



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FLÁVIA OLIVEIRA DE ARAÚJO

**INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO
NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO POLI- γ -GLUTÂMICO POR
Bacillus subtilis ATCC 6633**

Londrina
2008

FLÁVIA OLIVEIRA DE ARAÚJO

**INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO
NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO POLI- γ -GLUTÂMICO POR
Bacillus subtilis ATCC 6633**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi

Co-Orientadora:
Prof^a. Dr^a. Lucia Helena Mendonça Vargas

Londrina
2008

FLÁVIA OLIVEIRA DE ARAÚJO

**INFLUÊNCIA DAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO NA
PRODUÇÃO DE ÁCIDO POLI- γ -GLUTÂMICO POR *Bacillus subtilis*
ATCC 6633**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Maria Antonia Pedrine Colabone
Celligoi
UEL – Londrina - PR

Prof.^a. Dr.^a. Mara Lucia Luiz Ribeiro
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. João Batista Buzzato
UEL – Londrina - PR

Londrina, 7 de agosto de 2008.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me capacita e me fortalece a cada instante, ao meu esposo Alexandre pelo seu enorme amor, força e compreensão e aos meus filhos que me impulsionam a buscar o sucesso profissional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, ele me conduz, abre meus caminhos, e com sua graça está presente em minhas atividades diárias para o alcance dos meus objetivos.

À professora Maria Antonia por aceitar me orientar apesar de todas as minhas dificuldades e também pelo seu incentivo, apoio e muita paciência.

Ao professor Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Silva por dedicar parte do seu tempo com seus ensinamentos e orientações essenciais para o desenvolvimento do trabalho, e juntamente com o professor Dionísio Borsato por propiciar a utilização do programa Statistic versão 7.0.

À professora Lúcia Helena, orientadora durante a especialização em Bioquímica Aplicada, que propôs o tema sobre o Estudo da Produção de Ácido Poli- γ -Glutâmico por *Bacillus subtilis* e *licheniformis* e suas Aplicações, iniciando o interesse em desenvolver esse assunto como objetivo da dissertação e agradeço também pelo seu apoio.

À professora Suzana Mali e ao professor Fábio Yamashita pelas orientações, que foram essenciais para finalização do trabalho.

Ao Nelson Janeiro pela sua enorme ajuda, paciência, disposição em auxiliar nos preparos dos reagentes, no desenvolvimento das técnicas e tudo mais.

À minha grande amiga Brígida pela imensa ajuda, disponibilidade de tempo e apoio.

Ao auxílio técnico de Jurandir Pinto Pereira.

Ao meu esposo e aos meus filhos, pela compreensão, apoio e entendimento quanto às minhas ausências e falhas como mãe e esposa.

Aos meus pais pelo seu amor e por terem me incentivado e auxiliado nos meus estudos.

Ao Thiago, Agnes e Rebeca pela enorme ajuda durante a realização dos experimentos. Thiago, agradeço também pela sua amizade e dedicação.

Às amigas Siliane, Elaine, Josana, Giovana, Cristiane, Virginia, Michele, Analice e Jakeline pela ajuda nas horas difíceis, cooperação e constante troca de experiências.

Aos meus amigos que torceram para que eu alcançasse este objetivo tão almejado.

*A tecnologia ensinou uma lição à humanidade:
nada é impossível.*

Lewis Mumford

ARAÚJO, Flávia Oliveira. **Influência das diferentes condições de cultivo na produção de ácido poli- γ -glutâmico por *Bacillus subtilis* ATCC 6633**. 2008. 75f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

O *Bacillus subtilis* é um microrganismo que possui a capacidade de biossintetizar o ácido poli- γ -glutâmico (γ -PGA). Este biopolímero é de grande interesse, devido ao potencial de aplicações em vários campos industriais. A fim de melhorar a produtividade do γ -PGA é importante investigar parâmetros físicos e químicos relevantes para produção. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência das diferentes condições de cultivo na produção de ácido poli- γ -glutâmico por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 através da aplicação da metodologia de superfície de resposta. Os experimentos seguiram um delineamento fatorial 2^3 e para otimização da produção de γ -PGA foi aplicado um delineamento central composto rotacional. Os resultados indicaram que a concentração de sacarose, ácido glutâmico e tempo de fermentação foram significativos para biossíntese do γ -PGA e a máxima produção foi de 20,4g/L, quando a concentração de sacarose foi fixada em 132 g/L, ácido glutâmico de 27,6 g/L e o tempo de cultivo em 104 horas. A produtividade referente à máxima produção foi de 0,1962 g/Lh e o ponto central, sacarose 150 g/L; ácido glutâmico 24 g/L e tempo 80h, também se destacou atingindo a produtividade média de 0,1954g/L.h.

Palavras-chave: Ácido poli- γ -glutâmico. *Bacillus subtilis*. Metodologia de superfície de resposta. Fermentação.

ARAÚJO, Flávia Oliveira. **Influence of culture conditions for production of poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* ATCC 6633**. 2008. 75f. Dissertation (Master in Biotechnology) – State University of Londrina.

ABSTRACT

The Bacillus subtilis bacterium is considered a potential candidate for large scale poly γ -glutamic acid production. This biopolymer is interesting because it has a potential variety of applications. The present study assessed, using statistical methodology, the effects of the carbohydrates source and acid glutamic concentration and fermentation time in the production of acid poli γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. The experiments were carried out using a factorial design 2^3 and to optimize of production γ -PGA was applied a central composite rotational design. The results showed that sucrose concentration; acid glutamic present in fermentation and cultivation time were significant for biosynthesis the γ -PGA. The highest γ -PGA contents obtained was 20.4 g/L with productivity rate of 0.1962 g/L at 132 g/L of sucrose and 27.6 g/L acid glutamic in 104 h cultivation.

Keywords: Poly γ -glutamic acid. *Bacillus subtilis*. Response-surface methodology. Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do ácido poli γ -glutâmico: na forma de sal (esquerda) e a forma ácida (direita)	15
Figura 2 – <i>Bacillus subtilis</i> B -1 formando cadeias longas.....	17
Figura 3 – Etapas propostas para a síntese de γ -PGA em <i>Bacillus subtilis</i> IFO 3335.....	23
Figura 4 – Conversão indireta de ácido L-glutâmico para o D-isômero em <i>Bacillus anthracis</i>	24
Figura 5 – Fluxograma do processo de obtenção e quantificação de γ -PGA	38

ANEXO B

Figura 1 - Gráficos de contorno para produção de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633: (A) fixando o tempo no nível codificado 0; (B) fixando o ácido glutâmico no nível codificado 0.....	61
---	----

ANEXO C

Figura 1 – Produção de γ -PGA e relação do consumo de ácido glutâmico para produção referente ao planejamento fatorial 2^3 por <i>Bacillus subtilis</i>	70
Figura 2 - Produção de γ -PGA e relação do consumo de ácido glutâmico para produção referente ao planejamento central composto rotacional 2^3 por <i>Bacillus subtilis</i>	73
Figura 3 – Gráfico de contorno para produtividade de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> ATTCC 6633, fixando o ácido glutâmico no nível codificado 0.	74
Figura 4 – Gráfico de contorno para produtividade de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> ATTCC 6633, fixando o ácido glutâmico no nível codificado 0.	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Massa molecular do ácido poli- γ -glutâmico biossintetizado por subespécies de <i>B. subtilis</i>	17
Tabela 2 - Compostos produzidos por <i>B. subtilis</i> e suas aplicações industriais	18
Tabela 3 – Meios de cultivos utilizados em estudos para obtenção de γ -PGA por diferentes espécies de <i>Bacillus subtilis</i>	20
Tabela 4 – Composição do meio E para produção de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i>	21
Tabela 5 – Produção de γ -PGA de acordo com o tempo de fermentação e o microrganismo envolvido	22
Tabela 6 – Aplicações de ácido poli- γ -glutâmico e seus derivados	27
Tabela 7 – Composição do meio NA	31
Tabela 8 – Composição do meio de inóculo.....	32
Tabela 9 – Meio de fermentação para produção de γ -PGA.....	32
Tabela 10 – Delineamento fatorial completo 2^3 para avaliar o efeito da concentração de sacarose, ácido glutâmico e tempo, com as variáveis codificadas e decodificadas	34
Tabela 11 – Trajetória de máxima inclinação para produção de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	35
Tabela 12 – Delineamento central composto rotacional para otimizar a concentração de sacarose, ácido glutâmico e o tempo de cultivo para produção de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	36
ANEXO B	
Tabela 1 - Delineamento central composto rotacional 2^3 e resultados de produção e produtividade de γ -PGA, biomassa e AGC.	56
Tabela 2 - Estimativa dos efeitos para produção e produtividade de γ -PGA.	60
Tabela 3 - Análise de variância da produção de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	63

ANEXO C

Tabela 1 – Produção e produtividade de γ -PGA, biomassa produzida e açúcar consumido do planejamento fatorial 2^3 por <i>Bacillus subtilis</i>	67
Tabela 2 – Estimativa dos efeitos das variáveis estudadas na produção e produtividade de γ -PGA, biomassa e ATC, obtida pelo planejamento fatorial completo 2^3	68
Tabela 3 – Relação da concentração de ácido glutâmico na produção de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 referente ao planejamento fatorial 2^3	69
Tabela 4 – Produção e produtividade de γ -PGA de <i>Bacillus subtilis</i> obtidos delineamento central composto rotacional 2^3	71
Tabela 5 – Efeito da concentração de ácido glutâmico na produção de γ -PGA por <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 referente ao planejamento composto rotacional	72
Tabela 6 – Estimativa dos efeitos das variáveis estudadas na produção de γ -PGA, produtividade e ATC obtidos pelo planejamento composto rotacional	73

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 ÁCIDO POLI- γ -GLUTÂMICO	14
2.1.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS ESTRUTURAIS.	14
2.2 <i>BACILLUS SUBTILIS</i>	17
2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO POLI- γ -GLUTÂMICO	19
2.4 VIA BIOSINTÉTICA.....	22
2.5 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO	24
2.6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	25
2.6.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	26
2.7 APLICAÇÃO INDUSTRIAL	26
2.8 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 MATERIAL	31
3.1.1 MICRORGANISMO	31
3.1.2 MEIOS DE CULTURA.....	31
3.1.2.1 <i>MEIO DE MANUTENÇÃO</i>	31
3.1.2.2 <i>MEIO PARA OBTENÇÃO DO INÓCULO</i>	32
3.1.2.3 <i>MEIO DE FERMENTAÇÃO</i>	32
3.2 MÉTODOS.....	33
3.2.1 DELINEAMENTO ESTATÍSTICO	33
3.2.1.1 <i>ETAPA 1</i>	33
3.2.1.2 <i>ETAPA 2</i>	34
3.2.1.3 <i>Etapa 3</i>	35
3.2.1.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
3.2.2 PRESERVAÇÃO DO MICRORGANISMO.....	37
3.2.3 INÓCULO	37
3.2.4 PROCESSO FERMENTATIVO	37
3.2.5 DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA.....	39

3.2.6 DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES TOTAIS.....	39
3.2.7 DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO GLUTÂMICO.....	39
3.2.8 PRECIPITAÇÃO DO γ -PGA.....	40
3.2.9 DETERMINAÇÃO DO γ -PGA.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS	48
ANEXO A – Normas de submissão do artigo científico	49
ANEXO B – Artigo - Application of statistical experimental methods to production of poly(γ-glutamic acid) by <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633.....	54
ANEXO C – Resultados complementares	66

1 INTRODUÇÃO

Os biopolímeros são macromoléculas formadas por derivados de ácidos e monossacarídeos com o uso em diferentes segmentos industriais, podendo ser sintetizados por diversos microrganismos.

O ácido poli- γ -glutâmico (γ -PGA) é um biopolímero formado somente de unidades de ácido glutâmico e desperta especial atenção devido as suas multi-funções como espessante, umectante, substituto biodegradável (termoplástico, fibras, filmes e membranas), crioprotetor, agente flocculante, adsorvedor de metal pesado, dispersante, aditivo para alimentação animal e inúmeras outras (SHI; VAN; CHANG, 2002), com aplicação em diversos campos das indústrias de alimentos, cosméticos, medicamentos e também em tratamento de água e agricultura (SHIH; VAN, 2001; CHEN *et al.*, 2005). O intenso desenvolvimento por processos fermentativos, deste polipeptídeo aniônico, versátil e não tóxico para humanos e ao meio ambiente, tem sido impulsionado também pelo seu elevado valor econômico e ambiental (LU *et al.*, 2004).

Diversas espécies bacterianas do gênero *Bacillus* possuem a capacidade de sintetizar o ácido poli- γ -glutâmico, especialmente o *Bacillus subtilis*, que apresenta elevada capacidade de produção durante a fase estacionária do seu crescimento, como componente principal da cápsula celular ou material extracelular (SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004),

Dentre as espécies bacterianas produtoras de ácido poli- γ -glutâmico, algumas requerem a adição de ácido glutâmico para a produção e outras não necessitam deste componente em seu meio de cultivo. Estas informações e diversos outros parâmetros como fonte de carbono, tempo de fermentação, fonte de nitrogênio, influenciam no rendimento deste biopolímero, indicando a relevante importância do seu conhecimento para otimização do processo.

O método de estatística experimental tem sido empregado por vários autores para avaliar a produção do ácido poli- γ -glutâmico (SHIH; VAN; CHANG, 2002; LU *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2005). A biotecnologia tem utilizado com frequência a técnica de superfície de resposta, pela possibilidade de alcançar o máximo dos valores desejados com um número reduzido de ensaios, tempo e reagentes.

Devido à aplicação biotecnológica do ácido poli- γ -glutâmico, a ausência de estudos da sua produção no Brasil, a capacidade metabólica do *B. subtilis* e por ser uma espécie ainda não estudada, o objetivo deste trabalho foi estudar os efeitos das diferentes condições de cultivo na produção de ácido poli- γ -glutâmico por *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ÁCIDO POLI- γ -GLUTÂMICO

O ácido poli- γ -glutâmico (γ -PGA) é um biopolímero produzido por várias espécies de *Bacillus* (CHENG; ASADA; AAIDA, 1989; GOTO; KUNIOKA, 1992; XU *et al.*, 2005; HO *et al.*, 2006). É biodegradável, comestível, não apresenta toxicidade para humanos e ao meio ambiente e possui grande potencial de aplicação em vários campos industriais, tais como alimentos, cosméticos, medicamentos e tratamento de água (GOTO; KUNIOKA, 1992; SHIH; VAN, 2001).

Primeiramente, foi descoberto por Ivánovics *et al.* em 1937, como um componente da cápsula de *Bacillus anthracis* (IVÁNOVICS; BRUCKNER, 1937; IVANOVICS; ERDÖS, 1937 apud KUNIOKA, 1995). Em 1942, Bovarnick mostrou que o γ -PGA foi livremente secretado por *Bacillus subtilis* no meio de cultivo como produto proveniente da fermentação. Posteriormente, foi evidenciado como material extracelular em outras espécies de *Bacillus spp.* incluindo *B. licheniformis*, *megaterium* e *amyloliquefaciens* (SANIO, 2002).

2.1.1 Características Químicas Estruturais

O γ -PGA, nome recomendado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), denominado de poli [imino [1 – (2 – carboxietil) – 2 – oxo – 1,2 – etanodiol]]. É um polipeptídeo aniônico, formado de enantiômeros somente D, somente L ou ambos do ácido glutâmico (ASHIUCHI *et al.*; 2003; CANDELA; FOUET, 2006), ligados entre o grupo α -amino e o γ - da carboxila como se observa na Figura 1 (SUNG *et al.*, 2005).

