

ROSANE MARIA KASPARY

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO γ -POLIGLUTÂMICO EM CULTIVO
SUBMERSO EM BIORREATOR AIRLIFT A PARTIR DE BACTÉRIAS
DO GÊNERO *BACILLUS***

Sorocaba

2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

**ciências
ambientais**



unesp
Sorocaba

ROSANE MARIA KASPARY

**PRODUÇÃO DE ÁCIDO γ -POLIGLUTÂMICO EM CULTIVO
SUBMERSO EM BIORREATOR *AIRLIFT* A PARTIR DE BACTÉRIAS
DO GÊNERO *BACILLUS***

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutora em Ciências Ambientais, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental.

Orientadora: Prof^a Dr^a Valquíria de Campos

Coorientador: Prof. Dr. Márcio José Rossi

Sorocaba

2022

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

*ciências
ambientais*



unesp
Sorocaba

K19p

Kaspary, Rosane Maria

Produção de ácido gama-poliglutâmico em cultivo submerso em biorreator airlift a partir de bactérias do gênero *Bacillus* / Rosane Maria Kaspary. -- Sorocaba, 2022

112 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba

Orientadora: Valquíria de Campos

Coorientador: Marcio José Rossi

1. Biopolímero. 2. γ -PGA. 3. Biorreator airlift. 4. Fermentação. 5. Microrganismos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Produção de ácido γ -poliglutâmico em biorreator airlift obtida a partir de bactérias do gênero *Bacillus*

AUTORA: ROSANE MARIA KASPARY

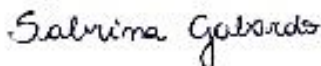
ORIENTADORA: VALQUIRIA DE CAMPOS

COORDENADOR: MÁRCIO JOSÉ ROSSI

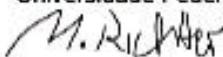
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS AMBIENTAIS, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. VALQUIRIA DE CAMPOS (Participação Virtual)
Departamento Engenharia Ambiental / Instituto de Ciência e Tecnologia Campus de Sorocaba Unesp



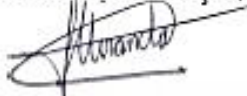
Prof. Dr. SABRINA GABARDO (Participação Virtual)
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Câmpus Araras



Prof. Dr. MARC FRANÇOIS RICHTER (Participação Virtual)
/ Universidade Estadual do Rio Grande do Sul - Hortência



Prof. Dr. BENONE OTAVIO SOUZA DE OLIVEIRA (Participação Virtual)
Instituto de Educação, Agricultura e Ambiente (IEAA) / Universidade Federal do Amazonas (UFAM)



Dr. THALES AUGUSTO DE MIRANDA MEDEIROS (Participação Virtual)
Centro de Ciências da Natureza / Universidade Federal de São Carlos - Campus Lagoa do Sino

Sorocaba, 03 de março de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus filhos Davi, Taís e Jonas, em especial ao meu marido Ivan, por todas as ausências e momentos de fraqueza, por todos os períodos de penitência forçada. Vocês fizeram tudo valer a pena.

Aos meus pais, porque sem sua base esse castelo jamais seria erguido.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba, através de seu diretor Prof. Dr. Roberto Wagner Lourenço.

À Prof^a Dr^a Valquíria de Campos, minha orientadora, pela confiança, apoio, contribuição e detalhes que, com certeza, fizeram toda a diferença para minha formação.

Ao Prof. Dr. Márcio José Rossi, meu coorientador, pela paciência, pelos ensinamentos, pelas longas horas de ajuste nos equipamentos e cálculos que foram fundamentais, para obtenção de resultados sólidos apresentados neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo recurso financeiro através de Bolsa-DS (processo nº 88882.434500/2019-1 e 1686637/2017), que muito auxiliou na execução deste projeto.

À Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Centro de Ciências Biológicas através dos docentes, pesquisadores e técnicos que atuam no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências, no laboratório de Microrganismos e Processos Biotecnológicos.

Ao Instituto Granado de Tecnologia da Poliacrilonitrila - IGTPAN e a seu presidente, M^e Nilton Pereira Alves Granado, pelo suporte no desenvolvimento desta pesquisa.

Meus agradecimentos estendem-se aos docentes e técnicos administrativos do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, no processo de formação e colaboração em todas as fases desta jornada.

À minha colega Janaína de Melo Domingos parceira de caronas e do grupo de estudos, parceira também de muitas horas difíceis desde o primeiro dia de jornada para o doutorado.

Ao meu colega André Felipe da Silva pela parceria nos estudos dos artigos e parceria nos experimentos, em especial nas madrugadas dos experimentos contínuos, meu muito obrigada.

À minha colega Renata Barros Silveira Brasil, amiga e super parceira de muitas horas e viagens, pelos compartilhamentos, pelos choros e lamentações, pelas risadas de desespero, alegrias e comemorações, por toda a vivência desses últimos anos, muito obrigada.

À Joana Camila Lopes, nossa sempre Joaninha, colega e parceira de muitas atividades, sempre disposta em me ajudar com muita organização e cuidados.

A todos os colegas do programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, em especial, ao Dr. Thales Augusto de Miranda Medeiros pelo apoio e contribuições fundamentais nos experimentos. A todos os colegas do laboratório da UFSC, que de alguma forma contribuíram para essa tese - o meu muito obrigada!

À minha família que sempre esteve presente, mesmo nos momentos em que a física nos separou, a todos os amigos que mesmo sem entender minha pesquisa sempre me motivavam a seguir em frente.

Aos meus filhos Jonas, Taís e Davi, ao meu marido Ivan Schmitt, pelo amor, carinho e atenção, por toda a ajuda em especial nos momentos em que pensei desistir.

À comunidade Católica de Aliança Jeshuá de Itatiba, pelo apoio espiritual e pelos ensinamentos de vida de todos os membros e consagrados, em especial à Célia Baptistela e Pedro Pinto e aos fundadores Gabi e Alan Reis.

Muito obrigada a todos!!!

RESUMO

A biotecnologia está numa posição privilegiada para substituir materiais poluentes e processos químicos por alternativas mais sustentáveis, como por exemplo, o ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA), um biopolímero de aplicações multifuncionais, que pode ser obtido a partir de materiais considerados subprodutos da indústria, como o farelo de soja, cascas de arroz, glicerol, entre outros compostos ricos em carbono e nitrogênio. Dessa forma, a produção de γ -PGA pode ser uma importante aliada das questões ambientais, principalmente para o tratamento de água potável, considerando que não apresenta toxicidade ao ser humano e ao ambiente. Esse biopolímero é um composto natural, solúvel em água e comestível, podendo ser utilizado em diversos tratamentos medicinais incluindo o tratamento de câncer e regeneração de tecidos. É produzido a partir de processos fermentativos por microrganismos do gênero *Bacillus*, seja por cultivo submerso, semissólido ou em estado sólido. No entanto, para que esse produto seja utilizado em formulações comerciais, é fundamental o melhoramento dos processos de produção bem como de purificação. Apesar da possibilidade de utilizar subprodutos da indústria, o elevado custo da produção de γ -PGA ainda restringe sua utilização, principalmente no tratamento de água potável, considerando os métodos tradicionais de tratamento de água utilizados atualmente. Assim, este projeto voltou-se para estudar a aplicação de um biorreator não convencional do tipo *airlift* e do modo de operação contínua para produção de γ -PGA, avaliando as grandezas de transformação (velocidade específica de crescimento, conversão de substrato em biomassa e produtividade) para duas espécies de *Bacillus*, *B. licheniformis* e *B. subtilis*, com diferentes condições nutricionais. A cinética de crescimento dos bacilos foi estudada em fermentação em batelada com o objetivo de verificar o tempo de conversão dos substratos em biomassa, além de verificar o comportamento geral dos microrganismos. Nos experimentos realizados pode-se observar um tempo de duplicação menor para *B. licheniformis*. Das fontes de nitrogênio inorgânico utilizadas nesse estudo para obtenção de γ -PGA, o composto com melhor aproveitamento no processo foi o sulfato de amônio, que é mais barato tanto em relação a outras fontes inorgânicas como também fontes orgânicas de nitrogênio. Nos experimentos conduzidos para analisar as diferentes fontes de carbono para a produção de γ -PGA observou-se em especial a importância em disponibilizar os nutrientes essenciais para produção do biopolímero, os meios suplementados com glicerol apresentaram melhores resultados ($P = 1,033 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e $Y_{P/S} = 0,266 \text{ gp.g.subs}^{-1}$), porém quando em concentrações inferiores a 40 g L^{-1} . A glicose como fonte de carbono também foi importante na produção de γ -PGA, no entanto, observou-se produção de γ -PGA em meio sem glicose, enquanto houve baixa produção quando uma concentração de glicose superior a 15 g L^{-1} foi adicionada ao meio de cultivo. A adição de 0,3% de n-heptano no início das fermentações como vetor para aumentar a solubilidade de oxigênio no meio de cultivo, foi favorável para o crescimento da biomassa, principalmente para o *B. licheniformis*, houve aumento também na produção de γ -PGA em comparação aos experimentos sem a adição do solvente orgânico. Os resultados permitiram definir uma composição apropriada para o meio de cultivo, bem como das condições de processo, de modo a obter um rendimento e produtividade maior, com menor custo de operação, considerando ainda a menor geração de resíduos. O rendimento na produção de γ -PGA foi ainda melhor no biorreator *airlift* com alimentação contínua dos nutrientes, utilizando baixas concentrações de carbono e nitrogênio. Dessa forma, a produtividade nessas condições foi de $2,31 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ com um rendimento de 0,678 (g de biopolímero/g de substrato de carbono), além de baixa produção de resíduos, atendendo com isso os conceitos de sustentabilidade, onde é possível com base em processos biotecnológicos, a obtenção de um produto com alto valor agregado a partir de subprodutos, em processo com custo reduzido e baixo impacto ambiental.

Palavras-chave: Biopolímero. γ -PGA. Biorreator *airlift*. Fermentação. Microrganismos.

ABSTRACT

Biotechnology is in a privileged position to replace polluting materials and chemical processes with more sustainable alternatives, such as gamma-polyglutamic acid (γ -PGA), a biopolymer with multifunctional applications, which can be obtained from materials considered by-products of industry, such as soybean meal, rice husks, glycerol, among other compounds rich in carbon and nitrogen. Thus, the production of γ -PGA can be an important ally of environmental issues, especially for the treatment of drinking water, considering that it does not present toxicity to humans and the environment. This biopolymer is a natural, water-soluble and edible compound, which can be used in several medicinal treatments, including the treatment of cancer and tissue regeneration. It is produced from fermentation processes by microorganisms of *Bacillus* genus, either by submerged, semi-solid or solid state cultivation. However, for this product to be used in commercial formulations, it is essential to improve production processes as well as purification. Despite the possibility of using by-products from the industry, the high cost of producing γ -PGA still restricts its use, especially in the treatment of drinking water, considering the traditional methods of water treatment currently used. Thus, this project focused on studying the application of an unconventional airlift bioreactor and continuous operation mode for the production of γ -PGA, evaluated as transformation quantities (specific growth rate, substrate-to-biomass conversion and productivity) for two *Bacillus* species, *licheniformis* and *subtilis*, with different nutritional conditions. The kinetics of growth of bacillus was studied in fermentation in batch with the objective of verifying the time of conversion of substrates into biomass, in addition to verifying the general behavior of microorganisms. In the experiments carried out, it was possible to observe a shorter doubling time for *B. licheniformis*. Of the inorganic nitrogen sources used in this study to obtain γ -PGA, the compound with the best use in the process was ammonium sulfate, which is cheaper compared to other inorganic sources as well as organic sources of nitrogen. In the experiments conducted to analyze the different carbon sources for the production of γ -PGA, the importance of making essential nutrients available for the production of the biopolymer was observed, the medium supplemented with glycerol showed better results ($P = 1.033 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ and $Y_{P/S} = 0.266 \text{ g}_P \text{ g}_{\text{subs}}^{-1}$), but when in concentrations below 40 g L^{-1} . Glucose as a carbon source was also important in the production of γ -PGA, however, γ -PGA production was observed in a medium without glucose, while there was low production when a glucose concentration greater than 15 g L^{-1} was added to the medium. cultivation medium. The addition of 0.3% of n-heptane at the beginning of the fermentations as a vector to increase the solubility of oxygen in the culture medium was favorable for the growth of biomass, especially for *B. licheniformis*, there was also an increase in the production of γ -PGA compared to experiments without the addition of organic solvent. The results made it possible to define an appropriate composition for the culture medium, as well as the process conditions, in order to obtain a higher yield and productivity, with lower operating costs, considering the lower generation of waste. The yield in the production of γ -PGA was even better in the airlift bioreactor with continuous feeding of nutrients, using Low concentrations of carbon and nitrogen. Thus, the productivity under these conditions was $2.31 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ with a yield of 0.678 (g of biopolymer/g of carbon substrate), in addition to low waste production, thus meeting the concepts of sustainability, where it is possible, based on biotechnological processes, to obtain a product with high added value from by-products, in a process with reduced cost and low environmental impact.

