu.com/eng/product_information/index.htm>. Acesso em: 24 dez. 2012.

OH, S; JANG, E; SEO, J; RYU, M; LEE, S. Characterization of γ -Polyglutamic Acid Produced from the Solid-state Fermentation of Soybean Milk Cake Using *Bacillus* sp. **Food Sci. Biotechnol**, v. 16, p. 509-514, 2007.

OPPERMANN-SANIO, F. B; STEINBÜCHEL, A. Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. **Naturwissenschaften**, v. 89, p. 11–22, 2002.

PARK, C; CHOI, J; CHOI, Y; NAKAMURA, H; SHIMANOUCI, K; HORIUCHI, T; MISONO, H; SEWAKI, T; SODA, K; ASHIUCHI, M; SUNG, M. 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, (2005).

PILAREK, M; SZEWCZYK, K. W. Effects of perfluorinated oxygen carrier application in yeast, fungi and plant cell suspension cultures. **Biochemical Engineering Journal**, v. 41, p. 38–42, 2008.

RAGHAVARAO, K. S. M. S; RANGANATHAN, T. V; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 127–135, 2005.

RECH, F. R. **Efeito do Uso de Glicerol Residual e Carreadores de Oxigênio Sobre a Produção de Lipases de *Staphylococcus Warneri Ex17***. Dissertação de mestrado - Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

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, 2003.

SAKAI, K; SONODA, C; MURASE, K. Bitterness relieving agent. **Patente WO0021390**. 2000.

SHI, F; XU, Z; CEN, P. Microbial production of natural poly amino acid. **Science in China Press**, v. 50, n. 3, p. 291-303, 2007.

SHIH, I; VAN, Y. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. **Bioresource Technology**, v. 79, p. 207-225, 2001.

SCHMIDELL, W. Engenharia bioquímica. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 541 p. (Biotecnologia industrial, v. 2)

SHYU, YS; SUNG, WC. Improving the Emulsion Stability of Sponge Cake by the Addition of Gamma-Polyglutamic Acid. **Journal of Marine Science and Technology**, v. 18, p. 895-900, 2010.

SILVA, S. B. **Produção e otimização do processo de obtenção de ácido γ -poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53**. Tese de doutorado – Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SINGER, J. W. Paclitaxel poliglumex (XYOTAXk, CT-2103): A macromolecular taxane. **Journal of Controlled Release**, v. 109, p. 120– 126, 2005.

STEFFE, J. F; DAUBERT, C. R. **Bioprocessing Pipelines: Rheology and Analysis**. East Lansing: Freeman Press, 2006. 177p.

SUNG, M. H; PARK, C; KIM, C. J; POO, H; SODA, K; ASHIUCHI, M. Natural and edible biopolymer poly- γ -glutamic acid: synthesis, production, and application. **The Chemical Record**, v. 5, p. 352-366, 2005.

TANIMOTO H; FOX, T; EAGLES, J; SATOH, H; NOZAWA, H; OKIYAMA, A; MORINAGA, Y; FAIRWEATHER-TAIT, SJ. Acute effect of poly-gamma-glutamic acid on calcium absorption in post-menopausal women. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, p. 645-649, 2007.

WU,Q; XU, H; LIANG, J; YAO, J. Contribution of Glycerol on Production of Poly(γ -Glutamic Acid) in *Bacillus subtilis* NX-2. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 160, p. 386–392, 2010a.

WU, Q; XU, H; YING, H; OUYANG, P. Kinetic analysis and pH-shift control strategy for poly(γ -glutamic acid) production with *Bacillus subtilis* CGMCC 0833. **Biochemical Engineering Journal**, v. 50, p. 24–28, 2010b.

XU, Q; YAJIMA, T; LI, W; SAITO, K; OHSHIMA, Y; YOSHIKAI, Y. Levan (b-2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signalling: induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E production. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 94–101, 2006

YAMANAKA, SHIGERU, KIKUCHI, REIKO. New Gamma-Polyglutamic Acid, Production Thereof and Drink Agent Containing the Same. **Patente Japonesa JP1990000074192**, 1991.

YAO, J; JING,J; XU, H; LIANG, J. WU, Q; FENG, X. OUYANG, P. Investigation on enzymatic degradation of γ -polyglutamic acid from *Bacillus subtilis* NX-2. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 56, p. 158-164, 2009.

YOKOIGAWA, K; SATO,M; SODA, K. Simple Improvement in Freeze Tolerance of Bakers' Yeast with Poly- γ -Glutamate. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n. 3, p. 215–219, 2006.

YONG, X; RAZA, W; YU, G; RAN, W; SHEN, Q; YANG, X. Optimization of the production of poly-c-glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* C1 in solid-state fermentation using dairy manure compost and monosodium glutamate production residues as basic substrates. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 7548–7554, 2011.

YOON, S. H; DO, J. H; LEE, S. Y; CHANG, H. N. Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 585-588, 2000.

ZHANG, D; FENG, X; LI, S; CHEN, F; XU, H. Effects of oxygen vectors on the synthesis and molecular weight of poly(γ -glutamic acid) and the metabolic characterization of *Bacillus subtilis* NX-2. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 2103–2109, 2012.

ZARRABAL, O; HIPÓLITO, C; DERMITZ, D; JONES, P; USCANGA, M. G; Bujang, K. Treatment of vinasse from tequila production using polyglutamic acid. **Journal of Environmental Management**, v. 95, p. S66-S70, 2012.