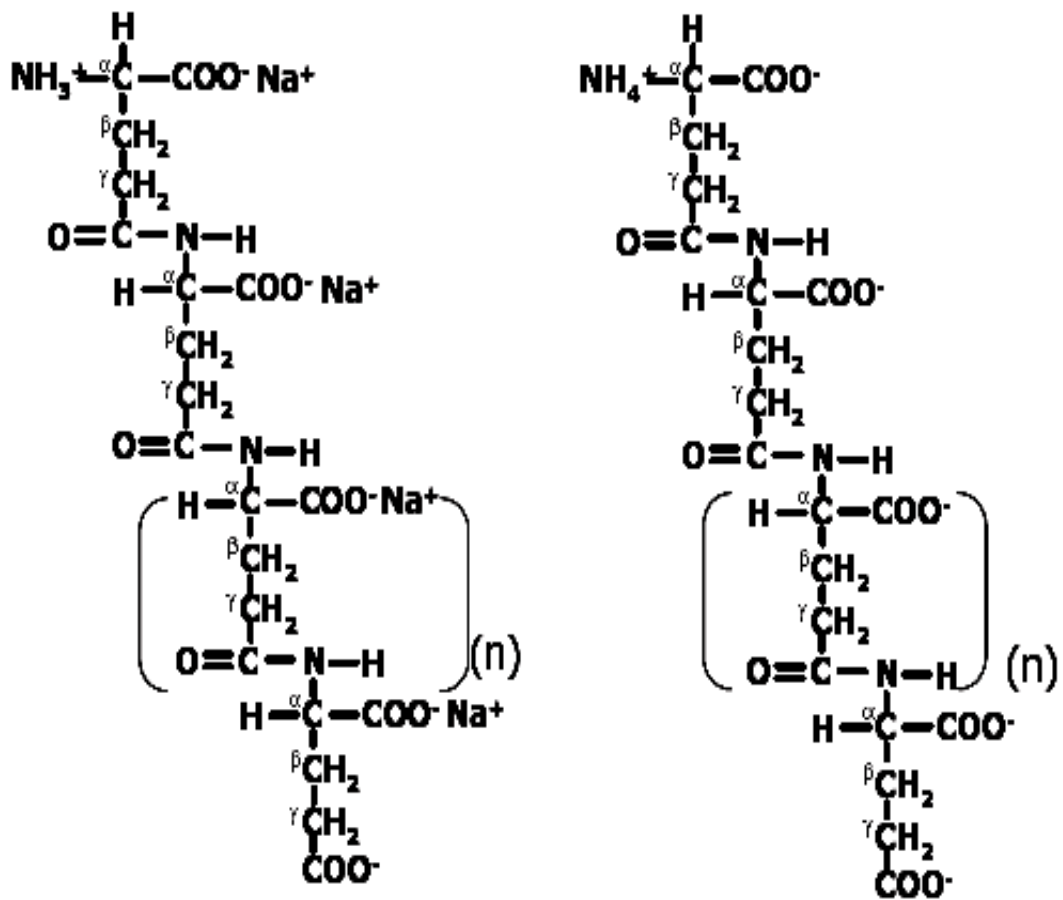


Figura 1 - Estrutura química do ácido poli- γ -glutâmico: na forma de sal (esquerda) e na forma ácida (direita)

Fonte: Sung et al. (2005)

O γ -PGA é opticamente ativo e sua rotação específica depende da proporção dos isômeros D/L (KUBOTA *et al.*, 1992 apud ARPAL, 2004). Possui três grupos funcionais quimicamente ativos: α - NH_2 , α - COOH e γ - COOH . A reatividade química dos três grupos funcionais segue a ordem: α - $\text{NH}_2 > \alpha$ - $\text{COOH} > \gamma$ - COOH . As constantes de dissociação do hidrogênio dos três grupos são: $\text{pK}_\alpha (= \text{pK}_1) = 2,13 \sim 2,2$; $\text{pK}_\gamma (= \text{pK}_2) = 4,25 \sim 4,32$ e $\text{pK}_3 = 9,7 \sim 9,95$ (Ho *et al.*, 2006).

Em processos de fermentação submersa, o ácido L-glutâmico pode ser enzimaticamente racemizado para ácido D-glutâmico, e ambos os ácidos D- e L-glutâmico são copolimerizados através da formação da ligação γ -peptídeos entre os grupos menos reativos γ - COOH e o grupos α - NH_2 , resultando na formação do produto final, ácido poli γ -(D,L)-glutâmico. As ligações γ -peptídeo que compõe o γ -

PGA, podem ser hidrolisadas pela ação de γ -glutamyltranspeptidase (Ho *et al.*, 2006).

Por sua constituição química, o γ -PGA é um polieletrólito de pKa 2,27 (KUBOTA; NAMBU; ENDO, 1993) que se encontra na forma não ionizada como poliácido a pH 1,5, ou totalmente ionizado a pH 5,1 (GONZALES; FAN; SEVOIAN, 1996). Quanto à sua estrutura, o poliácido se encontra na forma de α hélice e seu sal pode ser encontrado na forma de folha β em função do pH e da natureza do solvente (KUBOTA *et al.*, 1992 apud ARPAL, 2004).

A conformação do biopolímero depende da concentração e do pH da solução. Em baixa concentração (0,1% p/v) e quando o pH está abaixo de 7,0, o γ -PGA adota principalmente a conformação em α hélice, enquanto a conformação em folha β predomina em pH mais elevado (CANDELA; FOUET, 2006).

Morillo (2002) afirma que esta homopoliamida de cor branca e elevada higroscopicidade, possui característica de alta solubilidade que está relacionada com o grau de ionização e estrutura secundária deste poliácido. Alguns autores têm relacionado a sua solubilidade com sua estereoquímica, sugerindo que esta aumenta quando se trata de homopolímeros puros (KUBOTA *et al.*, 1992 apud ARPAL, 2004).

O γ -PGA é solúvel em solventes orgânicos como em dimetilsufóxido (DMSO) e hexametenfosforamida (HMPA) a frio, e em altas temperaturas em N-metilpirrolidona (NMP) e dimetilformamida (DMF) (KUBOTA; NAMBU; ENDO, 1993). Na forma de sal, é solúvel em água, mas insolúvel em metileno e etileno (MORILLO, 2002).

A massa molecular é uma importante característica que contribui para definir as propriedades do polímero. O γ -PGA produzido por *Bacillus* sp., geralmente apresenta alta massa molecular. A Tabela 1 apresenta massa molecular do γ -PGA produzido por algumas subespécies de *B. subtilis*. A massa molecular varia de acordo com o microrganismo produtor, com as condições de fermentação e com o método empregado para sua determinação (TANAKA *et al.*, 1997; CANDELA; FOUET; 2006).

Tabela 1 – Massa molecular do γ -PGA biossintetizado por subespécies de *B. subtilis*

Microrganismo	Massa Molecular (kDa)	Referência
<i>B. subtilis</i> TAM-4	1600	Ito <i>et al.</i> , 1996
<i>B. subtilis</i> (<i>natto</i>)	10 – 1.000	Sung <i>et al.</i> , 2005
<i>B. subtilis</i>	160 – 1500	Candela e Fouet, 2006
<i>B. subtilis</i> (<i>natto</i>)	2000	Ho <i>et al.</i> , 2006

Estudos das diferentes massas moleculares dos polímeros são necessários para estabelecer o seu potencial de aplicação. Assim, a produção de γ -PGA de massa molecular definida é fundamental para o desenvolvimento comercial específico. O γ -PGA de alto peso molecular acima de 2000 kDa, por exemplo, possui efeito imunológico em mamíferos (PARK *et al.*, 2005), já como carreador de droga, diferentes massas moleculares poderão ser necessárias (SHIH; VAN, 2001).

2.2 *Bacillus subtilis*

As bactérias do gênero *Bacillus* possuem a forma de bastonetes, são Gram-positivos, aeróbios formadores de esporos e dispõem-se em cadeias longas (Figura 2). A maioria dos membros desse gênero consiste em microrganismos saprófitas que prevalecem no solo, na água, no ar e na vegetação, como o *B. subtilis* (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

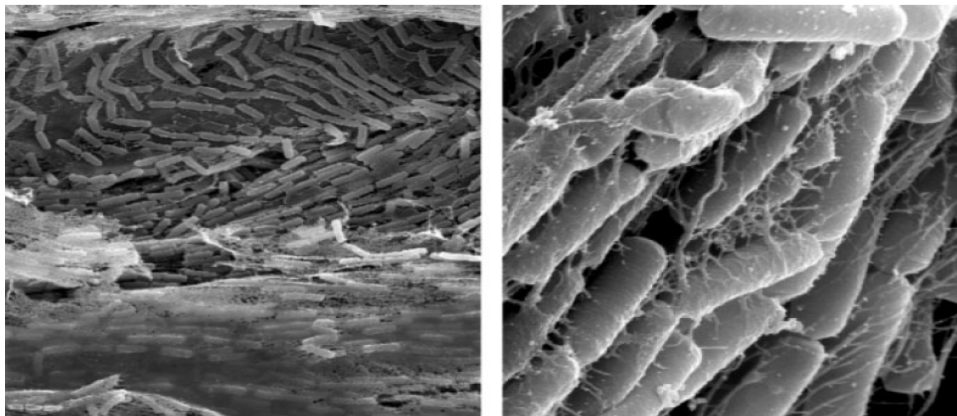


Figura 2 – *Bacillus subtilis* B -1 formando cadeias longas
Fonte: Morikawa et al. (2006)

Os *B. subtilis* são organismos atrativos industrialmente por apresentarem rápido crescimento celular, o que leva à diminuição do tempo de fermentação e capacidade de secretar proteínas e outros produtos no meio extracelular. Compostos sintetizados por *B. subtilis*, com suas respectivas aplicações nos diversos campos industriais, são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Compostos sintetizados por *B. subtilis* e suas aplicações industriais

Produto	Aplicação	Referência
Ácido poli- γ -glutâmico	Usado como espessante, carreador de droga, biofloculante, aditivo para alimentação animal.	Ogawa <i>et al.</i> , 1997; Yoon <i>et al.</i> , 2000; Candela; Fouet, 2006
Nucleotídeos (Purina)	Realçador de sabor em alimentos, medicina.	Shiio, 1989; Saur <i>et al.</i> , 1998
Riboflavina	Vitamina	Perkins <i>et al.</i> , 1999; Stahlman <i>et al.</i> , 2000; Dauner <i>et al.</i> , 2002
D-Ribose	Realçador de sabor em alimentos, enriquecimento de alimentos, indústria farmacêutica e cosmética.	Miyagawa <i>et al.</i> , 1992; De Wulf; Ogawa, 1997
Taumatina	Proteína de sabor doce para aplicação em alimentos e indústria farmacêutica.	Illingworth <i>et al.</i> , 1988
Streptavidina	Proteína biotina-ligante; aplicação em "biochips" de elevada densidade.	Wu; Wong, 2002

Fonte: Schallmeyer; Singh e Ward (2004).

Entre as espécies de *Bacillus* relatadas como produtoras de γ -PGA, o *B. subtilis* é uma bactéria amplamente estudada por ser GRAS (Generally Regarded as Safe) e pela sua elevada capacidade de produção desse biopolímero, que é acumulado durante a fase estacionária do crescimento como componente principal de sua cápsula celular ou material extracelular (OGAWA *et al.*, 1991; PEREZ-CAMERO *et al.*, 1999; YOON *et al.*, 2000; SHIH; VAN, 2001; SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004).

2.3 CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDO POLI- γ -GLUTÂMICO

A biossíntese de γ -PGA depende da linhagem do microrganismo, da composição do meio e das condições de fermentação, obtendo-se deste modo variações no rendimento e qualidade do polímero.

Pesquisas apontam a importância do conhecimento das exigências nutricionais do microrganismo para aumentar a produtividade do ácido poli- γ -glutâmico (CROMWICK; GROSS, 1995; KUNIOKA, 1995; YOON *et al.*, 2000; SHIH; VAN, 2001; XU *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2005), sendo que a necessidade de nutriente varia de acordo com a espécie utilizada.

De acordo com a exigência de nutriente, as bactérias produtoras de γ -PGA se dividem em dois grupos: as que requerem a adição de ácido L-glutâmico para estimular a produção de γ -PGA e o crescimento celular e as que não necessitam desta adição. As bactérias dependentes de ácido L-glutâmico mais estudadas são: *B. subtilis* IFO3335 (GOTO; KUNIOKA, 1992), *B. subtilis* F-2-01 (KUBOTA; NAMBU; ENDO, 1993), *B. subtilis* MR 141 (OGAWA *et al.*, 1997); e dentre as independentes de ácido L-glutâmico destacam-se o *B. subtilis* TAM-4 e *B. subtilis* 5E (SHIH; VAN, 2001).

O efeito do ácido glutâmico é diferente de acordo com as espécies bacterianas ácido dependentes. Pode ser um componente essencial para a biossíntese, como por exemplo, o *B. subtilis* MR 141 (OGAWA *et al.*, 1997) ou como um ativador de enzimas na via da síntese do γ -PGA como um componente regulador, não sendo assimilado pelo microrganismo (KUNIOKA, 1995).

Na Tabela 3 são apresentados meios de cultivos utilizados em estudos com as respectivas fontes de carbono, nitrogênio, sais e íons metálicos para obtenção de ácido poli- γ -glutâmico por diferentes espécies de *Bacillus subtilis*.

Tabela 3 - Meios de cultivos utilizados em estudos para obtenção de γ -PGA por diferentes espécies de *Bacillus subtilis*

Microrganismo	Meio de cultivo	Referência
<i>B. subtilis</i> TAM-4	NH ₄ Cl (1,8%); frutose (7,5%); K ₂ HPO ₄ (0,15%); MgSO ₄ .7H ₂ O (0,035%); MnSO ₄ .5H ₂ O(0,05%); CaCO ₃ (3,0%)	Shih; Van, 2001
<i>B. subtilis</i> C1	ácido glutâmico (65 g/L); ácido cítrico (22 g/L); glicerol (170 g/L); NH ₄ Cl(7,0g/L); MgSO ₄ .7H ₂ O (0,5g/L); FeCl ₃ .6H ₂ O(0,04g/L); K ₂ HPO ₄ (0,5g/L); CaCl ₂ .2H ₂ O(0,15g/L)	Shih; Wu; Shieh, 2004
<i>B. subtilis</i> NX-2	glucose (10,0g/L); extrato de levedura (5,0g/L); ácido L-glutâmico (5,0g/L); K ₂ HPO ₄ (0,5g/L); MgSO ₄ (0,1g/L)	Xu <i>et al.</i> , 2005
<i>B. subtilis</i> (<i>natto</i>)	ácido L-glutâmico (20,0 g/L); ácido cítrico(12,0g/L);glicerol(80,0g/L); NH ₄ Cl(7,0g/L); K ₂ HPO ₄ (0,5g/L); MnSO ₄ H ₂ O(0,104g/L); MgSO ₄ . 7H ₂ O(0,5g/L); FeCl ₃ . 6H ₂ O(0,04g/L); CaCl ₂ . 2H ₂ O (0,15g/L)	Shih; Yu, 2005

O meio E (Tabela 4) tem sido escolhido por muitos pesquisadores em estudos para obtenção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* dependentes de ácido glutâmico (MCLEAN *et al.*, 1990; CROMWICK; GROSS, 1995; PEREZ-CAMERO *et al.*, 1999; YOON *et al.*, 2000; DO; CHANG; LEE, 2001; SHIH, YU, 2005). Entretanto, algumas modificações deste meio são citadas, tais como a alteração das concentrações dos constituintes visando à otimização da produção do γ -PGA (LU *et al.*, 2004; SHIH; WU; SHIEH, 2004; DU *et al.* 2005).

Tabela 4 – Composição do meio E para produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis*

Constituinte	Concentração (g/L)
Ácido L-glutâmico	20,0
Ácido cítrico	12,0
Glicerol	80,0
NH ₄ Cl	7,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,04
K ₂ HPO ₄	0,5
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,15

Fonte: Shih e Yu (2005).

Para as bactérias dependentes do ácido glutâmico, as fontes de carbono mais utilizadas são o ácido cítrico e o glicerol (SHIH; VAN, 2001). Entretanto, Xu *et al.* (2005) investigaram o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de γ -PGA por *B. subtilis* NX-2 em um meio sintético a base de sais, adicionado de ácido L-glutâmico. Foi obtido um alto rendimento do polímero, de aproximadamente 30 g/L no meio suplementado com sacarose ou glicose.

Dentre os parâmetros que influenciam a fermentação, os valores de pH usualmente recomendados para produção de γ -PGA variam de 7,0 a 7,5, a temperatura de 30 a 37 °C (KUBOTA; NAMBU; ENDO, 1993; ITO *et al.*, 1996; SHIH; YU, 2005; XU *et al.*, 2005; HO *et al.*, 2006;) e agitação de 120 a 200 rpm (GOTO; KUNIOKA, 1992; SHIH; WU; SHIEH, 2004; XU *et al.*, 2005; HO *et al.*, 2006).