Key words: Biopolymer. Airlift bioreactor. Fermentation. Microorganisms. Continuous feeding.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química molecular do ácido γ -poliglutâmico	25
Figura 2 – Secreção do γ -PGA durante a biossíntese de <i>Bacillus subtilis</i>	29
Figura 3 – Representação dos genes responsáveis pela codificação na síntese de γ -PGA em <i>Bacillus spp</i>	30
Figura 4 – Rotas metabólicas de síntese γ -PGA.....	33
Figura 5 – Classificação dos tipos de biorreatores para FES	37
Figura 6 – Classificação dos modelos de biorreatores propostos para cultivo submerso....	38
Figura 7 – Modelos de biorreatores <i>airlift</i>	41
Figura 8 – Biorreator <i>airlift</i> de bancada: circulação interna (a) e externa (b).....	41
Figura 9 – Diagrama esquemático do biorreator <i>airlift</i> utilizado neste estudo	59
Figura 10 – Crescimento dos microrganismos isolados em placa, (a) <i>Bacillus licheniformis</i> ; (b) <i>Bacillus subtilis</i>	60
Figura 11 – Coloração de Gram: (a) <i>Bacillus licheniformis</i> ; (b) <i>Bacillus subtilis</i>	60
Figura 12 – Produção de biomassa e variação de pH dos microrganismos cultivados em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm.....	61
Figura 13 – Determinação da velocidade específica de crescimento do <i>Bacillus licheniformis</i> (a) e <i>B. subtilis</i> (b). O eixo das abcissas é o tempo (h) e no eixo das ordenadas são os valores de $\ln(x)$. O valor do coeficiente linear da equação de ajuste representa o valor da velocidade específica de crescimento (h^{-1})	62
Figura 14 – Produção de γ -PGA com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio no cultivo de <i>Bacillus licheniformis</i> (a), <i>B. subtilis</i> (b) em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm	63
Figura 15 – Produção de γ -PGA com cloreto de amônio como fonte de nitrogênio no cultivo de <i>Bacillus licheniformis</i> (a), <i>B. subtilis</i> (b) em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm	63
Figura 16 – Produção de γ -PGA com nitrato de amônio como fonte de nitrogênio no cultivo de <i>Bacillus licheniformis</i> (a) e <i>B. subtilis</i> (b) em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm.....	64
Figura 17 – Produção de γ -PGA com diferentes fontes de nitrogênio em cultivo com <i>Bacillus licheniformis</i> e <i>B. subtilis</i> em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm.....	64

Figura 18 – Crescimento celular e variação do pH com diferentes fontes de nitrogênio em cultivo com <i>B. licheniformis</i> e <i>B. subtilis</i> , frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm .	66
Figura 19 – Crescimento celular em função do tempo de cultivo de <i>B. licheniformis</i> e <i>B. subtilis</i> em meio basal com diferentes tratamentos de nutrientes de carbono.....	67
Figura 20 – Análise do pH em função do tempo de cultivo de <i>B. licheniformis</i> e <i>B. subtilis</i> em meio basal com diferentes tratamentos de nutrientes de carbono	68
Figura 21 – Concentração de glicose em função do tempo de cultivo de <i>B. licheniformis</i> e <i>B. subtilis</i> em meio basal com diferentes tratamentos de nutrientes de carbono.....	69
Figura 22 – Concentração de glicerol em função do tempo de cultivo de <i>B. licheniformis</i> e <i>B. subtilis</i> em meio basal com diferentes tratamentos de nutrientes de carbono.....	70
Figura 23 – Produção de γ -PGA em função do tempo de cultivo com <i>B. licheniformis</i> e <i>B. subtilis</i> em meio basal com diferentes tratamentos de nutrientes de carbono.....	71
Figura 24 – Experimento 1: produção de γ -PGA <i>versus</i> crescimento de biomassa (a), produção de γ -PGA <i>versus</i> consumo de nutrientes de carbono (b) em cultivo com <i>B. licheniformis</i> em biorreator <i>airlift</i>	74
Figura 25 – Experimento 1: produção de γ -PGA <i>versus</i> O ₂ dissolvido em cultivo com <i>B. licheniformis</i> em biorreator <i>airlift</i>	75
Figura 26 – Experimento 2: produção de γ -PGA <i>versus</i> crescimento de biomassa (a), produção de γ -PGA <i>versus</i> consumo de nutrientes de carbono (b) em cultivo com <i>B. licheniformis</i> em biorreator <i>airlift</i>	76
Figura 27 – Experimento 2: produção de γ -PGA <i>versus</i> O ₂ dissolvido em cultivo com <i>Bacillus licheniformis</i> em biorreator <i>airlift</i>	77
Figura 28 – Experimento 3: produção de γ -PGA <i>versus</i> a variação do crescimento de biomassa, etapa inicial batelada (a), etapa alimentação contínua (b), em cultivo com <i>B. licheniformis</i> em biorreator <i>airlift</i>	78
Figura 29 – Experimento 3: produção de γ -PGA <i>versus</i> percentual de saturação de O ₂ e variação do pH, etapa inicial batelada (a), etapa alimentação contínua (b), em cultivo com <i>B. licheniformis</i> em biorreator <i>airlift</i>	79
Figura 30 – Experimento 3: produção de γ -PGA <i>versus</i> o consumo de nutrientes de carbono, etapa inicial batelada (a), etapa alimentação contínua (b), em cultivo com <i>B. licheniformis</i> em biorreator <i>airlift</i>	80
Figura 31 – Experimento 4: produção de γ -PGA <i>versus</i> percentual de O ₂ dissolvido em relação à saturação e variação do pH na etapa inicial de batelada (a). Etapa de alimentação	

contínua (b). Variação do crescimento na etapa inicial batelada (c). Etapa alimentação contínua (d), em cultivo com <i>B. licheniformis</i> em biorreator <i>airlift</i>	82
Figura 32 – Experimento 4: produção de γ -PGA versus o consumo de nutrientes de carbono, etapa inicial batelada (a), etapa alimentação contínua (b), em cultivo com <i>B. licheniformis</i> em biorreator <i>airlift</i>	84
Figura 33 – Experimento 4: Alteração da coloração no meio de cultivo com <i>B. licheniformis</i> em biorreator <i>airlift</i> . Tempo de fermentação, (a) 39 horas; (b) 19 horas; (c) 25 horas. Tubos, amostras de 40 a 16 horas.....	84
Figura 34 – Produção de γ -PGA em biorreator <i>airlift</i> , sistema em funcionamento com coloração amarelo claro, sem formação excessiva de espuma.....	85
Figura 35 – Espectro infravermelho do padrão de γ -PGA seco após precipitação com etanol PA.....	87
Figura 36 – Espectro infravermelho de amostra de γ -PGA seca após precipitação com etanol PA.....	88

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1 – Aplicações do γ -PGA em diversos setores da economia.....	23
Tabela 2 – Composição dos meios de cultivo com adição de n-Heptano	56
Tabela 3 – Resultados dos experimentos em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm, em fermentação com <i>B. subtilis</i> em meios com diferentes fontes de carbono	72
Tabela 4 – Resultados dos experimentos em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm, em fermentação com <i>B. licheniformis</i> em meios com diferentes fontes de carbono.....	72
Tabela 5 – Análise dos grupos funcionais para γ -PGA em FTIR.....	87
Tabela 6 – Principais resultados de produção de γ -PGA com <i>Bacillus subtilis</i> deste estudo e de pesquisas publicadas	89
Tabela 7 – Principais resultados de produção de γ -PGA com <i>B. licheniformis</i> deste estudo e de pesquisas publicadas	90
Tabela 8 – Crescimento dos microrganismos em frascos Erlenmeyer com agitação em mesa agitadora a 200 rpm – meio BHI (Figura 14)	102
Tabela 9 – Produção de γ -PGA com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (Figuras 14 a 18)	103
Tabela 10 – Produção de γ -PGA com cloreto de amônio como fonte de nitrogênio ((Figuras 14 a 18)	103
Tabela 11 – Produção de γ -PGA com nitrato de amônio como fonte de nitrogênio (Figuras 14 a 18)	103
Tabela 12 – Crescimento da biomassa em meio Basal e adição substratos ricos em carbono (Figuras 19 a 23).....	104
Tabela 13 – Produção de γ -PGA em meio Basal e adição substratos ricos em carbono (Figuras 19 a 23).....	104
Tabela 14 – Variação do pH em meio Basal com adição substratos ricos em carbono (Figuras 19 a 23)	104
Tabela 15 – Residual de glicerol em meio Basal com adição substratos ricos em carbono (Figuras 19 a 23).....	105
Tabela 16 – Residual de glicose em meio Basal com adição substratos ricos em carbono (Figuras 19 a 23).....	105
Tabela 17 – Experimento 1 – Resumo dos ensaios, Biorreator <i>airlift</i> (Figuras 24 e 25) .	107
Tabela 18 – Experimento 2 – Resumo dos ensaios, Biorreator <i>airlift</i> (Figuras 26 e 27) .	108

Tabela 19 – Experimento 3 – Resumo dos ensaios, Biorreator *airlift* (Figuras 28 e 32) . 109

Tabela 20 – Experimento 4 – Resumo dos ensaios, Biorreator *airlift* (Figuras 28 e 32) . 110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TCA	<i>Tricarboxylic acid</i> (ciclo de Krebs)
ATP	Adenosina trifosfato
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
C/N	Relação definida entre as fontes de glicose e as fontes de nitrogênio
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
DO	Densidade óptica
DHAP	Fosfato de dihidroxiacetona
FES	Fermentação em estado sólido
FTIR	Infravermelho com Transformada de Fourier
GOD	Enzima glicose-oxidase
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
LB	Luria Bertani
mg	Miligrama
MO	Microrganismo
PAC	Policloreto de alumínio
PAM	Poliacrilamida anfotérica
T	Tempo
UV	Ultravioleta
γ-PGA	Ácido gama-poliglutâmico
vvm	Volume de ar por volume de meio de cultura por minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo Geral	22
2.2	Objetivos específicos.....	22
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	23
3.1	Ácido γ -poliglutâmico	23
3.2	Características de <i>Bacillus subtilis</i> e <i>B. licheniformis</i> produtores de γ -PGA.....	26
3.3	Substratos para produção de γ -PGA.....	30
3.3.1	Fontes de carbono.....	31
3.3.2	Fontes de nitrogênio	33
3.4	Biorreatores	34
3.4.1	Fermentação no estado sólido	36
3.4.2	Biorreatores para fermentação submersa.....	37
3.4.3	Biorreatores <i>airlift</i>	40
3.4.3.1	Condução de processo em fermentação submersa	42
3.5	Determinação das grandezas de transformação.....	43
3.5.1	Velocidade específica de crescimento.....	43
3.5.2	Conversão de substrato em produto	44
3.5.3	Produtividade.....	45
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1	Microrganismos utilizados	48
4.1.1	Controle de qualidade das culturas.....	48
4.1.2	Pré-inóculo de cultivo dos <i>Bacillus</i>	48
4.2	Meios de cultivo	49
4.3	Métodos analíticos.....	50
4.3.1	Preparação curva com padrão γ -PGA.....	51
4.3.2	Variáveis analisadas	51
4.4	Determinação das grandezas de transformação.....	53
4.4.1	Velocidade específica de crescimento.....	53
4.4.2	Conversão de substrato em produto	53
4.4.3	Produtividade.....	54
4.5	Estudos preliminares	54

4.5.1	Cinética de crescimento dos microrganismos	54
4.5.2	Produção de γ -PGA com diferentes fontes de nitrogênio.....	54
4.5.3	Produção de γ -PGA em diferentes fontes de carbono	55
4.5.3.1	Meio Basal com adição de fontes de carbono e n-heptano.....	55
4.6	Produção de γ -PGA em biorreator <i>airlift</i>	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1	Estudos preliminares em frascos agitados	60
5.1.1	Purificação dos isolados bacterianos	60
5.1.2	Avaliação do crescimento dos microrganismos	61
5.1.3	Avaliação da produção de γ -PGA em diferentes fontes de nitrogênio.....	62
5.1.4	Avaliação da produção de γ -PGA com diferentes fontes de carbono	66
5.1.4.1	Produção de γ -PGA em meio basal com adição de substratos ricos em carbono e n-heptano....	66
5.2	Experimentos em biorreator <i>airlift</i>	73
5.2.1	Produção de γ -PGA com controles de pH e oxigênio dissolvido.....	73
5.2.2	Produção de γ -PGA em batelada repetida suplementada com adições pontuais de glicose, glicerol e indutores do gene <i>pgsE</i>	75
5.2.3	Produção de γ -PGA em fermentação com alimentação contínua de meio de cultura..	77
5.3	Análise de infravermelho com transformada de Fourier	86
6	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	93
	APÊNDICE A	102
	APÊNDICE B	112

1 INTRODUÇÃO

Um dos temas muito discutidos mundialmente, desde séculos passados e especialmente nos dias atuais, é a sustentabilidade. Esse tema é um assombro para muitos, alento para outros e oportunidade para poucos, pois a sua definição é clara no sentido de uso e preservação do ambiente. Contudo, o uso sustentável de materiais que são considerados poluentes e sem valor comercial, ganha um novo status por intermédio da biotecnologia.

Nesse sentido, a biotecnologia tem sido uma importante aliada de maneira geral em pesquisas e aplicações em diversas áreas, seja na indústria, agricultura, saúde e meio ambiente. Além de não se restringir a apenas uma área, sua aplicação pode também beneficiar por não gerar subprodutos ou intermediários indesejados significativos.

Diversos processos biotecnológicos são utilizados para a produção de biopolímeros, os quais são obtidos pela biossíntese de microrganismos, como no caso a produção do ácido gama-poliglutâmico. Sua formação se dá a partir de microrganismos como aqueles do gênero *Bacillus*, que secretam o biopolímero no meio onde é cultivado, com nutrientes como carbono e nitrogênio.

O ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA; *gamma polyglutamic acid*) é um biopolímero aniônico, biodegradável, solúvel em água e não apresenta toxicidade ao ser humano e ao ambiente. Destaca-se em diversos setores da economia, entre eles indústria de fármacos, cosméticos, alimentos e no tratamento de água potável, sendo esse último, usado como adsorvente de metais e biofloculante (CHANG et al., 2013; CAMPOS, 2016).

O γ -PGA é também um componente da cozinha asiática, conhecido como *natto*, nome comercial do fermentado de grãos de soja cozido com a palha do arroz, onde a bactéria *Bacillus subtilis* está naturalmente presente. O *natto* apresenta uma consistência bastante viscosa e é muito apreciado em países como Japão, China, Tailândia, dentre outros, por apresentar ainda propriedades antibióticas, favorecer a produção no organismo da vitamina K solúvel em água. Salienta-se, também, para as propriedades do *Bacillus subtilis* presentes no *natto*, pois contribuem na eliminação de bactérias patogênicas do intestino, além de outras contribuições indiretas como a redução da pressão arterial e anticarcinogênica (LEE et al, 2015; HWAN et al., 2012; PARK et al., 2021).

A aplicação do γ -PGA é de notável abrangência, principalmente quando consideramos os diferentes usos em humanos, como antitumoral, pela propriedade imunoestimuladora, entre outras aplicações na área da saúde, como também em hidrogéis para aplicação estética,

aproveitando sua alta capacidade de absorção de água, contribuindo para uma prolongada hidratação da pele. Tork et al. (2015) destacam outras funções do biopolímero, como agente de ligação a metais traço e radionuclídeos, crioprotetor, espessante, dispersante e imobilizador de enzimas.

O γ -PGA vem sendo estudado também como uma alternativa para a biofloculação de açúcar, nos processos industriais onde a poliacrilamida anfotérica (PAM) é utilizada na cana-de-açúcar como floculante químico (YAN et al., 2015). Goto e Kunioka (1992) e Kunioka (2004) relatam também a atividade do biopolímero como agente coagulante a partir da modificação da molécula. Em seus experimentos o produto foi sintetizado por reagentes indutores de ligações cruzadas ou radiação gama (OPPERMANN-SANIO; STEINBÜCHEL, 2002).

Na área ambiental, o γ -PGA se destaca pelo uso em substituição aos compostos químicos normalmente utilizados no tratamento de água potável. A partir das modificações pela radiação gama e adicionado ao policloreto de alumínio (PAC), pode formar um hidrogel capaz de remover substâncias coloidais, além de ser eficiente também na remoção de substâncias orgânicas e inorgânicas. No entanto, o custo para obtenção de γ -PGA ainda é altíssimo, esse custo obviamente torna o valor de comercialização extremamente elevado, tornando-o um produto inviável para uso no tratamento de água. O Produto é comercializado na forma sódica, com 30% de pureza ao custo aproximado de US\$ 32,00/Kg, no entanto com 90% de pureza pode ser adquirido ao custo de US\$ 620,00/Kg, enquanto o γ -PGA com mais de 90% de pureza chega a US\$ 1.200,00/Kg. O biopolímero tem sua maior produção na Ásia, em especial na China, e é comercializado também na União Europeia e Reino Unido.