Estudos apontaram que as diversas espécies de *Bacillus subtilis* podem apresentar comportamentos fisiológicos diferentes em termos de produção do polímero em relação ao tempo de fermentação (Tabela 5). Kunioka (1995), estudando o tempo de fermentação para produção de γ -PGA por *B. subtilis* IFO 3335, evidenciou o aumento da produção e da viscosidade do meio após 40 horas de cultivo. O aumento da viscosidade ocorreu em decorrência do acúmulo do biopolímero, ocasionando a diminuição gradual das células microbianas pelo baixo aporte de oxigênio. Ito *et al.* (1996) constataram que produção de γ -PGA por *B.*

subtilis TAM-4 e a relativa viscosidade do meio alcançaram valores altos somente após 84 horas de incubação.

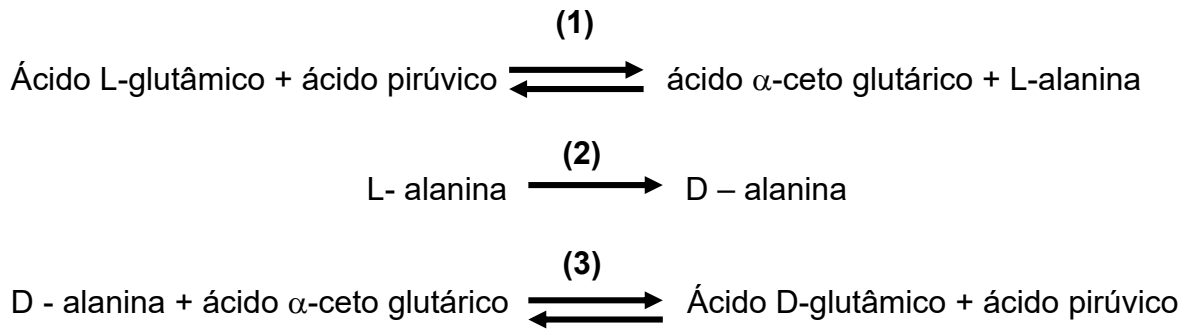
Tabela 5 – Produção de γ -PGA de acordo com o tempo de fermentação e o microrganismo envolvido

Microrganismo	Tempo de fermentação (h)	γ -PGA (g/L)	Referência
<i>B. subtilis</i> NRRL-B2612	72	14	Ward; Anderson; Dean, 1963
<i>B. subtilis</i> F-02-1	72	50	Kubota; Nambu; Endo 1993
<i>B. subtilis</i> IFO 3335	40	9,6	Kunioka, 1995
<i>B. subtilis</i> TAM-4	96	22	Ito <i>et al.</i> , 1996
<i>B. subtilis</i> NX-2	24	30,2	Xu <i>et al.</i> , 2005
<i>B. subtilis</i> C1	144	21,44	Shih; Wu; Shieh, 2004

2.4 VIA BIOSINTÉTICA

O conhecimento da via biossintética e seus mecanismos de controle são importantes para aumentar a eficiência de conversão e produtividade da fermentação, assim como alterar o peso e composição molecular do polímero (PACE, 1991).

O ácido cítrico é o principal substrato precursor para produção do γ -PGA por *B. subtilis* IFO 3335 (CROMWICK; GROSS, 1995; GOTO; KUNIOKA, 1992). A Figura 3 mostra a biossintese do γ -PGA produzido a partir do ácido cítrico e sulfato de amônio a partir do ciclo dos ácidos tricarboxílicos.



(1) Ácido L-glutâmico: ácido pirúvico aminotransferase

(2) Alanina racemase

(3) Ácido D-glutâmico: ácido pirúvico aminotransferase

Figura 4 - Conversão indireta de ácido L-glutâmico para o D-isômero em *Bacillus anthracis*

Fonte: Shih e Van (2001).

Ashiuchi *et al.* (2001), com o objetivo de verificar a natureza da via sintética do D-glutamato em *B. subtilis* (*chungkookjang*), determinou as atividades das enzimas D-amino ácido aminotransferase e glutamato racemase aminotransferase em células antes e durante a produção de γ -PGA. Durante a sua produção, ocorreu uma diminuição significativa da atividade da enzima D-amino ácido aminotransferase de 160 para 3 mU mg⁻¹, enquanto que a atividade da enzima glutamato racemase aumentou de 27 para 36 mU mg⁻¹.

2.5 MÉTODOS DE PURIFICAÇÃO

Uma vez que a produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* é extracelular, o processo de purificação envolve geralmente três etapas: remoção da célula por centrifugação ou filtração; precipitação do meio com etanol, metanol ou 1-propanol e diálise de impurezas de moléculas de baixo peso molecular (SHIH, VAN, 2001).

O método mais utilizado para remoção das células tem sido a centrifugação com velocidades variando desde 8000 x g a 30000 x g (ASHIUCHI *et al.*, 2001; DU *et al.*, 2005; XU, CHEN; ZINIU, 2005; MORIKAWA *et al.*, 2006).

Do, Chang e Lee (2001) afirmaram que a alta estabilidade do γ -PGA presente na parede celular e a alta viscosidade do meio de cultura são os principais problemas para separação deste poliácido, sendo necessário reduzir a sua estabilidade e a viscosidade do meio para obter uma separação eficiente. O método mais utilizado para recuperar o γ -PGA é a precipitação com álcool e a quantidade de solvente necessária para a completa precipitação depende da força iônica e da composição do polímero, resultando na purificação parcial por eliminação dos componentes solúveis no solvente.

2.6 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

O γ -PGA purificado é caracterizado pela análise de aminoácido (GOTO; KUNIOKA, 1992), por cromatografia de camada delgada, análise de próton (H^1) e carbono (C^{13}) no espectrofotômetro infravermelho e cromatografia de permeação em gel (GPC) para análise da massa molecular e da polidispersão (PÉREZ-CAMERO *et al.*, 1999).

O grau de polimerização de γ -PGA pode ser analisado pela técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida utilizando dodecil sulfato de sódio (SDS - PAGE). Kambourova, Tangney e Priest (2001) purificaram o polímero de γ -PGA a partir do sobrenadante por precipitação com etanol e tratamento com a enzima deoxiribonuclease I antes da análise de SDS-PAGE em gel a 10%. As proteínas utilizadas como padrões foram coradas com azul brilhante de comassie e após descoradas com uma solução de ácido acético (7%) e metanol (10%). O gel para identificação do γ -PGA foi corado com azul de metileno a 5% em ácido acético (3%) e descorado com água. Também determinaram a quantidade de γ -PGA produzido por *B. subtilis* e *licheniformis* no sobrenadante do meio de fermentação, o qual foi dialisado e hidrolisado com de ácido clorídrico 6 M a 100°C por 12 horas. O hidrolisado foi neutralizado com de hidróxido de sódio 6M, e a concentração de ácido glutâmico na solução foi determinada pelo método da ninhidrina. O glutamato foi confirmado por cromatografia de camada delgada em placas de sílica gel 60 usando uma solução de *n*-butanol/ ácido acético/água (12:3:5).

2.6.1 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Morikawa *et al.* (2006) analisaram a configuração D-L do ácido glutâmico constituinte do γ -PGA produzido por *B. subtilis* B1, por CLAE de fase reversa. A coluna utilizada foi a COSMOSIL 5C18-AR e o eluente utilizado foi preparado com metanol/tampão acetato de sódio 20mM, pH 4 /acetonitrila (2:7:1). As frações foram lidas em 340 nm e a área dos picos foram comparadas com o padrão de ácido D-glutâmico e ácido L-glutâmico.

A proporção de ácido D- e L- glutâmico que compõe o γ -PGA também pode ser determinada em CLAE utilizando-se a coluna “Crownpak CR (+)” (KUNIOKA, 1995; ITO *et al.*, 1996; SHIH, WU, SHIEH, 2004). Kunioka (1995) determinou a concentração do biopolímero utilizando ácido perclórico (pH 2.0) como eluente utilizando um fluxo de 0,4 mLmin⁻¹ e detector de UV (200nm). Dong e Gant (1985) quantificaram aminoácidos em hidrolisados protéicos pelo método de derivatização pós-coluna por orto-ftaladeído (OPA) e detecção por detector de fluorescência.

2.7 APLICAÇÃO INDUSTRIAL

As propriedades atrativas do γ -PGA impulsionam o interesse industrial, pois além de apresentar muitas aplicações, é também seguro à saúde humana e ao meio ambiente (KUNIOKA, 1995; SHIH, VAN, 2001; SCHALLMEY; SINGH; WARD, 2004). A Tabela 6 apresenta algumas das aplicações de γ -PGA, produzido por várias espécies de *Bacillus*.

Tabela 6 - Aplicações de ácido poli- γ -glutâmico e seus derivados

Campo industrial	Aplicações
Tratamento de água e efluentes	Absorvente de metal pesado; Biofloculantes
Indústria de alimentos	Espessante Crioprotetor Realçador de textura Aditivos para alimentação animal
Medicina	Carreador de drogas; Adesivo biológico
Cosméticos	Umectante
Outros	Dispersante

Fonte: Shih e Van (2001).

O γ -PGA, devido às suas propriedades, tem sido produzido industrialmente e inicialmente foi disponibilizado no comércio da Coréia do Sul e Taiwan, mas este polímero ainda não apresentava características vantajosas para o mercado consumidor como a elevada massa molecular e pureza. Recentemente, a *Natto Biosciences* da América do Norte (2005) desenvolveu um γ -PGA com a massa molecular de 100 a 8000 kDa e 95% de pureza com as seguintes características físico-químicas: *Natto Gum*; γ -PGA Na⁺; *Bio Polyglutamic Acid Solution* e γ -PGA H.

Devido à sua solubilidade em água o γ -PGA é um potencial substituto para os atuais floculantes normalmente encontrados no mercado (poliacrilamida e os ácidos poliacrílicos), que se caracterizam por formarem substâncias tóxicas durante sua degradação em água (DEARFIELD; ABERMATHY, 1988 apud SHIH; VAN, 2001). O γ -PGA produzido por *Bacillus* sp. PY-90 (YOKOI *et al.*, 1995) e *B. subtilis* IFO 3335 (YOKOI *et al.*, 1996) apresentou elevada atividade floculante para compostos inorgânicos (carbono ativo, argila ácida, solo sólido, cálcio e compostos de magnésio etc) e orgânicos (celulose, fermento etc). Este biopolímero com atividade floculante poderá ser aplicado em diversas indústrias, tais como em tratamento de água e durante o processo de recuperação do produto em fermentação industrial e alimentos, por ser seguro a saúde humana e ao meio ambiente (HO *et al.*, 2006).

Devido ao acúmulo de metais pesados e radionuclídeos no meio ambiente, ameaçando a saúde pública, houve um aumento do desenvolvimento de

pesquisas visando a remediação ambiental. Diversos estudos têm sido realizados para investigar as características do metal-ligante por biopolímeros produzidos por microrganismos. Mclean *et al.* (1990); Mclean, Beauchemin e Beveridge (1992), estudaram a afinidade de metal-ligante de γ -PGA produzido por *B. licheniformis* e encontraram uma variação de ligações com metais, incluindo Ni^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Al^{+3} e Cr^{+3} .

O γ -PGA tem aplicação na área médica como carreador de droga e destacando-se o ácido poliglutâmico paclitaxel (PG – TXL). Este é um composto solúvel em água preparado por ligação covalente do nativo paclitaxel, já que a grande dificuldade do uso clínico do paclitaxel, medicamento usado no tratamento do câncer; cujo nome comercial é Taxol®, é devido a sua insolubilidade em água. O PG-TXL também exibe excelente atividade antitumoral, incluindo a indução da regressão completa de tumor de mama e de ovário em ratos (LI *et al.*, 1999). Adesivo biológico, biodegradável e não indutor de respostas inflamatórias, o γ -PGA pode ser um promissor substituto de fibrina, utilizado como um adesivo cirúrgico e agente homeostático (OTANI;TABATA; IKADA , 1998).

O interesse na modificação do γ -PGA tem levado ao desenvolvimento de muitas pesquisas envolvendo várias reações químicas. Ésteres derivados do γ -PGA têm sido investigados por sua capacidade de formar fibras e películas biodegradáveis. Também há estudos indicando que a esterificação deste biopolímero resulta em um excelente termoplástico (KUBOTA; NAMBU; ENDO, 1993). Han e Choi (1999) estudaram a formação do γ -PGA hidrogel preparado por γ -irradiação em solução aquosa de γ -PGA resultando em um produto com elevada capacidade de absorção de água.

2.8 METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

O principal objetivo dos pesquisadores para o planejamento de experimentos é caracterizar a relação entre uma ou mais variáveis resposta e um conjunto de fatores de interesse. Isso pode ser executado através da construção de

um modelo que descreva a variável de resposta em função dos valores aplicáveis desses fatores (KHURI; CORNELL, 1996).

A metodologia de superfície de resposta é um método estatístico que utiliza dados quantitativos de um desenho experimental adequado para determinar e solucionar simultaneamente equações multivariadas, representadas graficamente como superfícies de resposta. Essas equações podem ser usadas para descrever como as variáveis em teste afetam as respostas, determinar as interrelações entre as variáveis em teste e descrever os efeitos combinados de todas as variáveis em teste sobre a resposta (MONTGOMERY, 2001).

A modelagem e o deslocamento são etapas que constituem a metodologia de superfície de resposta, e serão repetidas até o alcance da região ótima. A modelagem normalmente é realizada ajustando-se os modelos lineares e quadráticos a resultados experimentais obtidos a partir de planejamentos fatoriais e o deslocamento segue ao longo do caminho da máxima inclinação de um determinado modelo, que é a trajetória na qual a resposta varia de forma mais pronunciada (NETO; SCARNINIO; BRUNS, 1995).

A maior meta para o estudo das condições de fermentação é identificar os fatores intrínsecos e extrínsecos e os correspondentes níveis para alcançar o ótimo ou resultados próximos aos valores ótimos. A metodologia de superfície de resposta tem sido aplicada para alcançar o valor ótimo em diversos estudos biotecnológicos (LU *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Oliveira *et al.* (2004) avaliaram o efeito da alta concentração de sacarose na produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis* através da metodologia de superfície de resposta, e constataram que o aumento da concentração de sacarose resultou em aumento de produção de sorbitol de 4,979 para 20,633 g/L. Os mesmos autores analisaram estatisticamente a produção de levana pelo mesmo microrganismo usando diferentes fontes de carbono de baixo custo, a sacarose comercial, melão e xarope de cana de açúcar. A aplicação da metodologia de superfície de resposta permitiu definir o xarope de cana de açúcar como a melhor fonte de carbono, para produtividade de biomassa e levana (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A metodologia de superfície de resposta tem sido aplicada para avaliar a produção de γ -PGA por diversos autores visando o estudo dos constituintes

do meio de cultivo e dos demais fatores que influenciam na biossíntese deste biopolímero (SHI; VAN, CHANG, 2002; DU *et al.*, 2005; SHI; WU; SHIEH, 2004; LU *et al.*, 2004; XU, SHOUWEN; ZINIU, 2005).

Shih, Van e Chang (2002) avaliaram o efeito do ácido glutâmico, ácido cítrico e glicerol para produção de γ -PGA por *B. licheniformis* CCRC 12826 e constataram o aumento significativo de 372% quando esta espécie foi cultivada no meio ótimo desenvolvido através da metodologia de superfície de resposta (YOON *et al.*, 2000; DO; CHANG; LEE, 2001; SHIH, YU, 2005).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado nos cultivos foi a bactéria *Bacillus subtilis* ATCC 6633 proveniente da coleção de culturas tropicais da Fundação André Tosello, Campinas - SP.

3.1.2 Meios de Cultura

3.1.2.1 Meio de manutenção AN (Agar Nutriente)

Tabela 7 – Composição do meio AN

Constituintes	Concentração (g/L)
Peptona	5,0
Extrato de carne	3,0
Agar	2,0

3.1.2.2 Meio para obtenção do inóculo (EUZENAT; GUIBERT; COMBES, 1997)

Tabela 8 – Composição do meio de inóculo

Constituintes	Concentração (g/L)
Sacarose	10
Extrato de levedura	2,0
KH ₂ PO ₄	1,0
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,6
MnSO ₄	0,15
Citrato de amônio	0,3

3.1.2.3 Meio de fermentação

Para produção de γ -PGA foi utilizado o meio de fermentação composto com os sais descritos por Shih e Yu (2005) para o meio E, adicionado de sacarose e ácido glutâmico, conforme apresentado na Tabela 9.

Tabela 9 – Meio de fermentação para produção de γ -PGA

Constituintes	Concentração (g/L)
Sacarose	*
Ácido glutâmico	*
NH ₄ Cl	7,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
FeCl ₃ .6H ₂ O	0,04
K ₂ HPO ₄	0,5
CaCl ₂ .7H ₂ O	0,15

*Concentrações de sacarose e ácido glutâmico estão descritas no delineamento experimental (Tabelas 7, 8 e 9).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Delineamento Estatístico

A análise estatística constou de três etapas com objetivo de definir as melhores concentrações de sacarose, ácido glutâmico e tempo de cultivo para produção de γ -PGA por *B. subtilis* ATCC 6633.

3.2.1.1 Etapa 1

As variáveis testadas foram: sacarose (X_1) nas concentrações de 30, 75 e 120 g/L; ácido glutâmico (X_2) a 10, 15 e 20 g/L e o tempo (X_3) em 24, 48 e 72 h, no meio de fermentação descrito no item 3.1.2.3.

Foi realizado um delineamento estatístico fatorial completo com 3 fatores em dois níveis de variação (2^3) e com três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. A matriz de planejamento descrita na Tabela 10, apresenta os ensaios na chamada ordem padrão (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995).

Os limites superior (+1) e inferior (-1) para cada fator e a respectiva amplitude entre os mesmos, foram estabelecidos a partir de dados da literatura (XU *et al.*, 2005; SHI; XU; CEN, 2006).

As respostas (\hat{y}) de interesse foram: biomassa produzida (g/L); produção (g/L) e produtividade (g/Lh) de γ -PGA e açúcar total consumido (%).

Tabela 10 – Delineamento fatorial completo 2^3 para avaliar o efeito da concentração de sacarose, ácido glutâmico e tempo, com as variáveis codificadas e decodificadas

(*) ENSAIOS	VARIÁVEIS CODIFICADAS			VARIÁVEIS DECODIFICADAS		
	X ₁	X ₂	X ₃	Sacarose (g/L)	Ácido glutâmico (g/L)	Tempo (h)
1	-1	-1	-1	30	10	24
2	1	-1	-1	120	10	24
3	-1	-1	1	30	10	72
4	1	-1	1	120	10	72
5	-1	1	-1	30	20	24
6	1	1	-1	120	20	24
7	-1	1	1	30	20	72
8	1	1	1	120	20	72
9	0	0	0	75	15	48
10	0	0	0	75	15	48
11	0	0	0	75	15	48

(*) Os ensaios foram aleatorizados.

3.2.1.2 Etapa 2

Após análise e interpretação estatística dos resultados referentes à Etapa 1, as condições iniciais apresentaram-se distantes da região ótima, assim empregou-se a técnica de “maior atividade” (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995), com o objetivo de definir a faixa de variação, em direção à otimização da produção de γ -PGA (Tabela 11).

Tabela 11 – Trajetória de máxima inclinação para produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* ATCC 6633

VÁRIAVEIS DECODIFICADAS			
Ensaio	Sacarose (g/L)	Ácido Glutâmico (g/L)	Tempo (h)
1	120	20	72
2	150	24,2	81
3	180	28,4	89

3.2.1.3 Etapa 3

Com o objetivo de otimizar a produção de γ -PGA e definir as melhores concentrações de sacarose, ácido glutâmico e tempo de fermentação para produção de γ -PGA, um novo ponto central foi proposto. Utilizou-se um delineamento central composto rotacional com pontos estrelas ($\alpha = \pm 1,68$) e três repetições no ponto central indicadas na Tabela 12 (NETO; SCARMINIO; BRUNS,1995). As respostas (\hat{y}) de interesse foram: biomassa produzida (g/L), produção (g/L) e produtividade (g/Lh) de γ -PGA e consumo de ácido glutâmico (AGC).

Tabela 12 – Delineamento central composto rotacional para otimizar a concentração de sacarose, ácido glutâmico e o tempo de cultivo para produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* ATCC 6633

(*) Ensaio	VARIÁVEIS CODIFICADAS			VARIÁVEIS DECODIFICADAS		
	X1	X2	X3	Sacarose (g/L)	Ácido glutâmico (g/L)	Tempo (h)
1	-1	-1	-1	132	20,4	56
2	1	-1	-1	168	20,4	56
3	-1	1	-1	132	27,6	56
4	1	1	-1	168	27,6	56
5	-1	-1	1	132	20,4	104
6	1	-1	1	168	20,4	104
7	-1	1	1	132	27,6	104
8	1	1	1	168	27,6	104
9	-1,68	0	0	120	24	80
10	1,68	0	0	180	24	80
11	0	-1,68	0	150	18	80
12	0	1,68	0	150	30	80
13	0	0	-1,68	150	24	40
14	0	0	1,68	150	24	120
15	0	0	0	150	24	80
16	0	0	0	150	24	80
17	0	0	0	150	24	80

(*) Os ensaios foram aleatorizados

3.2.1.4 Análise estatística

Os resultados obtidos no delineamento experimental para produção de γ -PGA foram avaliados através da análise de superfície de resposta conduzida pela opção “Experimental Design (DOE)” versão 7.0, incluindo a análise de variância (ANOVA) para determinar: a significância da regressão ao nível de 5%, coeficiente de regressão (R^2) e os coeficientes dos modelos.

3.2.2 Preservação do Microrganismo

A preservação do *Bacillus subtilis* foi realizada no meio descrito no item 3.1.2.1 em tubos, incubados a temperatura de 37°C por 48 horas. As culturas foram renovadas a cada 4 semanas e conservadas em câmara fria a 4°C e a pureza verificada por coloração de Gram.

3.2.3 Inóculo

O inóculo foi obtido através do cultivo da bactéria em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio descrito em 3.1.2.2, mantidos sob agitação de 150 rpm a 37°C por 48 horas. Finalizado o cultivo, o meio foi centrifugado por 15 minutos a 9050 xg a 10°C. A biomassa foi resuspensa assepticamente em solução salina (NaCl 0,9%) e a concentração celular foi calculada por turbidimetria, em comprimento de onda de 400 nm. O inóculo foi padronizado em 0,2 g/L de células para todos os experimentos.

3.2.4 Processo Fermentativo

As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyer de 125 mL contendo 25 mL do meio de fermentação e o pH ajustado entre 7 - 7,5, mantidos sob agitação de 150 rpm, temperatura de 37°C (Figura 5) e variando a concentração de sacarose, ácido glutâmico e tempo de fermentação conforme os delineamentos estatísticos descritos nas Tabelas 10, 11 e 12. Para cada fermentação foram realizadas as análises de biomassa, açúcar consumido, ácido glutâmico e γ -PGA, conforme o fluxograma demonstrado na Figura 5.

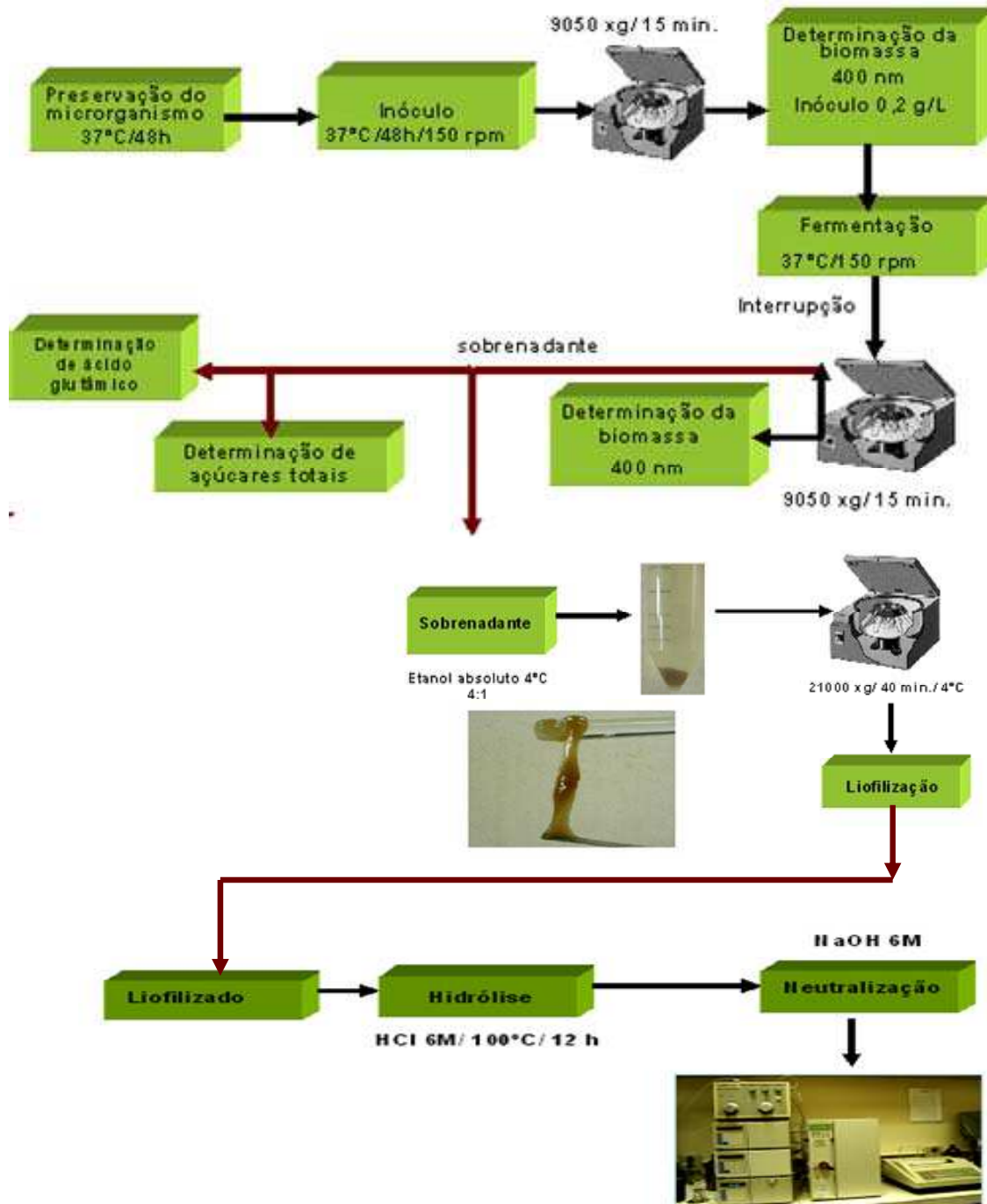


Figura 5 – Fluxograma do processo de obtenção e quantificação de γ -PGA

3.2.5 Determinação da Biomassa

Após as fermentações, os cultivos foram interrompidos por centrifugação durante 15 minutos a 9050 xg a 4 °C e as células obtidas foram ressuspensas em solução salina 0,9%. As absorvâncias foram determinadas a 400 nm e os valores obtidos foram relacionados com o peso seco em g/L da curva padrão de biomassa.

3.2.6 Determinação dos Açúcares Totais (AT)

Os AT dos meios fermentados foram determinados pelo método de Fenol-Sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956). A curva padrão foi confeccionada com glicose P.A. nas concentrações de 0 a 100 µg/mL e as leituras de absorvância foram efetuadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 490 nm.

3.2.7 Determinação do Ácido Glutâmico

A determinação de ácido glutâmico dos meios de cultivo foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo Jarret, Cooksy e Ellis (1986).

Utilizou-se o cromatógrafo Shimadzu modelo LC10AT operando em sistema isocrático, com fluxo de 1 mLmin⁻¹, composto por controlador de sistema, forno de coluna Shimadzu CTO-6 A (temperatura constante a 30°C) e coluna de fase reversa C18 (CLC-ODS (M)).

Uma alíquota de 100 µL de amostra foi submetida à derivatização com 100µL de tampão borato e 200 µL de solução de orto-ftalaldeído (OPA) (50 mg

de OPA, 2,5 mL de 2-mercaptoetanol e 47,5 mL de metanol) injetada após 2,5 min em banho de gelo.

A eluição foi realizada em fase móvel constituída por tampão acetato de sódio/metanol (70:30), utilizando detector de fluorescência operando com excitação em comprimento de onda de 340 nm e emissão em 450 nm.

Para construção da curva de calibração, expressa em $\mu\text{g/mL}$, foi utilizado o padrão de ácido L-glutâmico de 10 mg/mL preparado em HCl 0,1 Mol/mL.

3.2.8 Precipitação DO γ -PGA

Do sobrenadante obtido após as diferentes fermentações, o γ -PGA foi precipitado com etanol absoluto a 4°C na proporção 4:1 (etanol: sobrenadante), deixado em repouso por 12 horas a 4°C. Após a precipitação, o γ -PGA foi obtido por centrifugação a 21.000 xg por 40 minutos a 4°C e liofilizado (LU *et al.*, 2004). A partir da obtenção do material liofilizado foi realizada a quantificação de γ -PGA.

3.2.9 Determinação DO γ -PGA

A quantificação do γ -PGA foi realizada após hidrólise do biopolímero liofilizado com ácido clorídrico 6 M em ampola de vidro a 100°C por 12 horas e neutralização com hidróxido de sódio a 6 M, segundo a metodologia de Kambourova; Tangney e Priest (2001). O material hidrolisado foi submetido à determinação do ácido glutâmico por CLAE (Figura 5) como descrito no item 3.2.7.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão obtidos nesse trabalho são apresentados na forma de artigo, o qual foi elaborado de acordo com as normas do periódico *Process Biochemistry*, que são apresentadas no Anexo A.

O artigo “Aplicação da metodologia de superfície de resposta para o estudo da produção de ácido poli- γ -glutâmico por *Bacillus subtilis* ATCC 6633” está apresentado no Anexo B.

Os resultados complementares desse trabalho estão descritos no Anexo C.

5 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho indicam que a superfície de resposta foi um método efetivo para alcançar a máxima produção de γ -PGA pelo *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Foi visualizado que o microrganismo estudado é um produtor potencial de γ -PGA e dependente de ácido glutâmico.

Os fatores estudados concentração de sacarose; adição de ácido glutâmico e tempo de cultivo foram significativos para a produção de γ -PGA, porém não houve interações entre os mesmos. Para produção de biomassa e para o consumo de ácido glutâmico adicionado as variáveis estudadas não foram significativas.

As regiões de máxima produção e produtividade de γ -PGA foram próximas ao ponto central e a maior produção de γ -PGA foi de 20,4 g/L em 132 g/L de sacarose e com adição de 27,6 g/L de ácido glutâmico. A produtividade referente à máxima de produção foi de 0,1962 g/Lh e os valores médios encontrados no ponto central para produtividade e produção de γ -PGA foram de 0,1954g/Lh e 15,6 g/L, respectivamente.

REFERÊNCIAS

- ARPAL, J.A.A. **Compuestos estequiométricos del ácido poli γ -glutâmico con tensoactivos catiónicos**. 2004. Tese (Doutorado) – Universid Politécnica de Catalunya, Barcelona. Disponível em: <<http://www.biblioteca.upc.es/PFC/arxiu/migrats/34096-1.pdf>>. Acesso em: 12 maio 2005.
- ASHIUCHI, M.; TANI, K.; SODA, K.; MISONO, H. Properties of glutamate racemase from *Bacillus subtilis* IFO 3336 producing poly- γ -glutamate. **J. Biochem.**, v. 123, p. 1156 – 1163, 1998.
- ASHIUCHI, M.; TANI, K.; SODA, K.; MISONO, H. A poly- γ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: gene cloning and biochemical analysis of poly- γ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 263, p. 6-12, 1999.
- ASHIUCHI, M.; KAMEI, T.; BAEK, D. H.; SHIN, S.Y.; SUNG, M.H.; SODA, K.; YAGI, T.; MISONO, H. Isolation of *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*), a poly- γ -glutamate producer with high genetic competence. **Appl. Microbiol Biotechnol.**, v. 57, p. 764-769, 2001.
- ASHIUCHI, M.; NAKAMURA, H.; YAMAMOTO, T.; KAMEI, T.; SODA, K.; PARK, C.; SUNG, M-H.; YAGI, T.; MISONO, H. Poly- γ -glutamate depolymerase of *Bacillus subtilis*: production, simple purification and substrate selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 23, p. 249-255, 2003.
- BOVARNICK, M. The formation of extracellular D (-)glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*. **J. Biol. Chem.**, v. 145, p. 415 – 424, 1942.
- BROOKS, F.G.; BUTEL, J.S.; MORSE, S. A. **Microbiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p.146.
- CANDELA, T.; FOUET, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1091-1098, 2006.
- CHEN, X.; CHEN, S.; SUN, M.; YU, Z. High yield of poly- γ -glutamic acid from *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation using swine manure as the basis of a solid substrate. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1872-1879, 2005.
- CHENG, C.; ASADA, Y.; AAIDA, T. Production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus licheniformis* A35 under denitrifying conditions. **Agric. Biol. Chem.**, v. 53, p. 2369 – 2375, 1989.
- CROMWICK, A. M.; GROSS, R. A. Effect of manganese (II) on *Bacillus licheniformis* ATCC 9945 A physiology and γ -poly (glutamic acid) formation. **Int. J. Biol. Macromol, USA**, v. 16, p. 265-275, 1995.
- 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, nov.