O γ -PGA é normalmente comercializado em sua forma sódica, e o valor é definido pelo seu grau de pureza e também pela densidade de sua massa molecular, o biopolímero é formado por agrupamentos de sua estrutura molecular básica, um composto com maior grupamento pode ser utilizado na medicina e também na indústria de cosméticos. Um composto com grupamentos menores normalmente é utilizado para o tratamento de água ou na indústria alimentícia. Ainda assim, o valor pode chegar até mais de mil dólares por quilo. Esse é um dos fatores que justificam as pesquisas de melhoramento na produção para obtenção de γ -PGA com custo de processo reduzido, além do uso de matérias primas de baixo valor comercial, como por exemplo resíduos de soja, cascas de arroz, subprodutos de óleo biodiesel, entre outros resíduos.

A biossíntese de γ -PGA em cultivo no estado sólido (FES), utilizando *Bacillus subtilis*, pode ocorrer com substrato em grãos de soja semi-submerso em caldo nutritivo, ou ainda outros

subprodutos como cascas e farelos (GOTO e KUNIOKA, 1992; CAMPOS et al., 2020). Contudo, apesar do alto potencial de produção do γ -PGA por FES, a literatura relata bons resultados em condições de cultivo submerso, a partir de hidrolisados de subprodutos ricos em carboidratos, ou ainda outras fontes de carbono de baixo valor. Bajaj e Singhal (2011) apresentam uma revisão desse tema, com diversos experimentos utilizando substratos precursores para as vias do biopolímero, adição de sais como cofatores enzimáticos, além de micronutrientes. Os estudos visam indicar principalmente os melhores nutrientes para as diferentes linhagens de *Bacillus*. Assim, com base nas necessidades nutricionais, os microrganismos que sintetizam o γ -PGA podem ser classificados em dois grupos, os dependentes do ácido glutâmico e os independentes do ácido glutâmico (KONGKLOM et al., 2015).

Os *Bacillus* produtores de γ -PGA, também são largamente empregados na indústria para produção de enzimas (REIS et al., 2005). O seu uso na agricultura também tem destaque principalmente para formulação de bioinseticidas, em aditivos para plantas, desde o fortalecimento das sementes para que se desenvolvam sem a adição de suplementos químicos, como também na aplicação direta no solo especialmente em plantas frutíferas e cerealíferas.

Tão importante quanto à escolha dos microrganismos, dos substratos e demais nutrientes, são os métodos e condições de processo em biorreatores. Assim, um biorreator deve atender de forma consistente às necessidades de crescimento dos microrganismos e consequentemente a produção de γ -PGA. Um biorreator equipado com controles básicos de temperatura, pH, vazão de ar ou agitação mecânica, ou ainda outros parâmetros específicos de cada processo, pode favorecer a ativação e/ou inibição do crescimento, forçando condições de estresse para estimular certas vias e secretar produtos desejados, entre outras atividades fundamentais no cultivo.

Embora o termo fermentação possa ter um significado bioquímico específico em relação a uma forma de metabolismo energético independente de oxigênio, neste trabalho utilizaremos o termo fermentação de modo genérico, como utilizado pelos microbiologistas industriais. Assim, neste estudo o termo fermentação se refere também a cultivos onde ocorre a respiração aeróbia.

Para fins comerciais, a produção de γ -PGA é atualmente realizada em biorreatores de tanque agitado mecanicamente. Os biorreatores utilizados são de aço inox com capacidade em média de 250 a 500 L. Vale destacar que existem inúmeros modelos de biorreatores que podem ser utilizados para produzir γ -PGA, desde fermentadores com substratos semissólidos à fermentadores com meios líquidos.

Contudo, ressalta-se a necessidade de controles básicos para melhor desenvolvimento dos microrganismos, tais como temperatura, agitação e/ou aeração com controle do oxigênio dissolvido, controle do pH com adição de soluções ácidas ou básicas. Quando se trata de processos alimentados, é preciso um bom controle das vazões, tanto nas bateladas alimentadas, quanto nos processos contínuos, entre outros parâmetros que possam contribuir para melhor rendimento de processo.

Num biorreator como o *airlift*, o processo ocorre através da injeção forçada de ar promovendo a recirculação do meio líquido. Essa recirculação promove também turbulência e mistura, contribuindo significativamente para a transferência de massa no sistema. A maior distância percorrida pelas bolhas de gás ao atravessar o sistema sem a inconveniente agitação de turbinas favorece uma boa transferência de oxigênio sem comprometer a integridade das células, devido à menor tensão de cisalhamento já que a agitação é pneumática e não mecânica.

Outras vantagens desse sistema são o seu funcionamento simples, a circulação pode ser interna ou externa e o investimento inicial é relativamente baixo além de fácil instalação e operação, pois não há necessidade de agitação mecanizada (ROSSI, 2016).

Um processo conduzido por biorreator *airlift* para a obtenção de γ -PGA pode fornecer dados importantes para a melhoria do processo produtivo, esses dados podem ser desde alterações visuais como cor, turbidez, viscosidade, como também a partir de análises, tais como pH, consumo de oxigênio dissolvido, consumo de substratos, produção de enzimas, etc.

A partir dessas informações é possível verificar as diferentes vias metabólicas dos microrganismos envolvidos e por consequência buscar melhorar a produtividade na obtenção de um biopolímero com alta massa molecular, como também melhorar o processo, com redução de custos, tempo e produção de intermediários indesejáveis. O γ -PGA torna o meio mais viscoso, porém em biorreator *airlift* com circulação externa é possível trabalhar com velocidades de circulação maiores, o que contribui para um meio menos viscoso.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a produtividade de γ -PGA a partir de bactérias do gênero *Bacillus* utilizando cultivo submerso, aprimorando os parâmetros em biorreator tipo *airlift* operado em modo contínuo.

2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar a espécie com maior rendimento de γ -PGA em cultivo submerso, dentre as espécies *B. licheniformis* e *B. subtilis*;
- b) Estabelecer concentrações adequadas de substratos precursores de γ -PGA, tais como o glicerol e a glicose;
- c) Verificar o rendimento de γ -PGA com adição de diferentes fontes de nitrogênio, tais como cloreto de amônio, nitrato de amônio e sulfato de amônio;
- d) Estudar o efeito do oxigênio dissolvido na produção de γ -PGA em biorreator *airlift* de modo a adequar sua concentração para o processo contínuo;
- e) Avaliar o rendimento na produção de γ -PGA a partir do cultivo em modo contínuo em biorreator *airlift*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Ácido γ -poliglutâmico

O ácido poliglutâmico (γ -PGA) foi, primeiramente, detectado por Ivánovics e Bruckner em *Bacillus anthracis* em 1935, enquanto os autores pesquisavam o comportamento patogênico do bacilo, este produziu um composto extracelular com características semelhantes aos polipeptídeos, no entanto com algumas particularidades, constatando ainda que o γ -PGA não era encontrado naturalmente no ambiente, o estudo foi primeiramente publicado em 1937 (IVÁNOVICS, BRUCKER; 1937).

Segundo Bajaj e Singhal (2011), na biossíntese da formação do ácido poliglutâmico (γ -PGA), detectado por Ivánovics e Bruckner em *Bacillus anthracis*, independente do meio de cultura ou do processo de cultivo, ocorre em duas etapas, na primeira etapa os precursores do γ -PGA, o ácido L-glutâmico e o D-glutâmico, são sintetizados, enquanto na segunda etapa os ácidos são unidos para a formação de um único composto.

Os estudos conduzidos por Bajaj e Singhal (2011) apontam ainda a existência de três poli-aminoácidos diferentes presentes na natureza: ácido- γ -poliglutâmico (γ -PGA), ϵ -polilisina (ϵ -PL) e cianoficina, sendo que no γ -PGA as ligações amidas são formadas entre o grupo α -amino e o grupo γ -carboxilo na estrutura do polímero. Essa característica do biopolímero faz com que seja resistente às proteases – processo de quebra das ligações peptídicas. Outra propriedade importante do γ -PGA, por ser um composto bioquímico, é a capacidade de desempenhar diferentes funções conforme o ambiente, em solo ou meio aquoso por exemplo, e também o organismo de reação, sendo aplicado como sequestrante de íons, floculante, carreador de fármacos, entre outros (CANDELA, FOUET, 2006; BAJAJ, SINGHAL, 2011; BUESCHER, MARGARITIS, 2007). Na Tabela 1 tem-se algumas das aplicações do biopolímero, que justificam as pesquisas para a ampliação de sua produção.

Tabela 1 – Aplicações do γ -PGA em diversos setores da economia

Aplicação	Tipo de Produto	Atividade bioquímica
Indústria alimentícia	Suplemento alimentar	Promove absorção de minerais biodisponíveis, como o cálcio.

Aplicação	Tipo de Produto	Atividade bioquímica
	Agente redutor de óleo	Reduz a absorção de óleo durante a fritura em gordura.
	Biofloculante	Biofloculante no processo de refinaria de açúcar a partir da cana-de-açúcar
	Crioprotetor	O γ -PGA pode atuar como anticongelante mais forte, quando comparado a glicose.
Medicina	Quelação de metais	Auxilia na remoção de metais pesados e radionuclídeos
	Carreamento e transporte de fármacos	Melhoramento de anticancerígenos e na medicina de nanopartículas.
	Adesivo biológico	Substitutos de fibrina, com melhor adesão pulmonar e vedação de escape de ar.
	Biopolímero floculante	Substituição de floculantes sintetizados derivados de petróleo, como a poliacrilamida.
Outras aplicações	Hidratante	Melhoria na qualidade da pele e dos cabelos.
	Atividade antibacteriana	Seus derivados têm atividade antibacteriana contra <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>E. coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>

Fonte: adaptado de Luo et al., (2016).

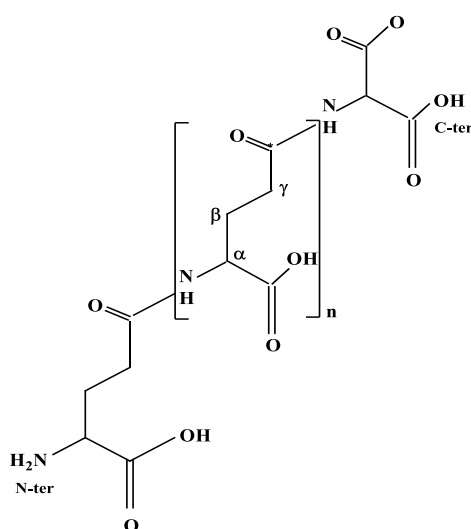
Formado por uma ou duas das formas enantioméricas (D- e L-) do ácido glutâmico, o γ -PGA além de ser solúvel, possui capacidade de sequestrar moléculas de água. É constituído por ligações do tipo γ -amina, ao contrário das proteínas, que são constituídas de ligações peptídicas (α -amina), por este motivo, o biopolímero (γ -PGA) apresenta resistência contra a ação de proteases, as quais seriam capazes de clivar (quebrar) as ligações α -amina (CANDELA, FOUET, 2006). A Figura 1 apresenta a estrutura química do γ -PGA.

O γ -PGA também apresenta variações em sua massa molecular, além de sua estrutura espacial, essa variação está relacionada às condições de processo e meios de cultivo para a obtenção do biopolímero, podendo variar de 100.000 a 1.000.000 (KUNIOLA, 2004; ZHAO et al., 2013). Para Zimmer et al. (2012), quanto maior a massa molecular do biopolímero, maior é seu potencial para uso em fármacos, pois este pode ser utilizado como carreador de drogas contra câncer, aumentar a absorção de cálcio pelo organismo, entre outros usos terapêuticos.

Um fator limitante para a obtenção do γ -PGA nos processos fermentativos é o aumento da viscosidade, principalmente em meio líquido, nesse sentido, um biorreator para a fermentação

em estado sólido (FES) poderia ser uma alternativa mais adequada de processo. Contudo, segundo Silva (2010) as pesquisas publicadas sobre a produção de γ -PGA em cultivo submerso são mais expressivas com relação à FES, pois essa última tem dificuldade para controle dos parâmetros básicos de processo, considerando a dificuldade em analisar em tempo real o oxigênio dissolvido no meio, fundamental em processos aeróbios, além da temperatura e pH.

Figura 1 – Estrutura química molecular do ácido γ -poliglutâmico



Fonte: CANDELA e FOUET (2006).

Para Zhan et al. (2017), a fermentação com *Bacillus licheniformis* em meio líquido pode ser uma via segura para a obtenção de γ -PGA. Em sua pesquisa foi utilizado o glicerol como substrato, pois além da eficiência e qualidade do γ -PGA produzido, o glicerol é considerado um subproduto da indústria do biodiesel (DOBSON et al., 2012). Pelo alto custo em refinar esse derivado do biodiesel, o glicerol comercializado pode ser uma fonte barata de nutrientes, além de contribuir com a indústria de biodiesel no uso do resíduo.

Du et al. (2005) relataram que o glicerol pode afetar a biossíntese de fosfolipídios da membrana celular e seus ácidos graxos éster-ligados, o que resulta em melhor permeabilidade da membrana para a secreção de γ -PGA. O glicerol é também responsável, segundo Bajaj e Singhal (2011), pela redução do comprimento da cadeia de γ -PGA, diminuindo a viscosidade do caldo no cultivo, permitindo aumentar a absorção dos substratos. Como resultado, uma qualidade superior de γ -PGA é produzido, em função da maior regulação do peso molecular. No entanto, Zhan et al. (2017) salientam que a fermentação envolvendo glicerol e

B. licheniformis ainda requer maior investigação, pois essa via ainda não é totalmente conhecida. Por isso, é importante elucidar os caminhos metabólicos para melhorar a produção de γ -PGA utilizando glicerol como substrato.

A qualidade do γ -PGA produzido a partir de *Bacillus*, ainda está relacionada à dependência de algumas espécies por ácido L-glutâmico, além de fontes adicionais de carbono e nitrogênio, bem como condições do processo, como a interferência de força iônica, pH, aeração e agitação (BAJAJ; SINGHAL, 2011). Dessa forma, a literatura sugere a adição de ácido L-glutâmico como um precursor importante, considerando sua necessidade para a produção de γ -PGA. No entanto, sugere-se também, o uso moderado em função do seu alto custo relativo (DU et al., 2005).

3.2 Características de *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* produtores de γ -PGA

As pesquisas na área da biotecnologia contribuem não somente para a descoberta de novos microrganismos, mas também para o melhoramento desses, os quais podem ser amplamente empregados na elaboração de medicamentos, aditivos, transportadores de fármacos, como coadjuvantes no tratamento das questões ambientais, entre outros usos.

Nesse alinhamento, tem-se os microrganismos do gênero *Bacillus* que se destacam pela ampla disposição na natureza, particularmente no solo, podendo ser encontrado em áreas arenosas ou alagadas e ainda na microbiota intestinal, seja de humanos ou animais (SALES, 2011). Melo (2021), também destaca a disponibilidade dos *Bacillus* em diferentes habitats, com destaque para as áreas mais comuns como água e solo. Reforçando o seu emprego em processos industriais na produção de enzimas, antibióticos e também biopolímeros, pois são capazes de secretar a maioria das suas enzimas no meio de cultura.