2001.

DONG, M. W.; GANT, R. High-speed liquid chromatographic analysis of amino acids by post-column sodium hypochlorite- σ -phthaldehyde reaction. **Journal of chromatography**, v. 327, p. 17-25, 1985.

DU, G.; YANG, G.; QU, Y.; CHEN, J.; LUN, S. Effects of glycerol on the production of poly (γ - glutamic acid) by *Bacillus licheniformis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2143 – 2147, 2005.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; ROBERTS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal. Chem.*, v. 25, p. 350 – 356, 1956.

EUZENAT O.; GUIBERT, A. GOMBES, D. Production of fructooligosaccharides by levansucrase from bacillus subtilis c4. **Process Biochemistry**, v. 32, n. 3, p. 237-243, 1997.

GONZALES, D.; FAN, K.; SEVOIAN, M. Synthesis and swelling characterization of poly (γ -glutamic acid) hydrogel. **J. Polym. Sci.: Part A: Polym. Chem.**, v. 34, p. 2019 – 2027, 1996.

GOTO, A.; KUNIOKA, M. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus Subtilis* IFO3335. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 56, p. 1031-1035, 1992.

HAN, O. H.; CHOI, H.J. NMR study of poly (γ -glutamic acid) hydrogels prepared by γ -irradiation: characterization of bond formation and scission. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 20, n. 8, p. 921-924, 1999.

HO, G-H. ; HO, T-I. ; HSIEH, K-H.; S.; SU, Y-C; LIN, P-Y.; YANG, J.; YANG, K-H.; YANG, S-C. γ -Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural Characteristics, Chemical Properties and Biological Functionalities. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 53, n. 6, p. 1363 -1384, 2006.

ITO, Y.; TANAKA, T.; OHMACHI, T.; ASADA, Y. Glutamic acid independent production of poly(γ –glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 60, n. 8, p. 1239-1242, 1996

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.

KUBOTA, H.; NAMBU, Y.; ENDO, T. Convenient and quantitative esterification of poly(γ -glutamic acid) produced by microorganism. **J. Poly. Sci. Part A: Polym. Chemistry**, v. 31, p. 2877-2878, 1993.

KUBOTA, H.; NAMBU, Y.; ENDO, T. Alkaline hydrolysis of poly- γ -glutamic acid produced by microorganism. *J. Poly. Sci. Chem.*, v. 34, p. 1347-1351, 1996.

KUNIOKA, M. Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid) from L-glutamine, citric acid and

ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. **Applied Microbiol Biotechnol**, v. 44, p. 501-506, 1995.

KHURI, A. I., CORNELL, J. A. **Response surfaces: designs and analyses**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, 1996.

JARRET, H.W.; COOKSY, K.D.; ELLIS, B. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica column. **Analytical Biochemistry**, v. 153, n. 1, p. 189-198, 1986.

LI, C.; PRICE, J. E.; MILAS, L.; HUNTER, N. R.; KE, S.; TANSEY, W.; CHARNSAGAVEJ, C.; WALLACE, S. Antitumor activity of poly (L-glutamic acid)-Paclitaxel on syngeneic and xenografted tumors'. **Clinical Cancer Research**, v. 5, p. 891 – 897, 1999.

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, n. 1, p. 49 – 58, 2004.

MCLEAN, R.J.C; BEAUCHEMIN, D.; CLAPHAM, L.; BEVERIDGE, T.J. Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, n. 12, p. 3671-3677, 1990

MCLEAN, R.J.C; BEAUCHEMIN, D., BEVERIDGE, T.J. Influence of oxidation state on iron binding by *Bacillus licheniformis* capsule. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 405-408, 1992.

MONTGOMERY, D.G. **Design and analysis of experiments**. New York: John Wiley & Sons, 2001.

MORIKAWA, M.; KAGIHIRO, S.; HARUKI, M.; TAKANO, K.; BRANDA, S.; KOLTER, R.; KANAYA, S. Biofilm formation by a *Bacillus subtilis* strain that produces γ -polyglutamate. **Microbiology**, v. 152, p. 2801-2807, 2006.

MORILLO, M. C. **Ésteres alquílicos de los ácido poly(γ -glutámico) y poli(β -aspártico): síntesis estructura y propiedades**. 2002. Tese de Doutorado: Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona. Disponível em: <http://www.tdcat.cesca.es/TESIS_UPC/AVAILABLE/TDX-0716102-115020//01PORTADA.pdf>. Acesso em: 28 dez. 2005.

NETO, B. B.; SCARNINIO, I. S. BRUNS, R. E. **Planejamento e otimização de experimentos**. São Paulo: UNICAMP, 1995.

OGAWA, Y.; HOSOKAWA, H.; HAMANO, M.; MATAI, H., Purification and properties of γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* (natto). **Agric. Biol. Chem**, v. 55, p. 2971-2977, 1991.

OGAWA, Y., YAMAGUCHI, F., YUASA, K., TAHARA, Y. Efficient production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* (natto) in jar fermenters. **Biosci. Biotech.**

Biochem., v. 61, p. 1684 – 1687, 1997.

OLIVEIRA, M. R.; CELLIGOI, M. A. P. C.; BUZATO, J. B.; SILVA, R. S. S. F. Estudo experimental da produção de sorbitol por *Zymomonas mobilis* em altas concentrações de sacarose. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 2, p. 197-202, 2004.

OLIVEIRA, M. R.; SILVA, R. S. S. F.; BUZATO, J. B., CELLIGOI, M. A. P. C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 177-183, 2007.

PACE, G. W. **Biotecnologia Básica**. Zaragoza: Acribia, 1991.

PARK, C.; CHOI, J.C.; CHOI Y. H.; NAKAMURA, H.; SHIMANOUCI, K.; HORIUUCHI, T.; MISONO, H.; SEWAKI, T.; SODA, K.; ASHIUSHI, M.; SUNG, M. H. 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.

PÉREZ-CAMERO, G.; CONGREGADO, F.; BOU, J.; MUÑOZ-GUERRA, S. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly(γ -glutamic acid.). **Biotechnology Bioeng.**, v. 63 p. 110-115, 1999.

SANIO, A. S. Occurrence, functions and biosynthesis of poly-amides in microorganisms and biotechnological production. **Naturwissenschaften**, v. 89 p. 2-11, 2002.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Can. J. Microbiol.**, v. 50, p. 1 – 17, 2004.

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* CCRRC 12826. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 213 – 220, 2002.

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

SHIH, I. L.; WU, P. J., SHIEH, C. J. Microbial production of a poly(γ -glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2827 – 2832, 2004.

SHIH, I. L.; YU, Y. T. Simultaneous and selective production of levan and poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 27, p. 103 –106, 2005.

SHI, F.; XU, Z.; CEN, P. Optimization of gamma-polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis* ZJU-7 using a surface-response methodology. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, p. 251-257, 2006.

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 applications. **The Chemical Record**, v. 5, p. 352-366, 2005.

TANAKA, T.; FUJITA, K. I.; TAKENISHI, S.; TANIGUCHI, M. Existence of an optically heterogeneous peptide unit in poly (γ - glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. **Journal Fermentation and Bioengineering**, v. 84, p. 361 – 364, 1997.

TORNE, C. B., LEONARD, C. G., NOYES, H. E., HOUSERWRIGTH, R. D. Production of glutamyl polipeptide by *Bacillus licheniformis*. **Journal Bacteriology**, v. 68, p. 307- 315, 1954.

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 Biochemistry**. v. 40, n. 2005, p. 519 – 523, 2005.

XU, J.; SHOUWEN, C. ZINIU, Y. Optimization of process parameters for poly- γ - glutamate production under solid state fermentation from *Bacillus subtilis* CCTCC202048. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 3075-3081, 2005.

WARD, R. M.; ANDERSON, R. F.; DEAN, F. K. Polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis* NRRL- B2612 grown on wheat gluten. **Biotechnol Bioengineering**, v. 5, p. 41-48, 1963.

YOKOI, H.; NATSUDA, O.; HIROSE, J.; HAYASHI, S.; TAKASAKI, Y. Characteristics of a biopolymer flocculant produced by *Bacillus* sp. PY-90. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 79, n. 4, p. 378 – 380, 1995.

YOKOI, H.; ARIMA, T.; HIROSE, J.; HAYASHI, S.; TAKASAKI, Y. Flocculation properties of poly(γ -glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 82, p. 84– 87, 1996.

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*. **Biotechnonology Letters**, v. 22, p. 585 – 588, 2000.

ANEXOS

ANEXO A

Normas para submissão do artigo para o periódico *Process Biochemistry*. Disponível em:
http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/422857/authorinstructions

PROCESS BIOCHEMISTRY

Guide for Authors

Process Biochemistry is an application-orientated research journal devoted to reporting advances with originality and novelty, in the science and technology of the processes involving bioactive molecules or elements, and living organisms ("Cell factory" concept). These processes concern the production of useful metabolites or materials, or the removal of toxic compounds. Within the segment "from the raw material(s) to the product(s)", it integrates tools and methods of current biology and engineering. Its main areas of interest are the food, drink, healthcare, energy and environmental industries and their underlying biological and engineering principles. Main topics covered include, with most of possible aspects and domains of application: fermentation, biochemical and bioreactor engineering; biotechnology processes and their life science aspects; biocatalysis, enzyme engineering and biotransformation; downstream processing; modeling, optimization and control techniques.

Submission of manuscripts

Authors are requested to submit their manuscripts electronically, by using the EES online submission tool at <http://ees.elsevier.com/prbi/>. After registration, authors will be asked to upload their article, an extra copy of the abstract, and associated artwork. The submission tool will generate a PDF file to be used for the reviewing process. The submission tool generates an automatic reply and a manuscript number will be generated for future correspondence.

A cover letter should be submitted on line by authors together with the manuscript, which includes the following points: 1) all authors agree to submit the work to PRBI, 2) the work has not been published/submitted or being submitted to another journal, 3) the novelty and significant contribution of the submitted work are briefly described.

In their on-line submission, authors are required to suggest at least two independent referees (up to five, outside their own institution) with their email addresses. But, the selection of the referees is up to the Editors. All submissions will be reviewed by two referees. Manuscripts

will be pre-screened for suitability and may be returned to the authors without peer review if they do not meet the criteria for originality and novelty or cause misunderstanding.

When a manuscript is rejected by one editor, generally it should not be resubmitted to another editor in its original version, and should be, unless specific problem, resubmitted after appropriate modifications, to the same editor. It is up to the discretion of the editors to reconsider such revised manuscripts as new submissions. Please include a letter of transmittal explaining why a revised manuscript should be reconsidered by the editors, a detailed response to the issues raised by the reviewers and the editor for the original version, and a concise outline of the revisions. Any corresponding author or co-author of one manuscript which has been rejected (without resubmission encouragement) must not resubmit a similar manuscript. If so, these authors will have a punishment of two years of prohibition to submit.

It is highly recommended to validate the pertinent and main data of the manuscripts by reproducibility assays, that is to say to give in the corresponding (parts of the) Tables their mean values and standard deviations, and in the corresponding (parts of the) Figures their error bars. These data should be then obtained with a minimum of triplicate assays. Moreover the authors must give a list of all related manuscripts/papers, whether in submission or in press.

Format and type of manuscripts

Process Biochemistry Process Biochemistry accepts three types of manuscripts: Full length articles, Short communications and Reviews. The texts should be double-spaced with all lines numbered and be as concise as possible. All manuscripts must be submitted in the following format: the first page includes the title, the authors' first and last names [with the corresponding author indicated by an asterisk*], addresses [with a superscript letter to indicate a different address], and corresponding author's fax and email; the second page includes the abstract and six key words; subsequent pages include the Introduction, Materials and methods, Results, Discussion, Acknowledgement(s), and References. Tables and figures are included after References with a separate page for each. For experimental design results, as they are scientifically non exploitable, 3D figures are generally discouraged. Indicate then only the pertinent data in 2D diagrammes. Page numeration starts from the first page. The Results and Discussion sections may be combined but be thorough in the discussion about the novelty and impact of the submitted work. Articles without sufficient discussion will be systematically rejected. Legends for tables and figures should be complete and concise: one figure or one table should be perfectly understandable with its own legend, and incomplete legends will not be accepted.

Full length articles (FLA) should not generally **exceed 25 double-spaced pages** of text (not including the references) and should not contain more than 15 figures and/or tables. Short communications (SCO) should not exceed 10 double-spaced pages of text (not including the references) and no more than 5 figures and/or tables. Reviews (REV) should not generally exceed 20 double-spaced pages of text (not including the references) and should not contain more than 10 figures and/or tables.

Accelerated publications can sometimes be taken into consideration. The authors should then clearly motivate the reasons of the accelerated way in the cover letter.

Each paper should be provided with an abstract of 100-150 words for Short Communications and 150-200 words for Full Length Articles and Reviews, reporting concisely on the purposes and results of the paper, and also six keywords. The title of the paper should unambiguously reflect its contents. Where the title exceeds 70 characters a suggestion for an abbreviated running title should be given.

The SI system should be used for all scientific and laboratory data: if, in certain instances, it is necessary to quote other units, these should be added in parentheses. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit 'billion' (10⁹ in America, 10¹² in Europe) is ambiguous and should not be used.

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and / should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily understood by an international readership, units should be put in full.

Footnotes should be avoided especially if they contain information which could equally well be included in the text. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

Colour illustrations in the print version are reproduced at the author's expense. The publisher will provide the author with a cost estimate upon receipt of the accepted paper. Colour illustrations in the online version are always at no cost to the authors.

References: References should be cited at the appropriate point in the text by a number in square brackets. A list of references, in numerical order, should appear at the end of the paper. All references in this list should be indicated at some point in the text and vice versa. Unpublished data or private communications **AND WEBSITE ADDRESSES** should not appear in the list. Examples of layout of references are given below.

[1] Hsieh C, Hsu TH, Yang FC. Production of polysaccharides of *Ganoderma lucidum* (CCRC36021) by reusing thin stillage. *Process Biochem* 2005;40:909-916.

[2] Stephanopoulos GN, Aristidou AA, Nielsen JE. *Metabolic engineering: principles and methodologies*. New York: Academic Press; 1998. p.494

[3] Zhong JJ, Yoshida T. Rheological characteristics of suspended cultures of *Perilla frutescens* and their implications in bioreactor operation for anthocyanin production. In: Ryu DDY, Furusaki S editors. *Advances in Plant Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier Science; 1994. p. 255-279.

[4] Lima R, Salcedo, RL. An optimized strategy for equation-oriented global optimization. In: Grievink J, Schijndel JV. editors. *10th European Symposium on Computer Aided Chemical Engineering*. New York: Academic Press; 2002. p. 913-918.

[5] Curtin CD. *Towards molecular bioprocessing as a tool to enhance production of anthocyanins in Vitis vinifera L. cell suspension culture*. Australia: Flinders University; Ph.D. thesis; 2004. p.250.

[6] Snow-Brand-Milk-Prod. Lysozyme purification by affinity chromatography on crosslink chitosan sulfate. *Jpn. Patent*. JP 05260-966. 92.03.24.

[7] Enfors SO, editor. Physiological stress responses in bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 244.

[8] Schweder T, Hecker M. Monitoring of stress response, In: Enfors SO, editor. Physiological stress responses in bioprocesses. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology vol. 89. Berlin: Springer; 2004. p. 47-71.

Language Polishing: For authors, who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission, please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorhome.authors/languagepolishing> or contactauthorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

US National Institutes of Health (NIH) voluntary posting ("Public Access") policy Elsevier facilitates author posting in connection with the voluntary posting request of the NIH (referred to as the NIH "Public Access Policy", see <http://www.nih.gov/about/publicaccess/index.htm>) by posting the peer-reviewed author's manuscript directly to PubMed Central on request from the author, after formal publication. Upon notification from Elsevier of acceptance, we will ask you to confirm via e-mail (by e-mailing us at NIHauthorrequest@elsevier.com) that your work has received NIH funding (with the NIH award number, as well as the name and e-mail address of the Prime Investigator) and that you intend to respond to the NIH request. Upon such confirmation, Elsevier will submit to PubMed Central on your behalf a version of your manuscript that will include peer-review comments, for posting 12 months after the formal publication date. This will ensure that you will have responded fully to the NIH request policy. There will be no need for you to post your manuscript directly to PubMed Central, and any such posting is prohibited. Individual modifications to this general policy may apply to some Elsevier journals and its society publishing partners.