Uma das razões por essa vasta disponibilidade pode ser justificada pela sua fonte nutricional, também amplamente disponível na natureza, considerando compostos simples de carbono e nitrogênio, além de possuírem um tempo de duplicação reduzido quando comparados aos outros microrganismos.

Muitas linhagens de *Bacillus* são utilizadas por serem industrialmente seguras (GRAS), embora existam pesquisas que apontam linhagens de *B. licheniformis* e *B. subtilis* resistentes em condições extremas de temperatura, pH, secagem, incluindo tratamento de pasteurização UHT e, por isso, podem ser relatadas como sendo contaminantes de alguns processos industriais na área de alimentos (PIRTTIJÄRVI et al., 2000).

Os *Bacillus licheniformis* e *B. subtilis*, objetos deste estudo, são importantes bactérias utilizadas na indústria em função da capacidade de secretar no meio de cultura grandes quantidades de enzimas, e também por serem produtoras de compostos importantes como o ácido γ -poliglutâmico (SALES, 2011). De acordo com Zhan et al. (2017), o *B. licheniformis* também tem a função de expressar aminoácidos, biocombustíveis, antibióticos, além das enzimas e metabólitos secundários. Cladera-Oliveira et al. (2004) qualificam o *B. licheniformis* como produtor de peptídeos antimicrobianos com atividade contra diversos microrganismos patogênicos ou deteriorantes. Embora os autores destaquem as variações nas características fisiológicas e bioquímicas nas espécies produtoras de metabólitos biologicamente ativos, com destaque industrial e agrícola, bem como de espécies patogênicas capazes de produzir toxinas.

Na produção do γ -PGA, o *Bacillus subtilis*, bem como o *Bacillus licheniformis*, têm o objetivo de formar uma reserva de energia e nutrientes. A síntese ocorre em condições de estresse e com funções fisiológicas distintas, pois o biopolímero além de ser fonte de nutrientes dos próprios bacilos é também um sequestrante de íons de metais (ZIMMER et al., 2012). A produção do γ -PGA ocorre como componente de cápsula do microrganismo, nessa síntese a extração é facilitada em função da solubilidade em meio aquoso (CANDELA et al., 2005).

Segundo a avaliação de Hsueh et al. (2017), o γ -PGA é sintetizado apenas no início da fase estacionária, que pode ser justificado em função da limitação ou até mesmo pela falta de nutrientes necessários para o crescimento celular (CAMPOS et al., 2021). No entanto, o biopolímero formado pode ser degradado ao final da fase estacionária, principalmente quando há escassez de substratos básicos de carbono e nitrogênio. Segundo esses os autores, tanto o peso molecular do γ -PGA como a proporção da conformação L-/D- formadora do ácido são dependentes dos microrganismos, bem como das condições de processo para o crescimento celular (HSUEH, et al., 2017).

O *Bacillus licheniformis*, por exemplo, pode produzir o biopolímero com diferentes proporções da conformação L-/D- ácido glutâmico, variando de 10 até 100%. Diferenças significativas na produção de γ -PGA foram observadas também por estudos avaliando os genes de mesma linhagem de microrganismo. Esses genes podem atuar como regulatórios na síntese e na degradação do biopolímero, bem como interferir na quantidade excretada e ainda no peso molecular final.

O γ -PGA pode ser sintetizado por diversas cepas de *Bacillus*, que podem ser divididas em dois grupos, tendo como principal diferença a necessidade ou não do seu precursor imediato o ácido L-glutâmico. Nesse sentido, os autores Jung et al. (2005) destacam que alterações genotípicas discretas podem segregar estirpes de uma mesma linhagem como dependente ou

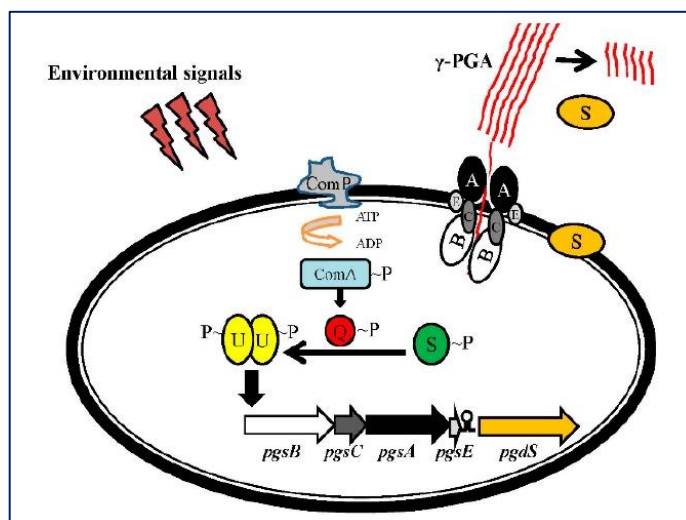
não do ácido glutâmico. Dessa forma, é possível aumentar a produção de γ -PGA pela deleção de genes específicos. Por exemplo, o estudo relatado por Jung et al. (2005), na obtenção de altas concentrações do biopolímero utilizando o isolado *Bacillus* sp. RKY3 como inóculo. Assim, segundo Shih et al. (2001) a produção do γ -PGA depende também da linhagem e das condições das cepas selecionadas, além das demais condições de processo, em especial o oxigênio dissolvido no meio de cultivo (SHIH, 2002).

Segundo Silva (2010) quando o polímero está associado à superfície do bacilo formando assim uma cápsula, o complexo enzimático correspondente será Cap (cápsula), e quando o γ -PGA é liberado extracelularmente, o complexo responsável será Pgs (poliglutamato-sintetase).

As principais etapas da biossíntese de γ -PGA abrangem a racemização, a polimerização, assim como a regulação e degradação do biopolímero. Na etapa de racemização, parte do ácido L-glutâmico é convertido à ácido D-glutâmico, enquanto na polimerização, a qual depende de adenosina trifosfato (ATP), o ácido L-glutâmico tem a função de fornecer elétrons através do grupo amino. A regulação de genes e as relações filogenéticas afetam a produção de γ -PGA, segundo Hsueh et al. (2017). Os autores destacam a secreção do biopolímero, bem como as propriedades das diferentes ramificações filogenéticas a partir de linhagens familiares.

Na etapa de regulação da biossíntese, os genes *degS* e *degU* formam um operon que codifica um sistema de dois componentes essenciais, DegS-DegU e ComP-ComA. Uma mutação nesses genes pode alterar a produção de enzimas, como também a capacidade de esporulação principalmente quando o meio é suplementado com glicose. A Figura 2 apresenta a atividade da proteína Quinase DegS sobre DegU, sendo essa fosforilada necessária na produção de enzima, atuando como repressor ou regulador da biossíntese. Enquanto a degradação do γ -PGA pode ocorrer por duas enzimas a partir da secreção dos *Bacillus endo- γ -glutamil peptidase* e *exo- γ -glutamil peptidase* (YAO et al, 2009).

Figura 2 – Secreção do γ -PGA durante a biossíntese de *Bacillus subtilis*

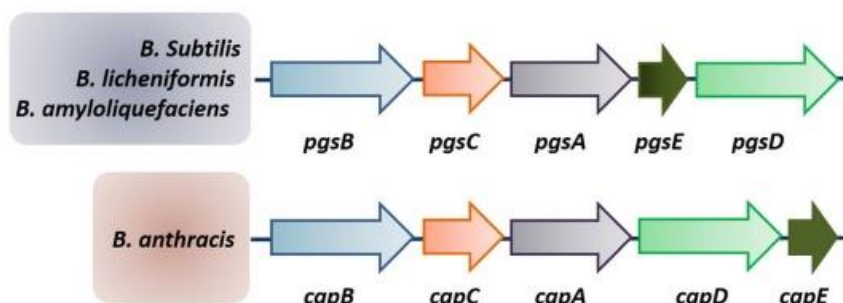


Fonte: Hsueh (2017).

O esquema da Figura 2 apresenta a produção de γ -PGA sendo regulada por quatro genes específicos durante a síntese, em destaque para *pgsB*, *pgsC*, *pPgsA* e *pgsE*, os quais foram estudados por Ashiuchi et al. (2011) e Candela et al. (2005) com *B. subtilis* e *B. anthracis*, respectivamente.

Nos estudos realizados por Ashiuchi et al. (2011) e Candela et al. (2005), a síntese de *B. subtilis* foi bloqueada pela deleção dos genes *pgsB*, *pgsC*, *pgsA*, enquanto que em *B. anthracis*, os genes, *capB*, *capC*, *capA* e *capE* apresentaram os mesmos resultados quando deletados (Figura 3). Como resultado, relataram os genes *capB/pgsB* e *capC/pgsC* responsáveis por codificar os componentes da membrana do complexo de γ -PGA sintase, enquanto *pgsA* e *pgsE* (*capA* e *capE*) contribuem no transporte de γ -PGA (ASHIUCHI, 2011; CANDELA et al., 2005; TROY, 1973).

Figura 3 – Representação dos genes responsáveis pela codificação na síntese de γ -PGA em *Bacillus spp*



Fonte: Nair et al (2021).

3.3 Substratos para produção de γ -PGA

A obtenção de γ -PGA ocorre por meio de biossíntese, onde a produção microbiana necessita de fontes de carbono e nitrogênio, nutrientes básicos para uma variedade de *Bacillus*. Seu desenvolvimento celular pode advir esse polímero como um componente capsular ou extracelular, dependendo da cepa utilizada, condicionado ainda aos parâmetros de processo e da disponibilidade das fontes de carbono e nitrogênio. Importante destacar que essa mesma variação interfere na qualidade e na massa molecular do biopolímero sintetizado (ZIMMER, 2012; KUNIOKA, 2004; BAJAJ, SINGHAL 2009).

As fontes de carbono são essenciais para o crescimento bacteriano, assim como a concentração ideal de nitrogênio. Além disso, considerando a formação de um produto com grupamentos aminas, a razão C/N adequada no meio é fundamental para um bom rendimento, sem a formação de subprodutos indesejáveis. Assim, é importante observar a concentração dos substratos no meio de cultivo durante o processo, considerando a estrutura química molecular básica do γ -PGA, a razão ideal de C/N é de 5. Em ensaios realizados por Moraes e Alegre (2014) e Jung et al. (2005) com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, a produção de γ -PGA foi limitada em meios com alta concentração de substratos de carbono.

Segundo Jung et al. (2005), a produção máxima de γ -PGA foi observada com 20 g L⁻¹ de glicerol no meio de fermentação, o meio foi também suplementado com ácido L-glutâmico na concentração de 20 g L⁻¹ e ácido cítrico, 12 g L⁻¹. Em quantidades maiores, a produção foi gradativamente reduzida. Os resultados foram similares na produção com outros substratos de

carbono, como a glicose e a frutose. O crescimento celular do *Bacillus* sp RKY3 foi igualmente limitado no meio com maior concentração de substratos de carbono.

Conforme metodologia descrita por Yoon et al. (2000), os autores obtiveram uma produção de 35 g L⁻¹ em fermentação com *Bacillus licheniformis* em biorreator de tanque agitado com batelada alimentada (volume de trabalho 2,5 L), o rendimento apresentado foi de aproximadamente 0,10 g g⁻¹. O rendimento foi reduzindo enquanto o processo foi alimentado com o meio de cultivo, os autores também relataram um aumento na viscosidade do meio.

Em estudo estatístico, Jeong et al. (2010), apresentaram uma produção de 48,7 g L⁻¹ de γ -PGA, em fermentação com *Bacillus subtilis*, em biorreator de tanque agitado (volume de trabalho 3 L), o rendimento apresentado nesse estudo foi de aproximadamente 0,628 g g⁻¹. Em ambas as pesquisas, os autores suplementaram o meio de cultivo com ácido L-glutâmico e glicerol. Assim, tem-se o glicerol como uma boa fonte de carbono para a síntese de γ -PGA, pois faz parte do ciclo de ácido tricarboxílico.

Segundo Du et al. (2005), o glicerol pode ter função de co-substrato, enquanto a adição de ácido cítrico e L-glutâmico são precursores do γ -PGA, favorecendo o crescimento do *Bacillus licheniformis* e a produção de γ -PGA. Porém, esses substratos podem contribuir para o aumento da viscosidade dificultando o crescimento celular em meio submerso, mesmo em processos com agitação e aeração, seja por oxigênio puro ou ar comprimido. O aumento da viscosidade é uma das dificuldades que a indústria encontra na produção do γ -PGA, pois por ser um processo aeróbio, a biossíntese é dependente de oxigênio e a alta viscosidade pode reduzir consideravelmente a transferência de oxigênio ao meio (KAMBOUROVA, 2001). Assim, Yoon et al. (2000) sugerem a fermentação continuada, com adição de nutrientes e reguladores ao longo do processo, pois a concentração mais baixa de nutrientes no meio favorece a produção de γ -PGA e mantém a viscosidade baixa, aumentando consideravelmente a eficiência do processo.

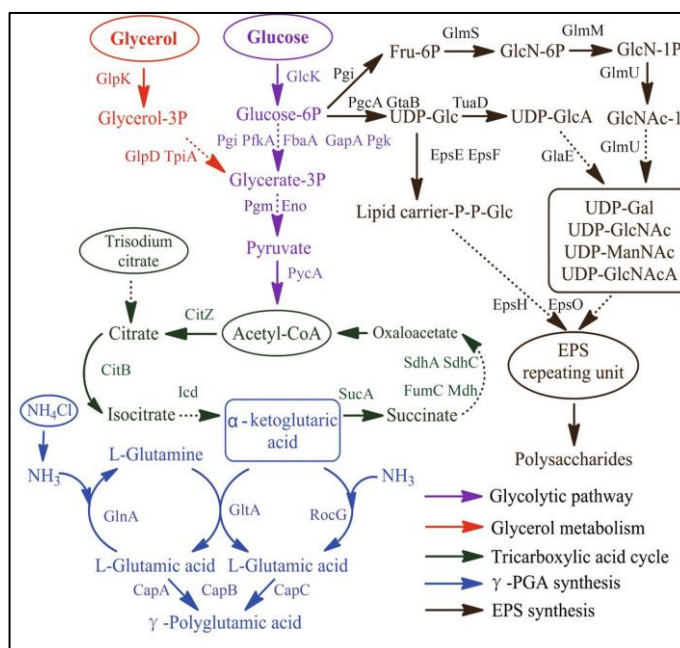
3.3.1 Fontes de carbono

Uma importante fonte de carbono utilizada em processos biológicos é a glicose, um substrato amplamente empregado não apenas nas fermentações com bactérias, mas também para fungos, leveduras e inclusive algas, além disso, sua forma fosforilada (glicose-6-fosfato) pode ser uma reserva de energia, como também seguir para processos de síntese na célula. Além

da fonte rápida de energia metabólica, tem a vantagem de ser muito solúvel em água (SCHMIDELL, 2001; KOMPALA et al, 1986).