Proofreading

One set of proofs, as an e-mail PDF, will be sent to the corresponding author as given on the title page of the manuscript. Only typesetter's errors may be corrected; no changes in, or additions to, the edited manuscript will be allowed. Elsevier will do everything possible to get your article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication. Subsequent corrections are not possible, so please ensure your first sending is complete.

Offprints

Twenty-five offprints of each paper will be provided free of charge. Additional copies may be ordered at the prices shown on the price list which will be sent by the publisher to the author together with the offprint order form upon receipt of the accepted manuscript.

Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit the journal homepage at <http://www.elsevier.com/locate/prbi>. The journal homepage also provides the facility to track accepted articles and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed, as well as detailed artwork guidelines, copyright information, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, are provided after registration of an article for publication.

Online manuscript tracking

Authors can keep a track on the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track a Paper" feature. For more information, visit <http://www.elsevier.com/trackarticle>. Process Biochemistry has no page charges.

ANEXO B

Aplicação da metodologia de superfície de resposta para o estudo da produção de ácido poli- γ -glutâmico por *Bacillus subtilis* ATCC 6633

Flávia Oliveira de Araújo^a; Lucia Helena Mendonça Vargas^a; Rui Sérgio dos Santos Ferreira da Siva^b; Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi^a

^aDepartamento de Bioquímica e Biotecnologia, ^bDepartamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Londrina

Caixa-Postal 6001, 86051-990 Londrina, Paraná, Brasil

Correspondência do autor: flaviaoaraujo@bol.com.br

Tel: + 43 – 3371-4270

Resumo

Metodologia de superfície de resposta foi empregada para investigar o efeito da concentração de sacarose, ácido glutâmico e tempo de cultivo na produção de ácido poli- γ -glutâmico por *Bacillus subtilis* ATCC 6633, uma linhagem ainda não estudada. A melhor produção de γ -PGA foi de 20,4 g/L obtida em 132 g/L de sacarose, 27,6 g/L de ácido glutâmico e 104 horas de fermentação. A produtividade referente à máxima de produção de γ -PGA foi de 0,1962 g/Lh, próxima ao ponto central que atingiu a média de 0,1954g/Lh em 150 g/L sacarose; 24 g/L ácido glutâmico; 80 horas de cultivo, tornando-se uma vantagem operacional pela redução do tempo de fermentação.

Palavras-chave: Ácido poli- γ -glutâmico (γ -PGA). *Bacillus subtilis*. Metodologia de superfície de resposta. Fermentação.

1 Introdução

A produção do ácido poli- γ -glutâmico (γ -PGA) tem sido atrativa por ser um produto biodegradável e não tóxico ao homem e ao meio ambiente. É um biopolímero formado de unidades de ácido glutâmico e com um amplo potencial de aplicação devido as suas propriedades, tais como: espessante; umectante; substituto biodegradável como termoplástico, fibras, filmes e membranas; crioprotetor; agente floclulante; absorvedor de metal pesado; dispersante; aditivo para alimentação animal e inúmeras outras [1,2,3]. Seu potencial de

aplicação pode ser em diversos campos das indústrias de alimentos, cosméticos, medicamentos como também em tratamento de água e na agricultura [2].

Várias espécies de *Bacillus* são descritas como produtoras de γ -PGA por processo fermentativo e o *Bacillus subtilis* tem sido estudado por sua elevada capacidade de produção desse polímero que é acumulado durante a fase estacionária do seu crescimento, como componente principal da cápsula celular ou material extracelular [2,4,5].

Durante o processo fermentativo os requerimentos nutricionais e as condições de cultivo afetam a biossíntese de γ -PGA [2,6,7]. Assim, estudos sobre os parâmetros fonte de carbono e nitrogênio, tempo de fermentação, variação de sais e necessidade de adição de ácido glutâmico dentre outros influenciam no rendimento, indicando assim a relevante importância do estudo das condições de fermentação, para a otimização da produção [1].

Além dos requerimentos nutricionais, outros parâmetros físicos influenciam na fermentação e são importantes para a produção, destacando-se o pH que usualmente é recomendado entre 7,0 e 7,5; temperatura de 30 a 37 °C [6, 8, 9, 10] e agitação de 120 a 200 rpm [6, 11,12]. Esses parâmetros podem ser analisados conjuntamente durante o processo fermentativo por metodologia estatística.

O uso de instrumentos estatísticos, tais como planejamento experimental fatorial associado à metodologia de superfície de resposta, têm sido usados para investigar a influência de vários fatores sobre uma ou mais respostas do processo, podendo ser estudados ao mesmo tempo, assim diminuindo os custos da produção pelo número reduzido de ensaios, reagentes e tempo [13]. O planejamento experimental estatístico tem permitido a otimização de processos e produtos obtidos por meio da biotecnologia [1,3,13].

O objetivo principal desse trabalho foi investigar através da metodologia de superfície de resposta a influência das condições de cultivo: concentração de sacarose, ácido glutâmico e tempo de cultivo na produção de ácido poli- γ -glutâmico por *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

2 Material e Métodos

2.1 Microrganismo e Condições de Cultura

Bacillus subtilis espécie ATCC 6633 foi obtida da Coleção de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Brasil). A bactéria foi mantida em Agar Nutriente (peptona, 5,0 g/L; extrato de levedura, 3,0 g/L; agar, 2,0 g/L), conservada a 4 °C, e renovada a cada 4

semanas. O meio de inoculo foi composto em g/L: sacarose, 10; extrato de levedura, 2,0, KH_2PO_4 1,0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3,0, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,6, MnSO_4 , 0,15 , citrato de amônio 0,3. A concentração celular foi determinada por turbidimetria a 400 nm e o inoculo foi padronizado em 0,2 g/L de células.

2.2 Produção de γ -PGA

Bacillus subtilis ATCC 6633 foi cultivado em meio de fermentação contendo: NH_4Cl (7,0 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g/L), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,04 g/L), K_2HPO_4 (0,5g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,15 g/L), concentrações sacarose e ácido glutâmico, e tempo de fermentação seguiram conforme o desenho experimental (Tabela 1). As fermentações em batelada foram realizadas em erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de diferentes meios de fermentação, a 37 °C, com agitação a 150 rpm e os valores de pH iniciais foram ajustados dentro da faixa de 7,0 a 7,5 com NaOH.

Tabela 1- Delineamento central composto rotacional 2^3 e resultados de produção e produtividade de γ -PGA, biomassa e AGC.

ENSAIOS	VÁRIAVEIS CODIFICADAS			RESPOSTAS				
	X ₁	X ₂	X ₃	Biomassa g/L	AGC %	γ -PGA g/L	Produtividade (g/L.h)	
1	-1	-1	-1	6,4	4,4	7,6	0,136	
2	1	-1	-1	6,3	41	8,7	0,1554	
3	-1	1	-1	6,1	19	8,3	0,1482	
4	1	1	-1	6,3	2,5	8,5	0,1518	
5	-1	-1	1	4,9	17	8,5	0,0817	
6	1	-1	1	4,3	34	5,9	0,0567	
7	-1	1	1	8,6	57	20,4	0,1962	
8	1	1	1	4,0	58	6,9	0,0863	
9	1	0	1	3,2	58	6,6	0,0825	
10	-1,68	0	0	2,8	38	6,8	0,0850	
11	1,68	-1,68	0	3,0	72	6,1	0,0763	
12	0	1,68	0	3,4	51	10,3	0,1288	
13	0	0	1,68	3,7	50	7,9	0,0658	
14	0	0	-1,68	4,0	65	6,0	0,0500	
15	0	0	0	5,1	56	15,9	0,1988	
16	0	0	0	5,8	52	15,6	0,1950	
17	0	0	0	5,9	32	15,4	0,1925	
Fatores				Níveis codificados				
				-1,68	-1	0	1	1,68
X ₁	Sacarose (g/l)			120	132	150	168	180
X ₂	Ácido glutâmico (g/l)			18	20,4	24	27,6	30
X ₃	Tempo (horas)			40	56	80	104	120

2.2 Métodos analíticos

Após cada fermentação, o meio de cultura foi centrifugado (9050 x g por 15 min) e as células bacterianas foram resuspensas em solução salina 0,9 g% (m/v). O crescimento celular foi determinado por turbidimetria a 400 nm e os valores foram relacionados com o peso seco (g/L) da curva padrão de biomassa. Os açúcares totais foram quantificados pelo método de Fenol-Sulfúrico [14] usando a glucose como padrão.

A concentração de ácido glutâmico no meio de cultura, após derivatização com orto-ftalaldeído [15] foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em cromatógrafo (Shimazu modelo LC 10AT) equipado com uma coluna de fase reversa ODS-C18 e operando com o fluxo de 1mL/min. A eluição foi realizada em fase móvel constituída por solução acetato de sódio/metanol (70:30,v/v) utilizando detector de fluorescência com excitação de 340 nm e emissão em 450 nm.

2.2.1 Extração de γ -PGA

Após centrifugação para remoção das células bacterianas, o ácido poli- γ -glutâmico foi precipitado com etanol absoluto a 4°C na proporção 4:1 (etanol: sobrenadante), por 12 horas a 4°C. O precipitado foi coletado por centrifugação em 21.000 x g por 40 min a 4°C e o γ -PGA bruto foi liofilizado [3].

2.2.2 Determinação de γ -PGA

Para determinar a concentração de γ -PGA, cada amostra liofilizada foi hidrolisada com HCl 6M a 100°C por 12 horas, neutralizada com NaOH 6M [18] e mensurado o ácido glutâmico.

2.3 Análise estatística

Para definir as melhores condições de cultivo para produção de γ -PGA por *B. subtilis* ATCC 6633, foi inicialmente conduzido um Tratamento 1 referente ao planejamento fatorial completo 2^3 com três repetições no ponto central, totalizando 11 ensaios. As variáveis

analisadas foram: concentração de sacarose (30, 75 e 120 g/L), ácido glutâmico (10, 15 e 20 g/L) e tempo de fermentação (24, 48 e 72 h). A partir desses resultados foi proposto um novo experimento utilizando-se a técnica de “maior atividade” [3] para atingir a região de melhor produção. As variáveis testadas foram concentrações de sacarose (120, 150 e 180 g/L), ácido glutâmico (20, 24,2 e 28,4 g/L) e o tempo de fermentação (72, 81 e 89 h).

As respostas obtidas desse planejamento passaram a ser um ponto central e um Tratamento 2 constituído de um delineamento central composto rotacional [3] com pontos estrelas ($\alpha = \pm 1,68$) e três repetições no ponto central, totalizando 17 ensaios (Tabela 1) foi realizado. As respostas (\hat{y}) de interesse foram biomassa (g/L), produção de γ -PGA (g/L), consumo de ácido glutâmico (AGC) e produtividade de γ -PGA (g/Lh).

O software Statistic 7.0 foi usado para desenvolver o planejamento e as análises das respostas obtidas.

3. Resultados e Discussão

3.1 Tratamento 1

A escolha do substrato adequado é um fator importante para a produção de γ -PGA assim optou-se por utilizar a sacarose como fonte de carbono devido a sua relevante influência, descrita por alguns autores [6, 9, 17, 18].

Para verificar se o *B. subtilis* ATCC 6633 é um microrganismo dependente de ácido glutâmico foram inicialmente realizados cultivos, em meio de sacarose (100g/L) com 10 g/L de ácido glutâmico e um controle sem adição. Os resultados indicaram que o microrganismo cresceu bem em meio de sacarose e é dependente de ácido glutâmico. Produzindo 2,86 g/L de γ -PGA quando o ácido L-glutâmico foi adicionado ao meio e não houve produção na sua ausência. Também foi constatada uma diminuição da biomassa de 2,70 para 0,61 g/L.

Após definir a necessidade de ácido glutâmico pelo *B. subtilis* foi desenvolvido um planejamento fatorial 2^3 utilizando as variáveis: concentração de sacarose, ácido glutâmico e tempo de cultivo e obteve-se a maior produção γ -PGA de 7,1 g/L nos níveis superiores das variáveis estudadas: 120 g/L sacarose; 20 g/L ácido glutâmico e 72 horas de cultivo.

As variáveis mostraram efeitos positivos e significativos, indicando que os aumentos da concentração de sacarose, ácido glutâmico e do tempo elevaram a produção do biopolímero. De acordo com a análise estatística (dados não apresentados), a concentração de

sacarose apresentou o efeito mais significativo, indicando assim a sua relevância nas condições estudadas ($p=0,007414$), seguido pela concentração de ácido glutâmico e tempo de fermentação. Estudos realizados por Goto and Kunioka; Lu et al. [3, 12] confirmam que a produção de γ -PGA é influenciada pela concentração de sacarose e que o ácido glutâmico interfere no aumento da produção para as bactérias classificadas como dependentes do ácido glutâmico.

A interação da sacarose com o tempo de cultivo apresentou efeito significativo e positivo e esse efeito sinérgico entre as variáveis proporcionou ao aumento da produção de γ -PGA. O teste de curvatura indicou falta de significância ($p=0,34$), comprovando que não foi atingida a região de ponto máximo de produção do biopolímero.

Portanto, se fez necessário uma nova investigação para encontrar uma região promissora, em termos de maior produção de γ -PGA, desenvolvendo a técnica de maior aclividade ascendente (steepest ascent) [3]. Dentre as novas condições testadas: sacarose a 150 g/L, ácido glutâmico a 24,2 g/L e tempo de cultivo de 81 horas, foram as variáveis que acarretaram a melhor produção de γ -PGA de 16,94 g/L. Porém, o aumento dos níveis dessas variáveis (sacarose 180 g/L, ácido glutâmico 28,4 g/L e tempo de cultivo 89 horas) reduziu a produção para 13,30 g/L, indicando que a máxima aclividade já tinha sido alcançada.

3.2 Tratamento 2

Após ter sido alcançada a região de ótima produção de γ -PGA, foi empregado um segundo tratamento que consistiu de um delineamento central composto rotacional (Tabela 1). Esse planejamento foi desenvolvido a partir do novo ponto central: 150 g/L de sacarose, 24 g/L de ácido glutâmico e 80 h de tempo de cultivo.

Os resultados obtidos desse delineamento estão apresentados na Tabela 1 e os efeitos das variáveis estudadas para produção de γ -PGA e os respectivos níveis de significância na Tabela 2.

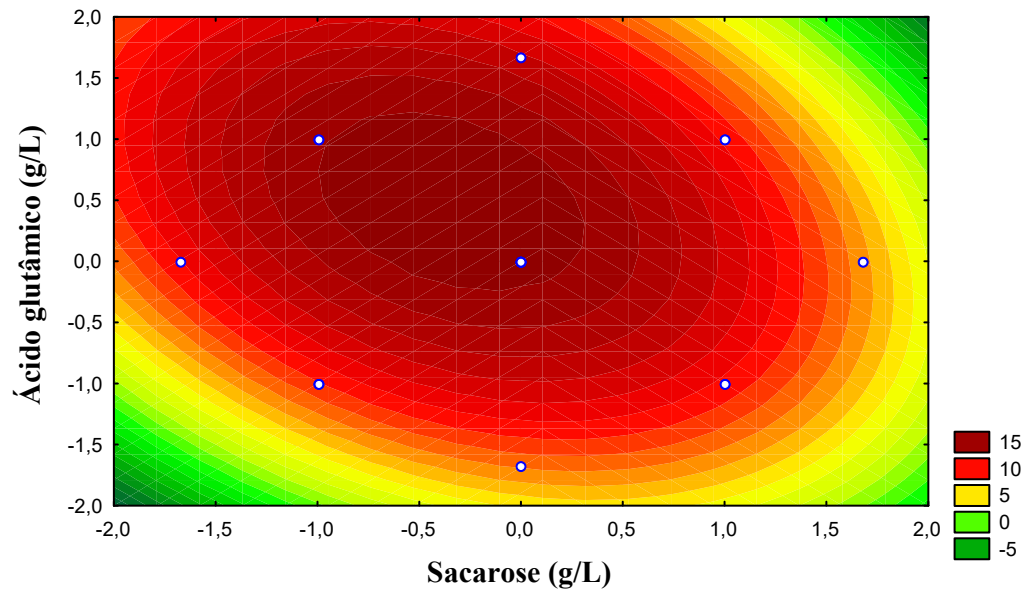
Tabela 2 - Estimativa dos efeitos para produção e produtividade de γ -PGA.

	Fator	Efeito	p
Produção de γ -PGA (g/L)	Média/ Intercepto	15,461	0,000029
	X_1	-2,120	0,207070
	X_1^2	-5,174	0,017819
	X_2	2,996	0,090220
	X_2^2	- 4,108	0,044427
	X_3	0,793	0,619240
	X_3^2	-4,997	0,020678
	$X_1 \cdot X_2$	-2,950	0,182109
	$X_1 \cdot X_3$	-4,350	0,065243
	$X_2 \cdot X_3$	3,100	0,163545

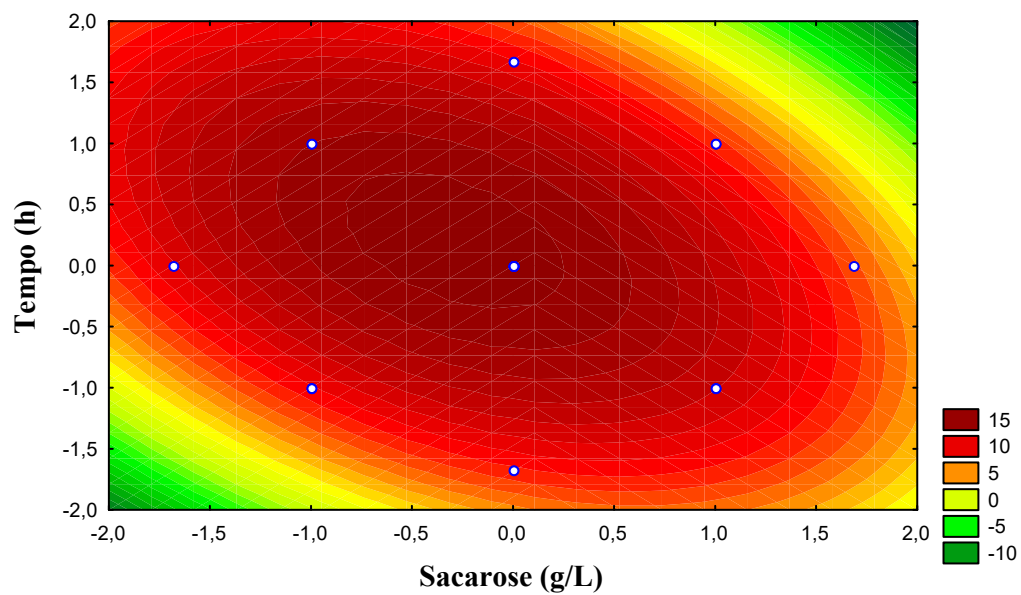
A produção média da biomassa foi de 4,93 g/L, próximo aos encontrados na literatura para produção de γ -PGA [8, 12] e as variáveis estudadas não tiveram efeitos significativos para essa resposta.

A melhor produção de γ -PGA foi de 20,4 g/L obtida em em 132 g/L de sacarose ($X_1 = -1$), 27,6 g/L de ácido glutâmico ($X_2 = +1$) e 104 horas de fermentação ($X_3 = +1$) (Tabela 1). Os efeitos quadráticos das variáveis estudadas foram estatisticamente significativos e negativos para produção de γ -PGA (Tabela 2), indicando que nesta etapa foi obtido o ponto máximo de produção.

Valores elevados de γ -PGA, em média 15,63 g/L, foram encontrados na concentração de sacarose de 150 g/L (ponto central) demonstrando que essa concentração também favoreceu a produção (Tabela 1, Figura 1).



(A)



(B)

Figura 1 - Gráficos de contorno para produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* ATCC 6633: (A) fixando o tempo no nível codificado 0; (B) fixando o ácido glutâmico no nível codificado 0.

O ácido glutâmico foi significativo para produção de γ -PGA, comprovando ser este um componente essencial para síntese. O consumo de ácido glutâmico pelo *Bacillus subtilis* não sofreu influência das variáveis testadas e o experimento 11 (Tabela 1) apresentou o maior consumo de 72%. Este consumo esteve associado a uma produção de 6,1 g/L de γ -PGA e a

taxa de conversão aparente de 33,89% (quantidade de ácido glutâmico convertido em γ -PGA), refletindo num consumo de 2,13 g de ácido glutâmico em 1 g de γ -PGA produzido. As maiores taxas de conversão aparente coincidiram com as melhores produções de γ -PGA nos experimentos 7 e no ponto central, com as taxas de conversão aparente de 73,9 e 65% respectivamente. Nestas condições a relação de consumo de ácido glutâmico com a produção de γ -PGA foram 0,77 g/g e 0,72 g/g, respectivamente. Essas taxas de conversão são comparáveis a dados reportados por Xu et al. (2005) [6], para diferentes espécies de *Bacillus subtilis*.

O tempo de fermentação influencia na produção γ -PGA e varia de acordo com cada espécie e com as condições de cultivo [7, 8, 9]. Observou-se que nos tempos de fermentação de 80 e 104 horas houve aumento na produção de γ -PGA e tempos inferiores e superiores resultaram em menores produções. Esses resultados sugerem que o aumento da síntese das enzimas polimerases nesses tempos contribuiu para o aumento da produção [7].

Tempos superiores a 104 horas levaram ao declínio da produção do biopolímero, que pode ser explicado pela síntese da enzima poliglutamil hidrolase responsável pela degradação de γ -PGA [7,12,20]. A redução da produção também pode ter sido devido ao aumento da viscosidade do meio ou a diminuição gradual das células microbianas pelo baixo aporte de oxigênio [7].

Os valores de produção de γ -PGA, nos tempos estudados, foram próximos aos observados por Shih; Wu; Shieh (2005) [20] com *B. subtilis* C1 que nos tempos de 96 para 144 horas aumentou a produção de γ -PGA de 8,12 para 21,44 g/L, respectivamente. Entretanto, algumas espécies apresentam uma boa produção em tempos de cultivo menores, como observado em *B. subtilis* NX-2, que obteve uma produção de 30,2 g/L em 24 horas [6].

O gráfico de contorno (Figura 1) retrata a produção de γ -PGA e as regiões de máxima produção próximas ao ponto central indica uma vantagem operacional.

A equação polinomial de segunda ordem obtida para produção de γ -PGA é mostrada na Equação (1). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,80 indicando que 80% da variabilidade da resposta poderia ser explicada pelo modelo.

$$\hat{y} = 15,34 - 1,06 X_1 - 2,51 X_1^2 + 1,50 X_2 - 1,98 X_2^2 + 0,42 X_3 - 2,6 X_3^2 - 1,48 X_1.X_2 - 2,18 X_1.X_3 + 1,55 X_2.X_3$$

(1)

\hat{y} : concentração de γ -PGA (g/L); X_1 : sacarose (g/L); X_2 : ácido glutâmico (g/L); X_3 : tempo (h)

A análise de variância da produção do γ -PGA é apresentada na Tabela 3 e demonstra que a regressão foi significativa com $p < 0,05$, e que o modelo apresentado possui boa capacidade preditiva, tendo em vista tratar-se de experimento biológico.

Tabela 3 - Análise de variância da produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

Causa de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F Calculado	F Tabelado
Regressão	241,37	9	26,81	3,15	1,92
Resíduo	59,57	7	8,51		
Total	300,94	16			

A produtividade referente à máxima de produção de γ -PGA foi de 0,1962 g/Lh e no ponto central obteve-se também uma boa produtividade, atingindo a média de 0,1954g/Lh (Tabela1), esses valores são compatíveis aos encontrados na literatura que descrevem valores entre 0,2 a 0,4 g/Lh [12].

O presente estudo possibilitou estudar uma nova linhagem de *B. subtilis*, com bom potencial de produção de γ -PGA e que a máxima produção pode ser alcançada se a espécie for cultivada no meio proposto e definido pela metodologia de superfície de resposta.

Referências

- [1] 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* CCRRC 12826. *Enzyme and Microbial Technology* 2002, 31:213 – 220.
- [2] SHIH, Ing-Lung; VAN, Yi-Tsong. The production of poly- (γ - glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresource Technology* 2001, 79:207-225.
- [3] 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* 2004, 2 (1): 49 – 58.
- [4] SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Can. J. Microbiology* 2004, 50: 1 – 17.

- [5] OGAWA, Y.; HOSOKAWA, H.; HAMANO, M.; MATAI, H., Purification and properties of γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* (natto). *Agric. Biol. Chem* 1991, 55: 2971-2977.
- [6] 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 Biochemistry* 2005, 40: 519 – 523.
- [7] KUNIOKA, M. Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid) from L-glutamine, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. *Applied Microbiol Biotechnol* 1995, 44:501-506.
- [8] KUBOTA, H.; NAMBU, Y.; ENDO, T. Convenient and quantitative esterification of poly(γ -glutamic acid) produced by microorganism. *J. Poly. Sci. Part A: Polym. Chemistry* 1993, 31: 2877-2878.
- [9] ITO, Y.; TANAKA, T.; OHMACHI, T.; ASADA, Y. Glutamic acid independent production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 1996, 60 (8):1239-1242.
- [10] SHIH, I. L.; YU, Y. T. Simultaneous and selective production of levan and poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Letters* 2005, 27:103 –106.
- [11] HO, G-H. ; HO, T-I. ; HSIEH, K-H.; S.; SU, Y-C; LIN, P-Y.; YANG, J.; YANG, K-H.; YANG, S-C. γ -Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural Characteristics, Chemical Properties and Biological Functionalities. *Journal of the Chinese Chemical Society* 2006, 53 (6):1363 -1384.
- [12] GOTO, A.; KUNIOKA, M. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus Subtilis* IFO3335. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 1992, 56:1031-1035.
- [13] OLIVEIRA, M.R.; SILVA, R. S. S.F.; BUZATO, J.B.; CELLIGOI, M.A.P.C. Study of levan production by *Zymomonas mobilis* using regional low-cost carbohydrate sources. *Biochemical Engineering Journal* 2007, 37: 177: 183.
- [14] DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; ROBERTS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substance. *Anal. Chem.* 1956, 25:350 – 356.
- [15] JARRET, H.W., COOKSY, K.D., ELLIS, B. The separation of o-phthalaldehyde derivatives of amino acids by reversed-phase chromatography on octylsilica column. *Analytical Biochemistry* 1986, 153 (1):189-198.
- [16] KAMBOUROVA, M.; TANGNEY, M.; PRIEST, F. G. Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 2001, 67 (2): 1004-1007.
- [17] SHI, F.; XU, Z.; CEN, P. Optimization of gamma-polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis* ZJU-7 using a surface-response methodology. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2006, 11: 251-257.
- [18] PARK, C.; CHOI, J.C.; CHOI Y. H.; NAKAMURA, H.; SHIMANOUCI, K.; HORIUCHI, T.; MISONO, H.; SEWAKI, T.; SODA, K.; ASHIUSHI, M.; SUNG, M. H.

Synthesis of super-high-molecular-weight poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* subsp. *chungkookjang*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2005, 35:128-133.

[19] RICHARD, A.; MARGARITIS, A. Kinetics of molecular weight reduction of poly(glutamic acid) by in situ depolymerization in cell-free broth of *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal* 2006, 30: 303-307.

[20] SHIH, I. L.; WU, P. J., SHIEH, C. J. Microbial production of a poly(γ -glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry* 2004, 40:2827 – 2832.

ANEXO C

Resultados complementares dos experimentos onde estão demonstrados as análises de produtividade, biomassa, açúcar total consumido (ATC) e taxa de conversão de ácido glutâmico em γ -PGA.

Resultados Complementares

A produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi avaliada pelo efeito das variáveis: concentração de sacarose, ácido glutâmico e tempo de cultivo, empregando um planejamento fatorial completo 2^3 . Estes experimentos foram conduzidos com a finalidade de selecionar os níveis mais adequados para o processo de fermentação, visando à máxima produção do biopolímero.

Os resultados de produção e produtividade de γ -PGA, biomassa produzida e açúcar total consumido estão apresentados na Tabela 1. A maior produção de ácido poli- γ -glutâmico foi de 7,1 g/L quando utilizou-se os maiores níveis para concentração de sacarose (120 g/L), ácido glutâmico (20 g/L) e tempo de cultivo (72 horas).

Os resultados dos efeitos lineares das variáveis, os coeficientes de determinação ajustados (R^2), e os valores de significância (p) para curvatura e falta de ajuste para a produção e produtividade γ -PGA, biomassa e ATC estão apresentados na Tabela 2.

Os coeficientes de determinação foram de 89, 93, 69 e 87% e para a produção e produtividade de γ -PGA, biomassa e ATC, respectivamente e os modelos explicaram os dados experimentais.

Tabela 1 – Produção e produtividade de γ -PGA, biomassa produzida e açúcar consumido do planejamento fatorial 2^3 por *Bacillus subtilis*.

ENSAIO	VÁRIAVEIS CODIFICADAS			RESPOSTAS			
	X ₁	X ₂	X ₃	γ -PGA (g/L)	Produtividade (g/L.h)	BIOMASSA (g/L)	ATC (%)
1	-1	-1	-1	0,8	0,0333	2,01	45
2	1	-1	-1	1,9	0,0792	2,80	15
3	-1	-1	1	0,5	0,0069	4,21	90
4	1	-1	1	2,9	0,0403	4,95	25
5	-1	1	-1	2,0	0,0833	2,36	41
6	1	1	-1	3,2	0,1333	1,23	10
7	-1	1	1	2,0	0,0278	3,66	90
8	1	1	1	7,1	0,0986	6,64	31
9	0	0	0	2,3	0,0479	2,97	27
10	0	0	0	2,0	0,0417	2,36	28
11	0	0	0	2,6	0,0542	2,23	25
FATORES				NÍVEIS CODIFICADOS			
				-1	0	1	
X ₁	Sacarose (g/L)			30	75	120	
X ₂	Ácido glutâmico (g/L)			10	15	20	
X ₃	Tempo (horas)			24	48	72	

ATC: consumo de açúcares totais; AGC: consumo de ácido glutâmico

Quanto ao consumo de açúcares totais o maior valor de 90% ocorreu nos maiores tempos de fermentação e menores concentrações de sacarose (Tabela 1). Os efeitos lineares foram significativos para: sacarose, tempo e para as interações sacarose com tempo e ácido glutâmico com tempo. O efeito foi positivo para o tempo e para interação glutâmico com tempo.

Tabela 2– Estimativa dos efeitos das variáveis estudadas na produção e produtividade de γ -PGA, biomassa e ATC, obtida pelo planejamento fatorial completo 2^3 .

	Fator	Efeito	p
γ -PGA (g/L)	Média/ Intercepto	2,482	0,001326
	X ₁ (Sacarose)	2,450	0,007414
	X ₂ (Ácido glutâmico)	2,050	0,010539
	X ₃ (Tempo)	1,150	0,032383
	X ₁ . X ₃	1,300	0,025609
	Curvatura	-0,250	0,343468
Valores			
R ² ajustado(%)	89		
Falta de ajuste (p)	0,12		
Produtividade			
γ -PGA (g/L.h)	Média/ Intercepto	0,058773	0,000124
	X ₁ (Sacarose)	0,050025	0,005915
	X ₂ (Ácido glutâmico)	0,045825	0,008079
	X ₃ (Tempo)	-0,038875	0,014240
	Curvatura	-0,030	0,072003
Valores			
R ² ajustado (%)	93		
Falta de ajuste (p)	0,18		
Biomassa (g/L)	Média/ Intercepto	3,220	0,001366
	X ₁ (Sacarose)	0,845	0,094130
	X ₂ (Ácido glutâmico)	- 0,020	0,949444
	X ₃ (Tempo)	2,765	0,010055
	X ₁ . X ₃	1,015	0,068111
	Curvatura	-0,960	0,069298
Valores			
	R ² ajustado (%)	69	
	Falta de ajuste (p)	0,14	
ATC (%)			
	Média/ Intercepto	38,7036	0,000072
	X ₁ (Sacarose)	- 46,0300	0,000279
	X ₂ (Ácido glutâmico)	- 0,6600	0,481332
	X ₃ (Tempo)	31,3550	0,000601
	X ₁ . X ₃	-15,7400	0,002380
	X ₂ . X ₃	4,02000	0,034725
Curvatura	-33,3583	0,001944	
Valores			
R ² ajustado (%)	87		
Falta de ajuste (p)	0,11		

A partir dos resultados obtidos em experimentos preliminares foi concluído que o *Bacillus subtilis* ATCC 6633 é um microrganismo dependente do ácido glutâmico para produção de γ -PGA. O aumento da concentração de ácido

glutâmico contribuiu para maior produção de γ -PGA e a conversão de glutâmico em γ -PGA no ensaio 7 foi de 36%, no qual 1,46 de ácido glutâmico foi necessário para ser convertido em 1g de γ -PGA (Tabela 3, Figura 1).