Em pesquisa realizada por Yu et al. (2017), os substratos como a glicose e o glicerol favorecem a produção de γ -PGA para a maioria das linhagens de *Bacillus licheniformis* (KO; GROSS, 1998). No entanto, apesar da glicose contribuir para a produção de γ -PGA onde o *Bacillus licheniformis* ATCC9945a converte a glicose em α -cetoglutarato por meio da colise do glicol e do ciclo do ácido tricarboxílico, seguido pela produção de ácido glutâmico para sintetizar o γ -PGA, essa fonte de carbono também pode produzir subprodutos como diferentes polissacarídeos (GOTO e KUNIOKA, 1992), principalmente em concentrações mais elevadas de glicose, reduzindo assim a produção de γ -PGA (MSADEK et al., 1991). Yu et al. (2017) citam ainda a glicose em meio com *Bacillus subtilis* NX-2 como uma fonte de energia para o crescimento celular durante a biossíntese de γ -PGA (WU et al., 2010).

O glicerol utilizado na produção de γ -PGA, segundo Du et al. (2005), tem sido fonte de estudos porque favorece a formação do biopolímero sem aumentar o crescimento celular, desde que utilizado em concentração até 70 g L⁻¹ no meio de fermentação. O glicerol pode afetar a biossíntese de fosfolipídios da membrana celular bem como de seus ácidos graxos ligados à éster, aumentando a permeabilidade da membrana e consequente aumento da secreção de γ -PGA (ZHAN et al., 2017). A figura 4 apresenta as vias para a produção de γ -PGA a partir de glicerol e glicose, onde a glicose pode em concentrações elevadas ou por regulação de genes específicos seguir uma via diferente, com produção de outros polissacarídeos (YU et al., 2017).

Figura 4 – Rotas metabólicas de síntese γ -PGA

Fonte: adaptado de Yu et al. (2017).

O ácido cítrico também é bastante utilizado como fonte de carbono nas fermentações aeróbias, é também um dos precursores da biossíntese do biopolímero γ -PGA. Durante a esterilização do meio de cultivo, também ajuda a evitar a precipitação dos íons metálicos, funcionando como um dispersante. Jung et al. (2005), assinalam os limites de concentrações, pois do contrário perde-se o efeito benéfico, contribuindo para a redução no crescimento celular. Segundo os autores, uma concentração limitante no meio seria de 30 g L^{-1} .

Conforme já mencionado, a produção de γ -PGA pode ser uma aliada nas questões que tratam de sustentabilidade, em função de seus precursores, as fontes de carbono utilizadas nos processos industriais podem ser oriundas de resíduos, em especial o farelo de soja, casca de arroz, que são fontes proteicas ricas em carbono e nitrogênio. No entanto, independentemente do tipo de meio a ser preparado, é necessária a hidrólise do substrato para disponibilizar a fonte de carbono e nitrogênio.

3.3.2 Fontes de nitrogênio

As diferentes fontes de nitrogênio afetam diretamente os processos biotecnológicos, além do controle de pH, suas adições ou substituições a outros elementos, normalmente

utilizados em processos fermentativos, contribuem para o crescimento microbiano ou ainda o aumento da produção. Para inibir metabólitos secundários e controlar o pH utilizam-se concentrações mais elevadas de fosfatos nos meios de fermentação. No entanto, na presença de cloreto ou sulfato de amônia como fontes de nitrogênio, e os sais de ácidos fracos de nitrogênio como succinato de amônio, contribuem para o controle do pH, redução no uso de fosfatos e ainda podem ser utilizados também como fonte de nitrogênio (STANBURY, 1995).

Nos processos industriais é comum o uso fontes de nitrogênio orgânico ou inorgânico. Na produção comercial de albumina, por exemplo, pode-se utilizar a amônia para o controle de pH do meio, além de servir como fonte de nitrogênio (STANBURY, 1995). Enquanto o sulfato de amônio pode acidificar o meio a partir da utilização do íon amônio, ao contrário, nitratos podem geralmente alcalinizar o meio ao serem metabolizados. O nitrato de amônio provoca inicialmente queda no pH, enquanto o íon amônio é utilizado, reprimindo a utilização do nitrato.

Após a exaustão do íon amônio, o pH tende a aumentar com a utilização no nitrato como fonte de N (OLIVEIRA, et al., 2013). As fontes de nitrogênio orgânico a partir de aminoácidos são mais complexas e normalmente de alto custo, de modo que os obtidos de proteínas são mais utilizados na indústria, como é o caso dos hidrolisado de soja e milho, com alto valor nutritivo, rico em fontes de carbono e nitrogênio, mas de baixo custo.

Sabe-se portanto, que as fontes de nitrogênio afetam o crescimento microbiano como também a produção de γ -PGA. Assim, Tork et al. (2015) investigaram diferentes fontes de nitrogênio para a produção de γ -PGA e observaram que os compostos orgânicos como o extrato de levedura e o ácido L-glutâmico favoreceram o crescimento celular e a produção do biopolímero, no entanto, também observaram boa produção com nitrato de amônia. Outros compostos inorgânicos de nitrogênio como o cloreto e o sulfato de amônio também foram analisados em pesquisas na produção de γ -PGA (YAO et al., 2010; TANG et al., 2015). Desses se destaca o sulfato, pela facilidade de dissociação do nitrogênio, assim o elemento está mais disponível no meio para a produção do biopolímero (KUNIOKA, 1995).

3.4 Biorreatores

Os biorreatores são assim denominados em função da capacidade de transformação de substratos em produtos através de reações bioquímicas, as quais ocorrem por agentes biológicos celulares, que podem ser enzimas ou células vivas (SCHMIDELL; FACCIOITI,

2001). Os processos fermentativos que acontecem no biorreator apresentam diferentes resultados que se justificam não apenas em função dos substratos e microrganismos, mas também pela condução do processo. Com foco nas diferentes condições de processo, as indústrias demandam atualmente os principais estudos na área de bioprocessos para o desenvolvimento de tecnologias em biorreatores. O desenvolvimento atual da biotecnologia já pode fornecer condições ideais de processo através dos biorreatores, conforme a necessidade de diferentes microrganismos, com sistemas de controle das variáveis de processo e com funcionalidades específicas.

Para uma boa viabilidade de produção em biorreator, seja para biomassa, metabólitos ou enzimas, é fundamental uma operação com custo de investimento e operação baixo. Por outro lado, a segurança e confiabilidade nos processos deve ser alta, principalmente em relação as contaminações, bastante comum em processos bioquímicos. Também deve-se considerar o tipo de microrganismo a ser utilizado nos sistemas fermentativos, embora a maioria dos processos industriais seja realizado em biorreatores com tanque agitado (ROSSI, 2002).

O biorreator de tanque agitado foi o pioneiro nos processos biotecnológicos, elaborado para a fabricação de penicilina durante a segunda guerra mundial (ROSSI, 2006). Porém, o alto custo desse sistema para a indústria favoreceu as pesquisas na busca por outras opções de biorreatores e sistemas fermentativos. Embora o biorreator de tanque agitado possa ser facilmente adaptado para diferentes processos e por isso normalmente é escolhido pela indústria, pode haver limitações nos processos, como por exemplo uma maior transferência de massa gás-líquido, sendo assim uma opção mais adequada biorreatores do tipo *airlift* (ROSSI, 2002).

Apesar da variedade de biorreatores utilizados para fermentações em meio líquido: tanque agitado mecanicamente ou pneumaticamente, leito fixo, leito fluidizado, membranas planas, etc. Há uma variedade de biorreatores em fase não-aquosa, ou seja, semi-sólido ou sólido. As fermentações em com ausência de água, ou com teores de umidade que vão de 30 a 80%, a depender da capacidade de retenção de água do substrato sólido utilizado.

O controle das condições de operação em processos sólidos ou semi-sólidos pode ser um grande desafio, no entanto, pode também ser uma opção mais econômica em alguns casos, como por exemplo, o modelo de leito-fluidizado, que promove uma melhor transferência de massa (oxigênio e demais nutrientes), contribuindo assim também com o controle da temperatura (SCHMIDELL, FACCIOTTI, 2001).

3.4.1 Fermentação no estado sólido

Os processos com fermentação no estado sólido (FES) possuem valor biotecnológico, considerando a possibilidade do uso de resíduos de produtos agroindustriais, os quais seriam descartados no ambiente, agregando assim, valor também aos resíduos (BRITO, 2014). Analisando o volume de subprodutos fibrosos gerados no Brasil, como é o caso por exemplo, da produção de proteína de soja, esse processo gera um material rico em celulose e hemicelulose, podendo então ser reutilizado como fonte de nutrientes em sínteses microbianas, produzindo assim substâncias de valor agregado como é o caso de ácidos e enzimas.

O γ -PGA também pode ser obtido a partir do processo de fermentação em meio sólido, processo comum na produção do *natto*, com grãos de soja e o *Bacillus subtilis* (FERNANDES et al., 2020). Piedrahita-Aguirre (2014) descrevem sobre as vantagens da fermentação semissólida em relação à fermentação submersa, como o maior rendimento na produção, maior estabilidade dos produtos, custos operacionais, possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais como substratos, baixo consumo de água e ainda reduzido volume de efluentes.

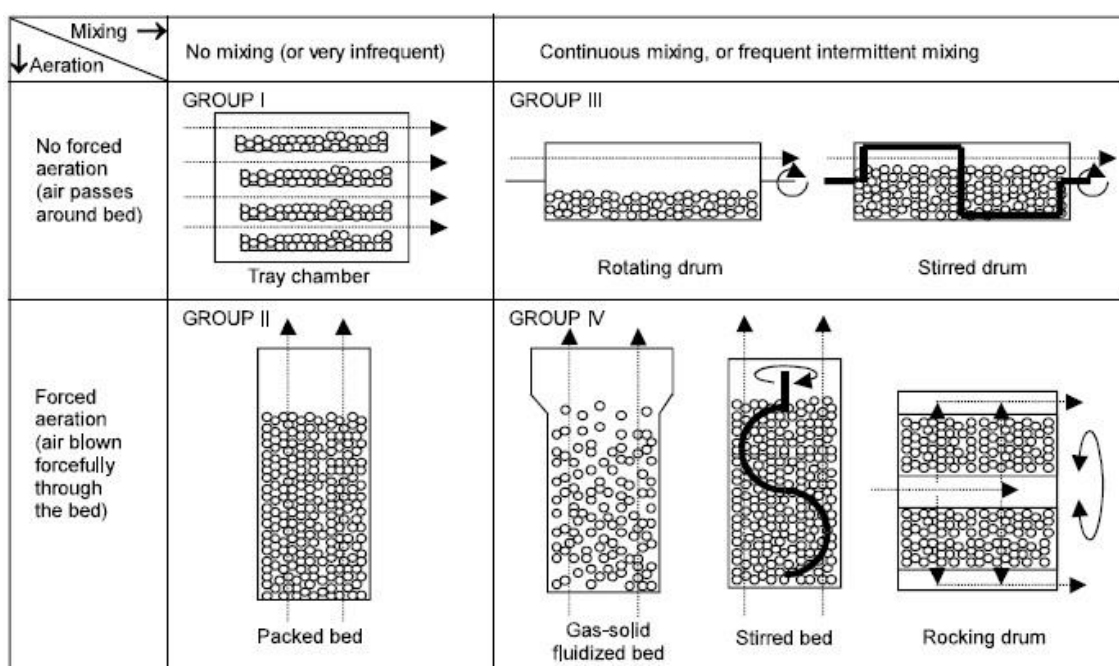
No cultivo em estado sólido e em processo aeróbio, a agitação constante é essencial para a homogeneização do meio e a distribuição dos inóculos, contribuindo dessa forma com a troca de calor e liberação dos gases formados pela fermentação e, ainda a renovação do oxigênio, fundamental num processo aeróbio (DEL BIANCHI et al., 2001). No entanto, a agitação pode prejudicar a formação dos esporos, considerando que uma agitação de maior impacto pode destruir as células bacterianas (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001).

A fermentação semissólida e em estado sólido possuem bom potencial para serem utilizadas em nível industrial, contudo, ainda são necessários estudos para melhor purificação dos produtos e controle dos parâmetros de processo, incluindo a concentração de biomassa e substrato. Ainda conforme Piedrahita-Aguirre (2014), nas últimas décadas têm surgido biorreatores que permitem monitorar esses parâmetros, apesar da carência de informações acerca de projetos e operações de biorreatores para ampliação de escala. Os tipos de biorreatores comumente utilizados em processos de FES são: leito fixo, tambor rotativo e leito fluidizado, onde cada biorreator apresenta características particulares apropriadas para diferentes processos e microrganismos.

A Figura 5 apresenta alguns modelos de biorreatores classificados em quatro grupos conforme o processo de operação e design, considerando as mistura e aeração dos microrganismos e substratos. Grupo I – bandeja, tipo leito fixo, com mínimo de mistura, onde ar circula pelo leito, mas não é forçado; grupo II – leito fixo, diferente do modelo anterior, nesse

o ar é forçado com fluxo de baixo para cima, pode haver também um mínimo de mistura; grupo III – tambor rotativo ou de agitação, há movimentação contínuo no interior com fluxo de ar, porém não é forçado; grupo IV – tambor de balanço, leito fluidizado a gás-sólido, além de contínuo movimento podendo ser contínuo ou em intervalos curtos, o ar que circula é forçado (MITCHEL, 2006).

Figura 5 – Classificação dos tipos de biorreatores para FES



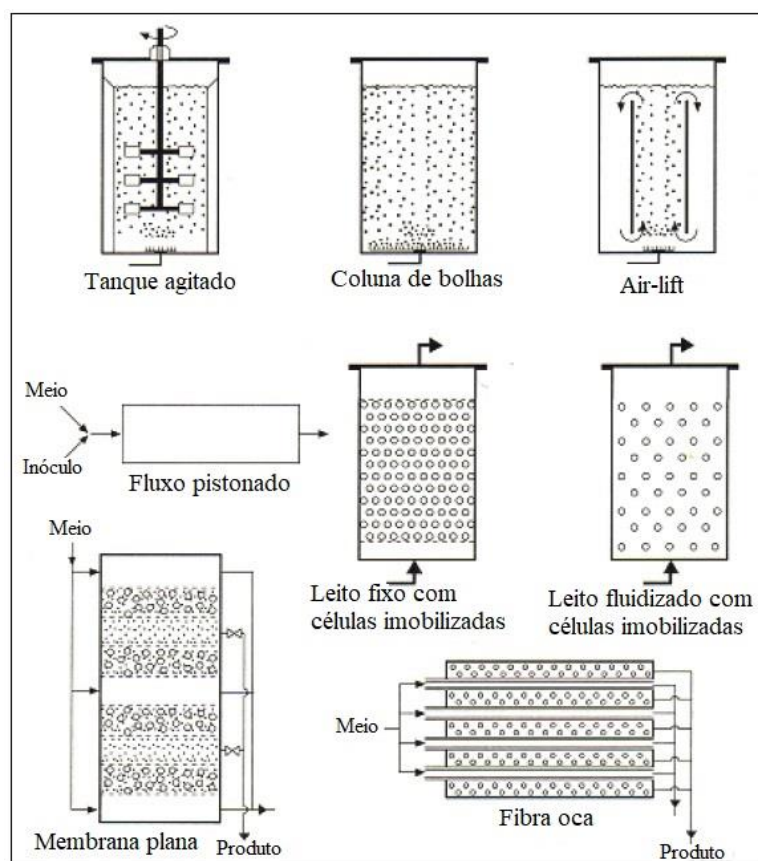
Fonte: MITCHEL, 2006 p. 39.