Tabela 3 – Relação da concentração de ácido glutâmico na produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 referente ao planejamento fatorial 2^3 .

Ensaio	Ácido glutâmico (g/L)	γ -PGA (g/L)	Consumo de AG (g/L)	Conversão glutâmico em γ -PGA (%)	Glutâmico / γ -PGA (g/g)
1	10	0,8	1,7	8	2,13
2	10	1,9	2,0	19	1,05
3	10	0,5	6,0	5	12,00
4	10	2,9	5,2	29	1,79
5	20	2,0	6,0	10	3,00
6	20	3,2	7,2	16	2,25
7	20	2,0	11	10	5,50
8	20	7,1	10,4	36	1,46
9	15	2,3	6,8	15	2,96
10	15	2,0	6,9	13	3,45
11	15	2,6	5,4	17	2,08

AG: ácido glutâmico

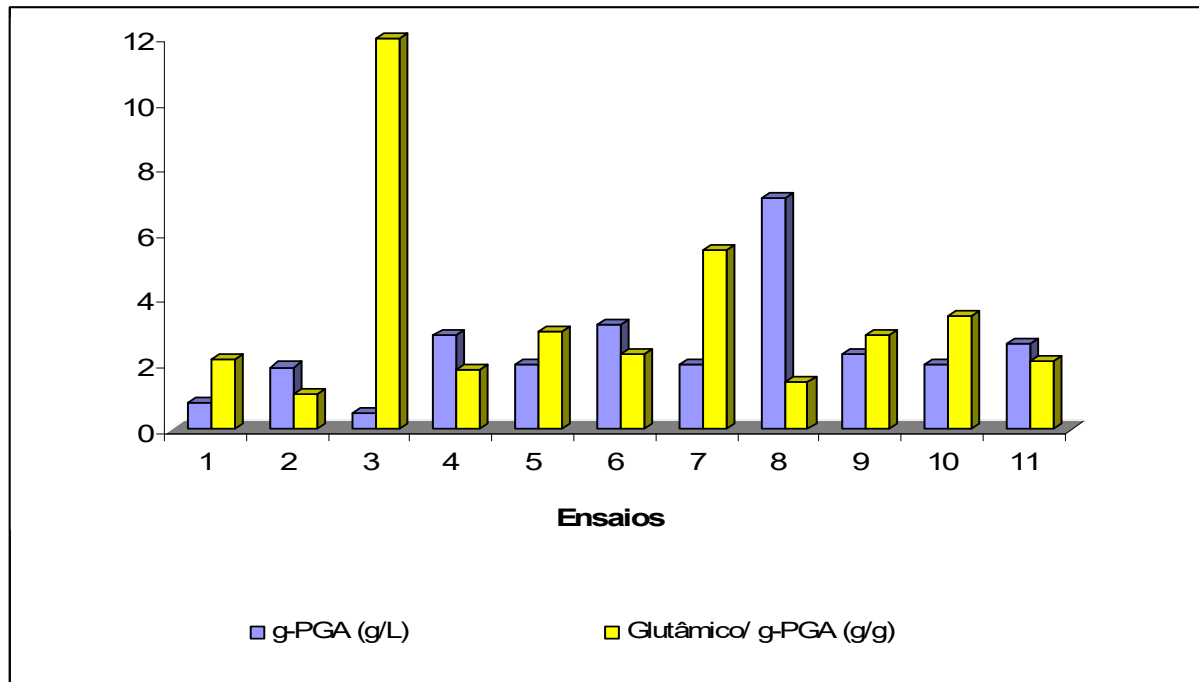


Figura 1 – Produção de γ -PGA e relação do consumo de ácido glutâmico para produção referente ao planejamento fatorial 2^3 por *Bacillus subtilis*.

Pela Tabela 1 pode-se observar que a melhor produtividade de γ -PGA foi de 0,1333 g/Lh (ensaio 6) não coincidindo com a melhor produção de γ -PGA (ensaio 7) devido ao aumento da variável tempo de fermentação. O efeito do tempo de fermentação foi significativo e negativo, indicando que o aumento do tempo diminuiu a produtividade de γ -PGA (Tabela 2).

As respostas não apresentaram falta de ajuste significativa em nível de 5% de significância ($p > 0,05$), mostrando que os dados experimentais se ajustam aos modelos calculados (Tabela 2).

A curvatura para a resposta ATC foi significativa em nível de 5%, porém a produção, produtividade de γ -PGA e biomassa não apresentaram significância (Tabela 2). O ponto máximo para a produção não foi atingido e uma nova investigação foi realizada no sentido de se encontrar uma região mais promissora.

Com intuito de otimizar a produção de γ -PGA foi empregado um delineamento central composto rotacional com base na metodologia de superfície de resposta, descrito na Tabela 3.

Tabela 4 – Produção e produtividade de γ -PGA de *Bacillus subtilis* obtidos delineamento central composto rotacional 2^3

ENSAIOS	VÁRIAVEIS CODIFICADAS			RESPOSTAS				
	X ₁	X ₂	X ₃	AGC %	γ -PGA g/L	Produtividade (g/Lh)		
1	-1	-1	-1	4,4	7,6	0,1357		
2	1	-1	-1	41	8,7	0,1554		
3	-1	1	-1	19	8,3	0,1482		
4	1	1	-1	2,5	8,5	0,1518		
5	-1	-1	1	17	8,5	0,0817		
6	1	-1	1	34	5,9	0,0567		
7	-1	1	1	57	20,4	0,1962		
8	1	1	1	58	6,9	0,0863		
9	1	0	1	58	6,6	0,0825		
10	-1,68	0	0	38	6,8	0,0850		
11	1,68	-1,68	0	72	6,1	0,0763		
12	0	1,68	0	51	10,3	0,1288		
13	0	0	1,68	50	7,9	0,1975		
14	0	0	-1,68	65	6,0	0,0500		
15	0	0	0	56	15,9	0,1988		
16	0	0	0	52	15,6	0,1950		
17	0	0	0	32	15,4	0,1925		
Fatores				Níveis codificados				
				-1,68	-1	0	1	1,68
X ₁	Sacarose (g/L)			120	132	150	168	180
X ₂	Ácido glutâmico (g/L)			18	20,4	24	27,6	30
X ₃	Tempo (horas)			40	56	80	104	120

AGC: ácido glutâmico consumido

A máxima produção de γ -PGA foi obtida quando foi adicionado ao meio 27,6 g/L de ácido glutâmico e a porcentagem de conversão de glutâmico adicionado em γ -PGA foi de 74%, um valor relativamente alto (Tabela 5). No ensaio 7 referente a máxima produção de 20,4 g/L, foi necessário a adição de 0,8 g de ácido glutâmico para produção de 1 g de γ -PGA (Figura 2).

Tabela 5 – Efeito da concentração de ácido glutâmico na produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 referente ao planejamento composto rotacional.

Ensaio	Ácido glutâmico	γ -PGA (g/L)	Consumo de AG (g/L)	Conversão glutâmico em γ -PGA (%)	Glutâmico / γ -PGA (g/g)
1	20,4	7,6	0,9	37	0,11
2	20,4	8,7	8,4	43	0,96
3	27,6	8,3	5,2	30	0,63
4	27,6	8,5	0,7	31	0,08
5	20,4	8,5	3,5	42	0,41
6	20,4	5,9	6,9	29	1,17
7	27,6	20,4	15,7	74	0,77
8	27,6	6,9	19,0	25	2,75
9	24	6,6	13,9	28	2,11
10	24	6,8	9,1	28	1,34
11	18	6,1	13,0	34	2,13
12	30	10,3	15,3	34	1,49
13	24	7,9	12,0	33	1,52
14	24	6,0	15,6	25	2,60
15	24	15,9	13,4	66	0,84
16	24	15,6	12,5	65	0,80
17	24	15,4	7,7	64	0,50

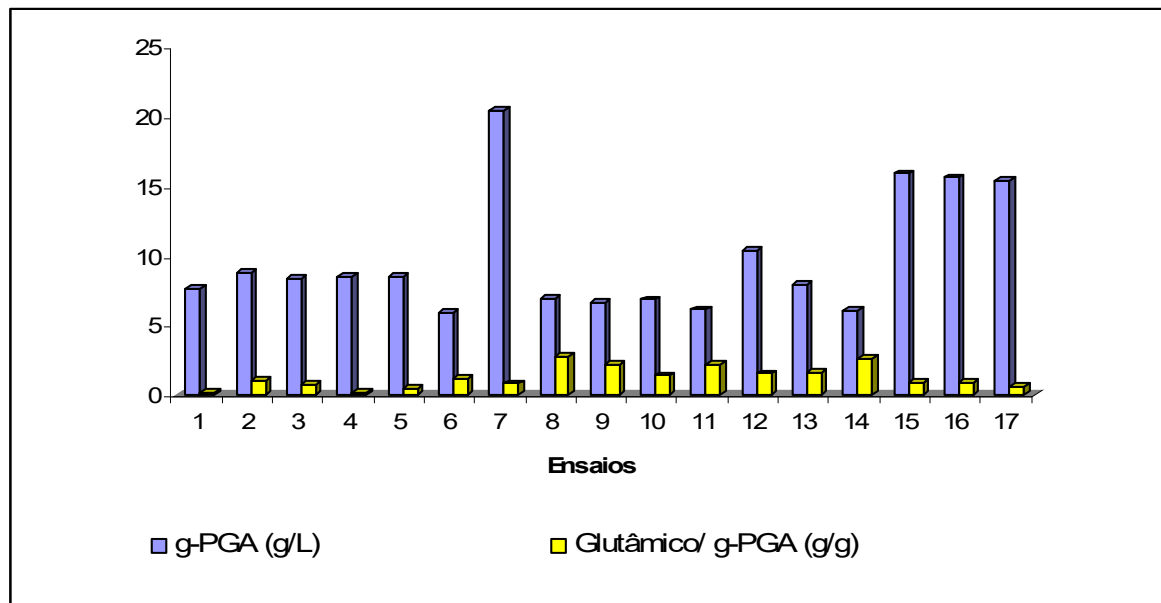


Figura 2 - Produção de γ -PGA e relação do consumo de ácido glutâmico para produção referente ao planejamento central composto rotacional 2^3 por *Bacillus subtilis*.

Os efeitos quadráticos da concentração de sacarose (X_1) e da concentração de ácido glutâmico (X_2) para produtividade foram significativos e negativos, um indicativo de que foram obtidos os pontos de máximo para esta resposta, nas condições estudadas. A variável tempo de cultivo (X_3) mostrou efeito quadrático negativo e significativo em nível de significância de 7%, nível que para ensaios biológicos é considerado satisfatórios.

Tabela 6 – Estimativa dos efeitos das variáveis estudadas na produção de γ -PGA, produtividade e ATC obtidos pelo planejamento composto rotacional.

	Fator	Efeito	p
Produtividade de γ -PGA (g/Lh)	Média/ Intercepto	0,193	0,000002
	X_1	-0,016	0,388910
	X_1^2	-0,066	0,007197
	X_2	0,035	0,072572
	X_2^2	-0,053	0,022060
	X_3	-0,061	0,006481
	X_3^2	-0,038	0,079407
	$X_1 \cdot X_3$	-0,039	0,115579

O efeito linear do tempo foi significativo e negativo sobre a produtividade de γ -PGA uma vez que a redução do tempo de fermentação é um fator para o aumento da produtividade (Tabela 6).

A produtividade referente à máxima de produção de γ -PGA foi de 0,1962 g/Lh e apresentou um aumento de 202% comparado com a etapa 1 que foi de 0,0986 g/Lh (Tabela 1).

Nas Figuras 1 e 2 , observa-se que foram obtidas regiões da máxima produtividade, próximas do ponto central (Tabela 4) , mas com deslocamento para os menores tempos.

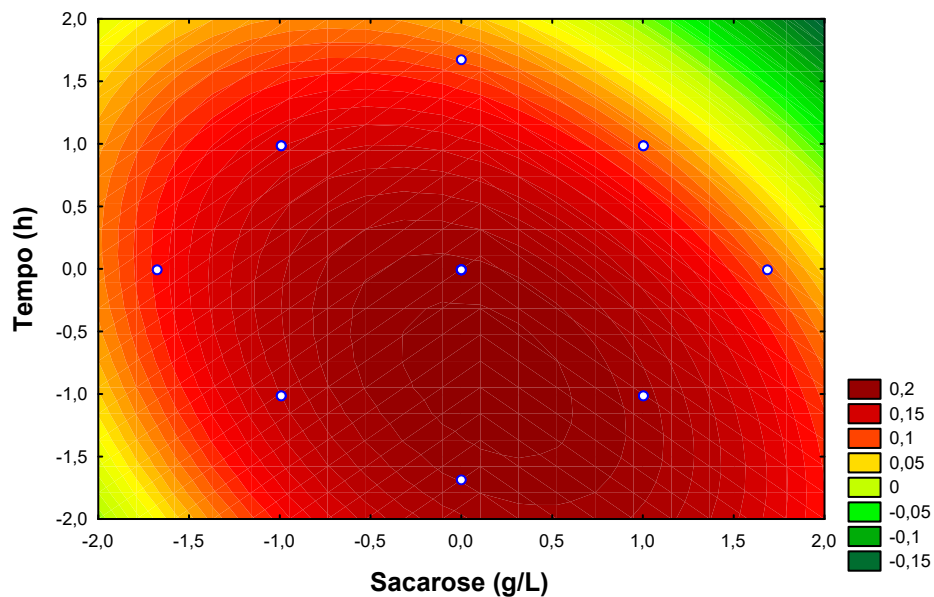


Figura 3 – Gráfico de contorno para produtividade de γ -PGA por *Bacillus subtilis* ATCC 6633, fixando o ácido glutâmico no nível codificado 0.

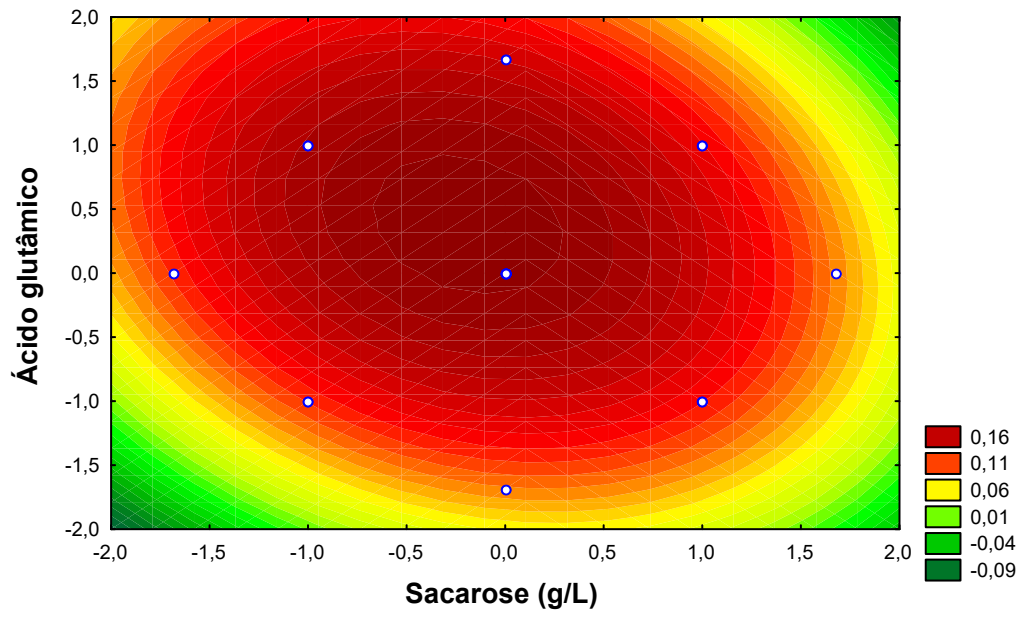


Figura 4 – Gráfico de contorno para produtividade de γ -PGA por *Bacillus subtilis* ATCC 6633, fixando o ácido glutâmico no nível codificado 0.