3.4.2 Biorreatores para fermentação submersa

Existem diferentes modelos de biorreatores que podem ser utilizados para cultivo de bactérias, e consequente produção de γ -PGA em meio submerso. Nesse sentido, os biorreatores podem ser classificados em dois grupos, sendo o primeiro onde ocorrem reações enzimáticas sem a presença de células vivas, enquanto no segundo grupo de biorreatores as reações ocorrem com células vivas (SCHMIDELL; FACCIOTTI, 2001). Considerando os biorreatores com presença de células vivas, esses podem ser classificados quanto à configuração que pode ser com células livres, imobilizadas ou confinadas entre membranas. A Figura 6 apresenta alguns

modelos conforme a classificação proposta por Schmidell e Facciotti (2001). O modelo com agitação mecânica é o mais amplamente utilizado na indústria.

Figura 6 – Classificação dos modelos de biorreatores propostos para cultivo submerso



Fonte: Adaptado de Schmidell e Facciotti (2001), p. 184.

O biorreator de tanque agitado vem sendo empregado desde a segunda guerra mundial na produção de antibióticos, em processo aeróbio. Uma parcela menor de biorreatores industriais utilizam outras tecnologias para transferência de oxigênio, como os de colunas de bolhas ou *airlift*, ambos dispensam a necessidade de agitação mecânica (ROSSI, 2016). Uma questão importante refere-se às forças de cisalhamento que os microrganismos estão sujeitos, causadas pela agitação mecânica necessária para a transferência de massa e mistura nos sistemas agitados, que podem danificar as células. Outras desvantagens dos sistemas mecanicamente agitados é o alto consumo de energia, o aumento da temperatura decorrente da agitação mecânica e ainda a selagem do equipamento para evitar a contaminação com o ambiente externo.

Para um sistema submerso, os métodos que utilizam apenas a injeção de ar podem ser favoráveis, visto que esses também podem proporcionar uma alta transferência de oxigênio, como no caso dos *airlift*. Isso decorre devido à grande distância percorrida pelas bolhas de ar, que favorece a movimentação de líquido no sistema e também sua homogeneização.

A circulação resultante que, pode ser interna ou externa, é resultado da diferença de densidade do líquido entre uma zona aerada (*riser*) e a zona não aerada (*downcomer*) do biorreator. Como não há a necessidade de agitação mecânica, o processo é simplificado, de fácil elaboração e de custo reduzido. Esses biorreatores são uma classe de reatores pneumáticos, e necessitam de alturas elevadas, de ordem superior até dez vezes seu diâmetro (ROSSI, 2006).

A retenção de gás num biorreator, denominado *holdup* (ε , variável adimensional) corresponde a sua fração volumétrica no total da dispersão gás-líquido. O *holdup* do gás é uma importante variável correlacionada com outras variáveis hidrodinâmicas e, em função da coalescência das bolhas durante sua ascensão através do *riser*, tende a ter valores baixos, sendo os maiores aplicáveis da ordem de 0,3 (ROSSI, 2006). Valores elevados são conseguidos com a diminuição do tamanho das bolhas, mas em cultivos onde ocorre aumento da viscosidade, como é o caso da produção de γ -PGA, bolhas pequenas podem ter um tempo de residência muito elevado, podendo entrar em equilíbrio com o líquido e contribuindo muito pouco para a transferência de oxigênio.

Sendo o fornecimento constante de oxigênio em processos de fermentação aeróbia essencial, devido à sua baixa solubilidade no meio de cultivo, é importante dar atenção à transferência de massa gás-líquido em um bioprocessos, pois essa pode ser fortemente influenciada pelas condições hidrodinâmicas no biorreator, em decorrência do tipo de microrganismo a ser usado, da composição do meio de cultivo, bem como, das propriedades do biorreator. Podendo ser um fator limitante no desenvolvimento dos microrganismos (KUMAR et al., 2017; ZHANG et al., 2018).

Uma das formas de melhorar a eficiência da taxa de transferência do oxigênio se dá pela adição de vetores de oxigênio aos meios de cultivo, sem que haja um aumento no consumo de energia para a aeração (KUMAR et al., 2017).

Os vetores de oxigênio são compostos imiscíveis em água, onde o oxigênio tem uma solubilidade mais alta do que na água, por isso sua capacidade em dissolver o oxigênio no meio de cultivo (ZHANG et al., 2018; REN, 2017). Os hidrocarbonetos integram uma variedade de vetores de oxigênio que podem ser utilizados em sistemas microbianos. Esses solventes líquidos orgânicos, quando usados em uma concentração ideal, aumentam a produção de biomoléculas de interesse comercial. Principalmente porque esses vetores de oxigênio atuam essencialmente

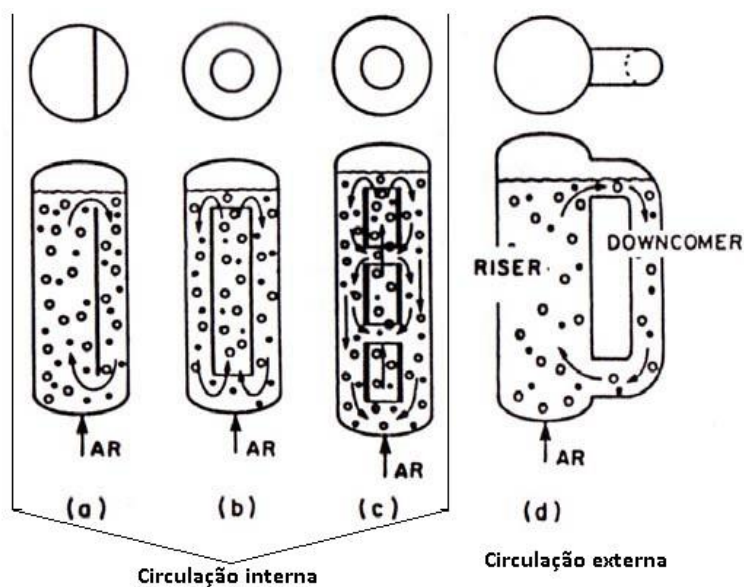
no aumento da taxa de transferência do oxigênio sem interferir no metabolismo microbiano devido à sua natureza relativamente inerte e não tóxica, quando em concentrações adequadas (KUMAR et al., 2017).

Na produção de biopolímeros altamente viscosos, em fermentação aeróbia, a transferência de oxigênio torna-se ainda mais importante, dessa forma, Zhang et al. (2012) realizaram experimento com o n-heptano como vetor de oxigênio. Os autores descrevem uma maior razão $\text{NADH} / \text{NAD}^+$, melhorando o rendimento na produção de γ -PGA. O solvente orgânico foi adicionado na concentração de 0,3% no início da fermentação, após a adição do inóculo *B. subtilis*. Lai et al. (2002), utilizaram o solvente n-dodecano em fermentação com inóculo de *Aspergillus terreus*, obtendo um aumento de 3,5 vezes da taxa de transferência de oxigênio.

3.4.3 Biorreatores *airlift*

Dentre os modelos do sistema *airlift* destacam-se os de circulação externa, que permitem mais personalizações quanto às conexões, o que facilita o fluxo de gás-liquido ascendente no *riser* e o descendente no *downcomer*. Modelos de fluxo internos também são funcionais, com uma variedade maior de configurações (Figura 7). As Figuras 8a e 8b apresentam dois modelos de *airlift* de bancada ambos com possibilidade de controle de processo e adaptações para condições personalizadas.

Figura 7 – Modelos de biorreatores *airlift*



Fonte: ROSSI, 2006 (p. 45).

Figura 8 – Biorreator *airlift* de bancada: circulação interna (a) e externa (b)



Fonte: (a) Adaptado de ROSSI, 2006, (b) acervo pessoal.

Em meios de cultivo é importante observar as alterações das propriedades dos fluidos, considerando o aumento da viscosidade, bem como a formação de alta densidade celular, que podem interferir nas condições de fermentação num sistema de circulação de ar como o biorreator *airlift* (KEMBLOWSKI, 1993). Contudo, o modelo *airlift* é interessante por sua flexibilidade, simplicidade e baixo custo, além da facilidade na esterilização e manutenção. O modelo permite uma configuração de fluxo de ar sem o risco de cisalhamento, mantendo as células íntegras em todos os estágios de crescimento.

3.4.3.1 Condução de processo em fermentação submersa

A fermentação em meio líquido oferece vantagens com relação às fermentações em processo semissólido ou sólido, pois essa pode ser conduzida com diferentes modos de operação. No processo descontínuo, também chamado processo por batelada, todos os substratos e microrganismos são adicionados no início da fermentação, não havendo adições de nutrientes durante o processo, somente quando aplicável, é feita a adição de soluções para controle de pH, sem interferir nos nutrientes para os microrganismos.

No processo descontínuo com alimentação, conhecido por batelada alimentada ou ainda *fed-batch*, inicia-se a inoculação em volume reduzido, usualmente até 20% do volume de processo, em seguida é feita a alimentação/adição de nutrientes, não havendo necessidade de controle de vazão de saída, a retirada de material fermentado, em muitos casos, ocorre somente no final do processo (CARVALHO; SATO, 2001). Esse sistema permite um controle mais adequado da concentração de substratos, flexibilizando assim a condução da via metabólica dos microrganismos, o que pode favorecer a produção quando ocorre alguma repressão pelo substrato.

No cultivo contínuo, o processo é conduzido através de alimentação constante do meio de cultura, com fontes de carbono, nitrogênio e demais nutrientes nas concentrações estabelecidas no início do processo, porém, o volume não é alterado pois a vazão de entrada e saída é constante. O processo contínuo nas fermentações em meio líquido ocorre em sistema aberto, com a necessidade de controle de fluxo contínuo do líquido e, à medida que o meio de cultivo é alimentado no sistema, ocorre a retirada de material fermentado (caldo), esse controle é essencial considerando principalmente o estado estacionário (*steady state*) onde as variáveis do processo (concentração de células, de substrato limitante e produto) são mantidas durante a

fermentação (FACCIOTTI, 2001). Nessa condição de regime permanente, a concentração celular é mantida constante porque a velocidade de crescimento é controlada pela vazão de alimentação de entrada, quando a velocidade de retirada é igual à de entrada.

Esse sistema oferece a vantagem de alimentação constante aos microrganismos, que pode favorecer o aumento na produtividade. Contudo, exige maior controle da vazão no processo, pela entrada e saída de material, bem como o controle da assepsia. Por ser um sistema aberto está mais suscetível à contaminação, inferindo manutenção constante do fluxo de entrada e saída do processo.

3.5 Determinação das grandezas de transformação

3.5.1 Velocidade específica de crescimento

A fase exponencial de crescimento é a mais importante, pois é onde ocorrem as principais atividades microbianas, além da duplicação das células, nessa fase ocorre também a maior produção de γ -PGA. Dessa forma, é importante conhecer a cinética de crescimento microbiano, ou seja, a velocidade de transformação, que pode ser da produção de biomassa, consumo de substratos e ainda a formação de produto (HISS, 2001), baseados em equações com balanço de massa. Assim, tem-se μ_x como a velocidade específica de crescimento, μ_s a velocidade específica do consumo dos substratos e μ_p como a geração de produto, nesse caso o γ -PGA. Essa cinética pode ser descrita a partir das expressões:

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

Onde: μ_x = velocidade específica de crescimento de células (h^{-1})
 X = concentração de biomassa (g.L^{-1})

A velocidade específica de crescimento (μ_x) em um sistema descontínuo pode ser então determinada considerando o aumento da biomassa na fase exponencial $\ln(X) = f(t)$, em função do tempo. A integração por partes da equação (1) leva à equação (2), onde em uma representação gráfica o coeficiente angular à curva é o valor da velocidade específica:

$$\frac{d\ln(X)}{dt} = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_x \quad (2)$$

Num sistema de fermentação contínua, sem o reciclo de células, se espera uma atividade constante, quando o sistema atinge a condição de estado estacionário ou permanente, onde a concentração de células, dos substratos limitantes e do produto formado se mantêm constantes durante o processo. Dessa forma, considerando um volume constante no biorreator, tem-se:

$$V \frac{dX}{dt} = FX_0 - FX + V \left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crescimento}} \quad (3)$$

Onde: V = volume de meio no reator (L)
 F = vazão volumétrica de alimentação de meio (L.h⁻¹)
 X = concentração de biomassa no biorreator (g.L⁻¹)
 X_0 = concentração de biomassa no meio de alimentação (g.L⁻¹)
 $FX_0 = 0$ porque $X_0 = 0$ (meio estéril)
 $\frac{dx}{dt} = 0 \Rightarrow E - E$

A velocidade global instantânea de crescimento, pode assim ser expressa como:

$$\left(\frac{dX}{dt} \right)_{\text{crescimento}} = \mu X \quad (4)$$

A relação entre a vazão volumétrica de alimentação e o volume do meio de biorreator pode ser definida como a "vazão específica de alimentação" (D ; *dilution rate*), a expressão pode então ser apresentada como:

$$D = \frac{F}{V} \text{ (h}^{-1}\text{)} \quad (5)$$

Atingido o estado estacionário no biorreator, onde a concentração de células permanece constante, com a vazão de alimentação igual à vazão de retirada de meio, portanto $dX/dt = 0$, obtém-se assim:

$$\mu X = DX \quad \text{ou} \quad \mu = D \quad (6)$$

3.5.2 Conversão de substrato em produto

É importante analisar a grandeza de conversão dos substratos em produto, pois através dessa análise é possível observar o consumo dos nutrientes do meio, verificar se há substrato

limitante ou se há sobra de substratos. No entanto, as condições do processo devem ser constantes durante a fermentação.

Os fatores de conversão são expressos em g.g^{-1} por: $Y_{P/S}$; $Y_{X/S}$; $Y_{P/X}$. Enquanto a produtividade é expressa por $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. O rendimento do produto em relação ao substrato relaciona a massa de produto obtido com a massa de substrato consumida, a unidade nesse caso é dada por $[\text{g } \gamma\text{-PGA} / \text{g (glicerol/glicose)}]$. Esse parâmetro pode ser expresso conforme a equação:

$$Y_{p/s} = \frac{\frac{dP}{dt}}{\frac{dS}{dt}} = \frac{r_P}{r_S} \quad (7)$$

Onde: $Y_{p/s}$ = fator de conversão de substrato em produto ($\text{g } \gamma\text{-PGA} \cdot \text{g (glicerol/glicose)}^{-1}$)

3.5.3 Produtividade

Outra importante grandeza a ser avaliada durante o processo de fermentação é a produtividade, ou seja, a concentração do produto formado em função do tempo que pode ser expressa conforme segue:

$$P_p = \frac{P - P_0}{t} \quad (8)$$

Onde: P_p = produtividade média em produto ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
 P = concentração máxima do produto (g.L^{-1})
 P_0 = concentração inicial do produto (g.L^{-1})
 t = tempo total do cultivo (h)

Em um biorreator com fermentação contínua a velocidade de crescimento microbiano é calculada em função da vazão de alimentação e volume do biorreator, assim também os balanços materiais para o substrato limitante e para o produto P genérico são equacionados. Obtém-se então as expressões:

$$\frac{dS}{dt} = D(S_0 - S) - \mu_s X = D(S_0 - S) - \frac{\mu X}{Y_{X/S}} \quad (9)$$

$$\frac{dP}{dt} = D(P_0 - P) + \mu_P X \quad (10)$$

A expressão representa a velocidade de consumo do substrato para o crescimento celular, $\mu X/Y_{(X/S)}$, enquanto $\mu_p X$ representa a velocidade de síntese do produto P pelas células. Quando o sistema está na condição estacionária então, $dS/dt = 0$, assim:

$$\mu X = Y_{X/S} D (S_0 - S) \quad (11)$$

Considerando $\mu = D$, a expressão obtida será:

$$X = Y_{X/S} (S_0 - S) \quad (12)$$

Considerando o equilíbrio entre a velocidade de crescimento de célula e a velocidade de retirada de células do fermentador, equaciona-se o balanço de materiais para o substrato limitante:

$$S = S_0 - \frac{X}{Y_{X/S}} \quad (13)$$

A formação de produtos em um sistema contínuo sem reciclo de células é expressa considerando-se a classificação de Gaden (1955), as equações propostas originalmente por Luedeking e Piret (1959) relacionam as velocidades específicas de crescimento (μ) e de produção (μ_p), como apresentado a seguir, onde α e β são considerados constantes:

Produção não-associada ao crescimento:

$$\mu_p = \beta \quad (14)$$

A equação 15 apresenta o balanço de materiais para o produto P genérico, assim, quando $P_0 = 0$, a expressão para a concentração do produto no estado estacionário ($dP/dt = 0$) é obtida conforme segue:

$$P = \frac{\mu_p X}{D} \quad (15)$$

Considerando que $\mu = D$, obtém-se a concentração do produto (P) e a produtividade (DP) em função de D , através das expressões:

Quando a produção é associada ao crescimento celular:

$$P = \alpha X \quad (16)$$

$$(DP) = \alpha(DX) = \alpha P_X \quad (17)$$

4 MATERIAL E MÉTODOS

A etapa experimental desta pesquisa foi realizada no Laboratório de Bioprocessos do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

4.1 Microrganismos utilizados

Foram utilizadas duas espécies de *Bacillus*, a NCTC 10341 (*Bacillus licheniformis*) e a ATCC 2382 (*Bacillus subtilis*), ambas cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz. O meio de cultura utilizado para a ativação dos microrganismos foi ágar nutriente (NA) ou ágar infusão de cérebro e coração (BHI), na temperatura de incubação de 33 °C. O pH esteve entre 6,8 e 7,2 e o tempo de incubação em aerobiose foi de 24 horas.

4.1.1 Controle de qualidade das culturas

Para verificar a pureza, as culturas foram primeiramente inoculadas em tubos com meio BHI e inoculadas em tubos a 33 °C por 24 horas com agitação em mesa agitadora orbital a 180 rpm. Após a ativação, os tubos foram parcialmente submersos em banho-maria por 15 minutos a 80 °C para eliminação das células vegetativas e também eventuais bactérias não formadoras de esporos. Foram então transferidos 10 µL de inóculo e transferidos para placa de Petri contendo meio de cultura BHI sólido. Com auxílio de alça de Drigalski, as células foram espalhadas sobre a placa. A partir de colônias pontuais isoladas, foram obtidas as culturas puras. Os microrganismos purificados tiveram a morfologia analisada ao microscópio e comparada com a literatura descritiva dessas espécies.

4.1.2 Pré-inóculo de cultivo dos *Bacillus*

Para cada experimento, primeiramente os microrganismos foram cultivados em placa de Petri contendo o meio de cultivo utilizado para a produção de γ -PGA, conforme descrito no item 4.2. As placas foram mantidas em estufa a 33 °C por 24 horas, com a superfície do meio

voltada para baixo para evitar a condensação de água nos microrganismos. Após 24 horas, o crescimento dos bacilos foi analisado coletando-se uma amostra em lâmina para coloração de Gram. Com a confirmação da pureza da cultura, foi realizada a inoculação em 100 mL do respectivo meio em frascos Erlenmeyer de 250 mL, tomando-se uma alça da cultura ativada na placa para inocular o meio de cultura. Os frascos foram incubados por agitação a 200 rpm em temperatura de 33 °C e por 16 horas.

4.2 Meios de cultivo

Para a manutenção dos microrganismos foi utilizado meio nutriente BHI. A temperatura de cultivo foi 33 °C, com pH entre 6,8 e 7,2. Esses meios foram preparados conforme orientações do fabricante. O caldo BHI é baseado no princípio do caldo de Rosenow composto por nutrientes de tecido cerebral e coração bovino, peptona e glicose. Contém 65% de proteína e aproximadamente 8% de carboidratos (ROSENOW, 1919). Para o cultivo em placa de Petri ou em tubos inclinados, foi adicionado de 15 g L⁻¹ de Ágar.

Outro meio de cultura, o Luria Bertani (LB), descrito por Yoon et al. (2000), foi utilizado como meio base para o re-isolamento e também preparo de pré-inóculo aos outros meios na produção de γ -PGA. Esse meio também é rico em nutrientes de carbono e nitrogênio favorecendo o crescimento rápido dos microrganismos. Na preparação do meio LB utilizou-se (em g.L⁻¹): triptona 10; extrato de levedura 5; cloreto de sódio 5. Para preparações sólidas, foi adicionado 15 g L⁻¹ de Ágar.

O meio base utilizado nos diferentes ensaios em frascos Erlenmeyer e em biorreator *airlift* foi adaptado a partir de Jung et al. (2005). O meio basal foi preparado com (em g L⁻¹): glicose 10; ácido L-glutâmico monossódico (glutamato monossódico) 20; Fosfato ácido de potássio (KH₂PO₄) 0,5; Sulfato de Magnésio heptahidratado (MgSO₄.7H₂O) 0,5. As adequações no meio basal com diferentes fontes de carbono e nitrogênio são descritas conforme os ensaios realizados. No entanto, aos meios foram adicionados sais conforme segue (em g L⁻¹): Cloreto de Cálcio dihidratado (CaCl₂.2H₂O), 0,2; Sulfato de Manganês hidratado (MnSO₄.H₂O) 0,5; Cloreto Férrico hexahidratado (FeCl₃.6H₂O) 0,05.

O ácido L-glutâmico, conforme a literatura, contribui como *start* na produção de γ -PGA, e o ácido cítrico foi adicionado como quelante para evitar a precipitação dos íons como manganês, zinco, ferro, entre outros elementos presentes no meio, que ocorre principalmente no processo de esterilização do meio. No entanto, apesar de considerar o consumo das principais

fontes como sendo a glicose e o glicerol, para o cálculo de rendimento total, foram consideradas todas as fontes de carbono do meio.

Após o preparo, os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Os açúcares foram autoclavados separadamente dos outros componentes do meio. A esterilização pode afetar a disponibilidade dos carboidratos, pois esses podem reagir com íons amônio e aminoácidos, presentes na formulação dos meios. O ácido cítrico foi utilizado como quelante pois não inibe o crescimento dos microrganismos, além disso, também é fonte de carbono.

4.3 Métodos analíticos

Dos cultivos em frasco Erlenmeyer de 250 mL foram coletados, assepticamente, 3 mL de amostra para determinação de pH, crescimento celular (DO_{600}), massa seca, substrato residual e γ -PGA. No cultivo em biorreator a amostragem foi realizada em duplicata coletando-se 20 mL de amostra. A periodicidade das coletas é descrita em cada procedimento, bem como as diluições necessárias, quando aplicável.

As soluções foram então centrifugadas por 20 minutos a 13.400 *g* em centrífuga refrigerada a 4 °C. As células precipitadas foram ressuspensas em água para posterior análise de densidade óptica (DO) e, novamente centrifugadas, para determinação de massa seca, após secagem em estufa a 60 °C até peso constante. O sobrenadante da primeira centrifugação foi neutralizado até pH 7,0 com NaOH 1M. Para análise de substrato residual, foram coletadas alíquotas das amostras neutralizadas.

Para a determinação de γ -PGA o sobrenadante foi primeiramente purificado tomando-se alíquotas de 2 mL e adicionando-se 8 mL de etanol gelado (GOTO, KUNIOKA, 1992; ZENG et al., 2012). A solução foi agitada por uma hora e depois acondicionada em geladeira por mais uma hora, após foi centrifugada por 20 minutos a 13.400 G em centrífuga refrigerada a 4 °C. O sobrenadante foi reservado para posterior recuperação do etanol. O precipitado foi ressuspendido em água ultrapura e novamente centrifugado para remoção de possíveis impurezas, o precipitado foi então descartado. A solução foi utilizada para análise quantitativa de γ -PGA.

4.3.1 Preparação curva com padrão γ -PGA

Para a elaboração da curva padrão de γ -PGA utilizou-se o produto comercializado pela Shandong Freda Biotechnology, fabricado em Shandong/China. O composto sódico foi primeiramente purificado diluindo-se 3 g em 10 mL de água ultrapura, agitando-se por uma hora em mesa agitadora orbital e em seguida refrigerado por 24 horas. A solução foi centrifugada a 13.400 G por 20 minutos a 4 °C, O precipitado foi descartado e 2 mL do sobrenadante foi então utilizado para precipitação com 8 mL de etanol gelado. A solução foi homogeneizada em *vortex* e refrigerada por 24h. Após esse período foi centrifugada a 13.400 G por 20 minutos a 4 °C, e o precipitado foi seco em estufa por 12h a 60 °C. O composto seco foi novamente diluído em água ultrapura e repetiu-se o processo até a precipitação com etanol. O γ -PGA obtido foi seco em estufa por 24h a 60 °C.

Após o processo de purificação, foi preparada uma solução padrão pesando-se 0,6 g do composto seco e diluindo-se em 50 mL de água ultrapura. A partir da solução padrão foram feitas diluições para leitura em espectrofotômetro a 400 nm. Os padrões diluídos foram complexados com Brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) e tampão fosfato pH 7,0, tomando-se 1 mL do padrão diluído adicionando 4 mL de tampão fosfato e 1 mL de solução CTAB (KANNO; TAKAMATSU, 1995).

4.3.2 Variáveis analisadas

Para a determinação do pH das amostras foi utilizado pHmetro Thermo Scientific Orion Star A211, calibrado com padrões de 4 e 9. As amostras coletadas no biorreator foram comparadas com o pH medido em tempo real durante a fermentação. Não houve diferença significativa entre os eletrodos.

O crescimento celular foi determinado a partir da densidade óptica em espectrofotômetro a 600 nm (DO_{600}), com a devida diluição quando a leitura foi maior que 0,9.

A concentração de glicose foi determinada por método enzimático-colorimétrico GOD-Trinder com padrão de 100 mg.dL⁻¹ da Labtest®, cujo princípio ocorre pela glicose oxidase (GOD) catalisando a oxidação da glicose formando os intermediários ácido glucônico e peróxido de hidrogênio, sendo esse catalisado pela peroxidase reagindo assim com 4-aminoatipirina e fenol. O produto final formado é a antipirilquinonimina vermelha cuja

intensidade da cor proporcional à concentração de glicose presente no meio, podendo então ser determinada por espectrofotometria a 500 nm (TRINDER, 1969).

A determinação da concentração de glicerol foi a partir da hidrólise pela ação da glicerolquinase, formando o glicerol-3-fosfato, que é então oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio pela glicerolfosfato oxidase, ao final da reação obtém-se a quinoneimina sendo a intensidade da cor vermelha proporcional à concentração de glicerol presente no meio, que possui máximo de absorbância em 505 nm. A concentração do padrão utilizado foi de 200 mg dL⁻¹ da Labtest[®].

A purificação e caracterização do ácido γ -PGA foi efetuada para verificar sua concentração e composição, para tanto, foram utilizados métodos como de espectrofotometria e espectroscopia de infravermelho.

Para determinar a quantidade de γ -PGA produzido, utilizou-se a metodologia descrita por Ashiuchi (2011). O princípio metodológico é fundamentado pela formação de complexo hidrofóbico. O método emprega o surfactante CTAB, pois esse forma um complexo de micelas insolúveis em água na presença de γ -PGA, a turbidez é aumentada proporcionalmente à concentração do biopolímero presente na amostra. A solução turva pode ser analisada por espectrofotometria a 400 nm. A partir das leituras realizadas foi determinada a concentração de γ -PGA utilizando-se a equação da curva de calibração elaborada a partir de diferentes diluições do padrão com concentração conhecida (item 4.3.1).

Com o intuito de investigar os grupos funcionais e as ligações químicas na molécula de γ -PGA pode ainda ser realizada análise de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), posteriormente, a extração do γ -PGA utilizando-se de solvente orgânico. O FTIR tem como princípio a investigação dos grupos funcionais bem como das ligações químicas, nesse caso, do biopolímero produzido e da biomassa. As bandas foram comparadas ao padrão de γ -PGA conhecido. Todas as amostras foram previamente secas em estufa a 60 °C. A análise em infravermelho foi realizada em espectroscópio na faixa entre 4000 e 400 cm⁻¹.

4.4 Determinação das grandezas de transformação

4.4.1 Velocidade específica de crescimento

As amostras coletadas foram diluídas na proporção 1:10 com água destilada, após centrifugação, o precipitado foi novamente ressuspensionado com água destilada a 10 volumes. As amostras foram então analisadas em espectrofotômetro a 600 nm. As leituras foram calculadas em função do tempo para a determinação da velocidade de crescimento da biomassa no sistema de fermentação em batelada, conforme equação (1). A velocidade específica no sistema de alimentação contínua foi determinada conforme a equação (5).

4.4.2 Conversão de substrato em produto

Para determinar a conversão de substrato em produto, utilizou-se a amostra a partir do sobrenadante do item 4.4.1, onde uma alíquota da amostra na proporção 1:4 foi diluída em etanol 99%, gelado. A solução foi mantida em refrigeração por 24h e após centrifugada a 13.400 G por 20 minutos a 4 °C, o precipitado foi ressuspensionado até 10 volumes. As amostras foram complexadas com CTAB e tampão fosfato pH 7,0, tomando-se 1 mL da amostra diluída adicionando 4 mL de tampão fosfato e 1 mL de solução CTAB. A quantificação foi determinada após a leitura das amostras em espectrofotômetro a 400 nm, calculada sobre a curva de γ -PGA obtida com o padrão, o resultado foi expresso em g L⁻¹.

O consumo dos substratos foi analisado obtendo-se uma alíquota de 0,01 mL do sobrenadante do item 4.4.1 adicionando 1,0 mL do reagente enzimático para determinação de glicose, após agitação, a solução foi colocada em banho maria por 10 minutos, a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 505 nm, o resultado foi calculado conforme curva padrão. A determinação do consumo de glicerol foi obtida utilizando-se o mesmo método, com o reagente para determinação de glicerol e calculado conforme a curva para glicerol, os resultados foram expressos em g L⁻¹. A determinação de conversão de substratos em produto foi calculada conforme a equação (7), a partir das quantificações obtidas individualmente, os valores foram expressos em g γ -PGA / g (glicerol/glicose).

4.4.3 Produtividade

A produtividade nos processos de fermentação em batelada foram foi calculada conforme a equação (8). Tomando-se a produção (item 4.4.2) em função do tempo de fermentação em horas, o. Enquanto a produtividade no sistema de fermentação contínua foi determinada considerando a velocidade específica de vazão de alimentação dos nutrientes, assim, foi calculada conforme as equações (16 e 17), as equações consideram o crescimento da biomassa associada à produção de γ -PGA. Em ambos os processos os valores foram expressos em $\text{g L}^{-1} \text{h}^{-1}$.

4.5 Estudos preliminares

4.5.1 Cinética de crescimento dos microrganismos

Após ativação dos microrganismos, seguiu-se a metodologia utilizada por Jung (2005). Com o auxílio de uma micropipeta, uma alíquota de 20 μL de inóculo foi transferida para frasco Erlenmeyer de 250 mL com 100 mL meio de cultura Basal. Os frascos foram incubados a 33 °C com agitação de 200 rpm. Desde a fase inicial foram tomadas alíquotas para análise do crescimento celular, a cada 2 horas. O meio de cultivo também foi investigado para analisar as diferenças no pH durante o processo de fermentação. Todos os ensaios foram realizados em triplicada. Os resultados apresentam os valores médios das amostras.

4.5.2 Produção de γ -PGA com diferentes fontes de nitrogênio

O nitrogênio é um elemento fundamental na composição do γ -PGA. Por essa razão, foi conveniente investigar as fontes de nitrogênio ideais. O ácido L-glutâmico é um importante precursor de γ -PGA, de modo que foi utilizado como maior fonte de nitrogênio durante o processo fermentativo. Outras fontes também contribuem na produção de γ -PGA, como o sulfato, o cloreto e nitrato de amônio. Não foram consideradas como fontes nessa análise, aquelas advindas de componentes básicos dos meios de cultivo, como a peptona, triptona e extrato de levedura.

Para o estudo da produção de γ -PGA a partir de suplementação de nitrogênio utilizou-se o meio basal, no entanto, no meio 1 a concentração de cloreto de amônio foi ajustada para $7,0 \text{ g L}^{-1}$. No meio 2 a fonte de nitrogênio foi substituída por nitrato de amônio, também na concentração de $7,0 \text{ g L}^{-1}$. No terceiro meio de cultivo o nitrogênio utilizado foi o sulfato de amônio na concentração de $10,0 \text{ g L}^{-1}$. As diferentes concentrações de nitrogênio utilizadas nos ensaios foram calculadas a partir do peso molecular de cada fonte de nitrogênio, por essa razão as diferenças de concentração na composição dos meios de cultivo. Os ensaios foram realizados em triplicata em frascos Erlenmeyer de 250 mL, tomando-se 20 μL dos *Bacillus* isolados e ativados em meio LB a 33°C em mesa agitadora a 200 rpm.

4.5.3 Produção de γ -PGA em diferentes fontes de carbono

4.5.3.1 Meio Basal com adição de fontes de carbono e n-heptano

Para investigar a produção de γ -PGA utilizou-se o meio basal descrito por Xu et al. (2014), adaptado conforme Tork (2015). O meio basal foi suplementado conforme a Tabela 2. Como fonte de nitrogênio complementar, foram adicionados 10 g L^{-1} de sulfato de amônio. O pH inicial foi ajustado para 7,00 com adição de NaOH 0,1M. Os ensaios foram realizados em triplicata em frascos Erlenmeyer de 250 mL, tomando-se 20 μL dos inóculos ativados com 100 mL de meio Basal a 33°C em mesa agitadora a 200 rpm.

Esses estudos contribuíram para a adaptação das diferentes metodologias pesquisadas, alterando as concentrações das fontes de carbono, especialmente glicerol e glicose, principalmente para verificar o crescimento dos microrganismos nos diferentes meios, bem como a produção de γ -PGA. A partir desses ensaios foi possível identificar o meio de cultura com melhor rendimento de γ -PGA.

Assim, foi realizado estudo com a adição de 0,3% de solvente orgânico n-heptano em meio basal com diferentes concentrações de glicerol e glicose conforme a Tabela 2.

Tabela 2 – Composição dos meios de cultivo com adição de n-Heptano

Tratamento	Glicerol (g.L ⁻¹)	Glicose (g.L ⁻¹)	n-Heptano
Meio 1	30	10	
Meio 2	40	10	
Meio 3	30		
Meio 4	50	15	
Meio 5	40	10	0,3%
Meio 6	50	15	0,3%

4.6 Produção de γ -PGA em biorreator *airlift*

O biorreator utilizado foi de circulação externa, com capacidade útil de 2,3 L, construído em vidro borossilicato. Era composto por entradas para alimentação de soluções para controle de pH, saídas de ar e de produto no topo e entrada para alimentação de meio de cultura. Também possuía portas para o monitoramento de pH e oxigênio dissolvido conforme Figura 8b (item 3.4.3).

A esterilização do biorreator foi realizada com solução de ácido peracético 3% (PAC), com pH 2,9. Esse processo foi realizado a partir de limpeza com detergente industrial, seguido de enxágue com água destilada até a remoção completa de possíveis resíduos, após então, foram adicionados 2,5 litros de solução PAC a 3%, a solução foi mantida com circulação pela injeção de ar por 30 minutos. Em seguida, a solução foi descartada mantendo a circulação de ar filtrado, não havendo necessidade de novo enxágue, o residual de PAC é volatilizado, não afetando o meio de cultivo.

O ar foi fornecido através de um compressor de ar, e purificado com auxílio de membranas filtrantes hidrofóbicas de PTFE (Politetrafluoroetileno), com poros de 0,22 microns, previamente esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após a retirada da solução de esterilização, o biorreator foi vedado até a adição do meio de cultivo pré-inoculado, para início do cultivo.

Os ensaios em biorreator foram conduzidos a partir dos dados obtidos nos estudos preliminares em mesa agitadora, optando-se pelos meios e condições de processo com melhores resultados na produção de γ -PGA. No biorreator o pH foi controlado ao longo do cultivo, utilizando um eletrodo combinado esterilizável, modelo da série InPro3030, com transmissor

modelo M300 da Mettler Toledo, posicionado na metade da altura da coluna líquida. O sensor foi instalado numa porta inclinada a 45°, a vedação foi realizada por dois O-rings posicionados axial e radialmente, e com inserção mínima no riser para não interferir na circulação do líquido. A calibração foi realizada seguindo as instruções do fabricante.

O oxigênio foi monitorado com um eletrodo de oxigênio polarográfico calibrado ao ar em 100% da saturação. O modelo do eletrodo é da série InPro-6000, sendo utilizado também um transmissor da Mettler Toledo 4100e. O eletrodo foi instalado na metade da coluna do biorreator, em uma porta com inclinação de 45°, com vedação por O-rings, tendo uma inserção mínima evitando assim interferir na circulação do líquido no *riser*.

A vazão de ar foi regulada manualmente com o objetivo de manter o oxigênio dissolvido acima de uma concentração crítica, de 10% da saturação. A vazão específica inicial do ar foi ajustada em 0,10 vvm (volume de ar por volume de meio por minuto). Essa vazão foi inicialmente selecionada para evitar a formação excessiva de espuma. A vazão foi ajustada durante o processo para manter a oxigenação necessária aos microrganismos durante os experimentos. Para o controle de espuma foi adicionado 0,2 a 0,4 mL L⁻¹ de antiespumante polipropileno glicol.

No experimento 1, o meio de cultivo foi adicionado antes do início do processo, sem novas adições até o final da fermentação. No experimento 2, a alimentação de nutrientes foi realizada de forma diferente nos experimentos em biorreator *airlift*. No experimento a partir de batelada repetida, foram adicionadas soluções de ácido L-glutâmico, glicerol, glicose, cloreto de cálcio e sulfato de zinco, conforme descrito no item 5.2.1 (HUANG, 2011a).

A partir do experimento 3, em biorreator *airlift*, o processo foi realizado com alimentação contínua de nutrientes, a vazão de alimentação foi de 13 mL min⁻¹. O cultivo sem o reciclo de células foi realizado a partir dos resultados analisados em cultivo com *B. licheniformis* na produção de γ -PGA em biorreator *airlift*. No experimento 4 o meio de cultivo foi preparado com uma concentração de 30% em relação ao meio do experimento 3. A vazão de alimentação foi ajustada para 8 mL min⁻¹, porém, as condições de processo como pH, temperatura e vazão de entrada de ar foram mantidas.

Foram considerados nos experimentos os cofatores, fundamentais em todas as vias, estes podem intervir nos processos fermentativos, seja pela adição de elementos chaves no meio de cultivo, bem como das condições de processo. Assim, aos novos experimentos foram adicionados além do cloreto de cálcio, o de sulfato de zinco ZnSO₄ e niacina 0,25%. O cálcio auxilia na precipitação de compostos de fosfatos, melhorando assim o rendimento na produção de γ -PGA, o zinco atua como indutor do gene *psgE* facilitando a biossíntese de γ -PGA, enquanto

a niacina atua como cofator na biossíntese, pois é precursora de NAD⁺ e NADP⁺ (HSUEH, 2017; ASHIUCHI et al., 1999).

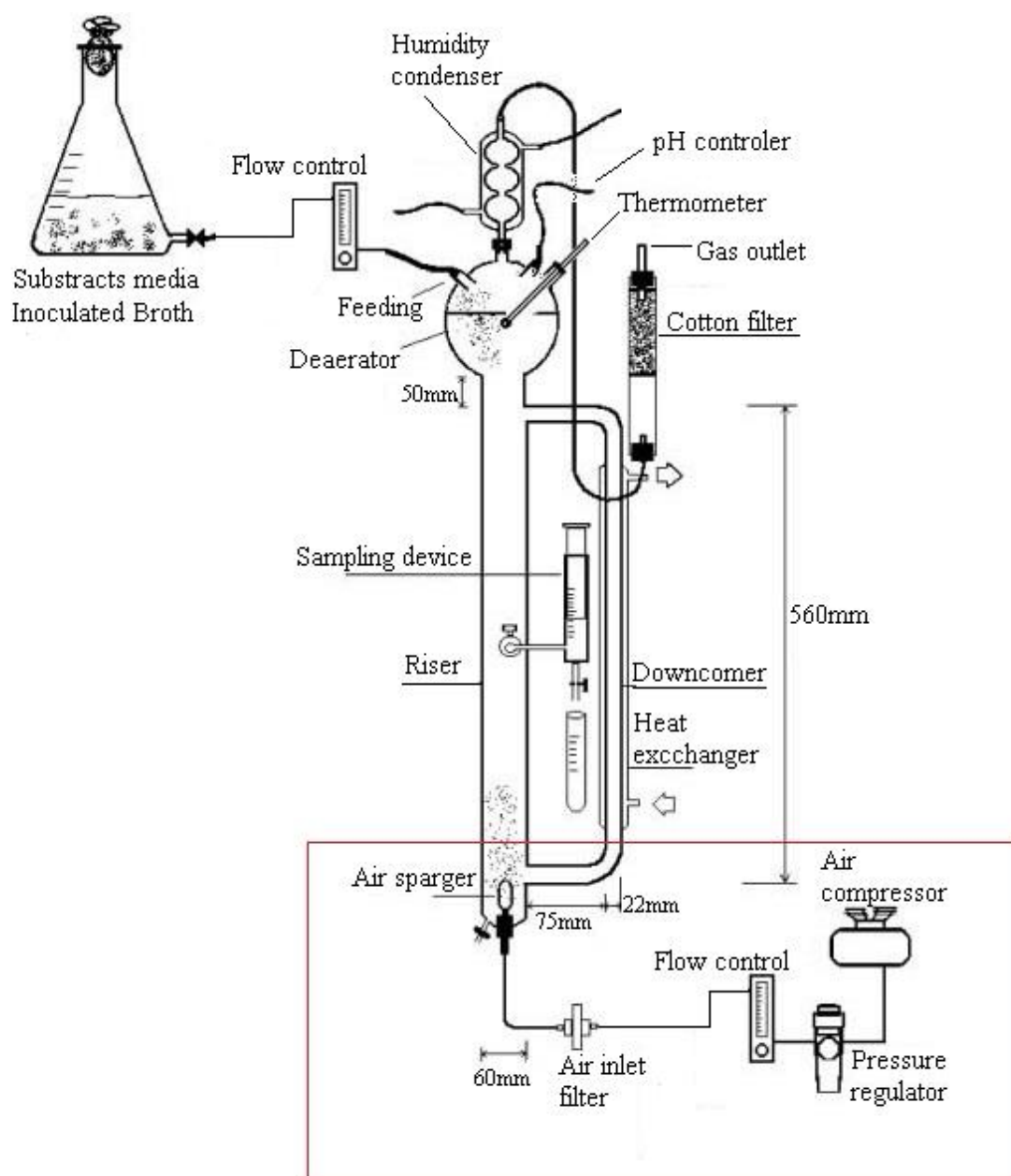
Os ensaios em biorreator foram conduzidos a partir de estudos conforme Kumar e Pal (2015) e Yoon et al. (2000), com a inoculação de *Bacillus licheniformis* (2% v/v) 46 mL em 2,3 L de meio de cultivo esterilizado em autoclave conforme descrito no item 4.2. O pH foi ajustado automaticamente com soluções de NaOH 0,2M e H₂SO₄ 0,1M.

A concentração inicial do meio, incluindo os substratos de carbono, nitrogênio e sais no cultivo com alimentação contínua, foi de 50% em relação à concentração do meio utilizado no cultivo em batelada no biorreator *airlift*.

O controle da temperatura no biorreator foi realizado através de circulação de água por um trocador de calor no *downcomer*, utilizando-se um banho termostatzado. O fluxo de ar foi controlado manualmente como mostra o diagrama esquemático na Figura 9. O biorreator também foi equipado com um difusor de ar para reduzir o tamanho das bolhas, instalado na base do *riser*.

As amostras foram coletadas conforme descrito no item 4.3 onde alíquotas de 20 mL foram retiradas para analisar a produção de γ -PGA, o crescimento da biomassa e o consumo dos substratos, glicerol e glicose, sem a necessidade de interromper o processo e com menor risco de contaminação.

Figura 9 – Diagrama esquemático do biorreator *airlift* utilizado neste estudo



Fonte: adaptado de Rossi, 2002.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudos preliminares em frascos agitados

5.1.1 Purificação dos isolados bacterianos

Os microrganismos ativados e inoculados em placa de Petri para purificação e isolamento foram analisados quanto à sua morfologia e características básicas, conforme observa-se nas Figuras 10 e 11 (ANSARI; AHMAD, 2019). A Figura 10 apresenta o crescimento em placa com característica uniformes, e teste de Gram (Figura 11) revela as características dos *Bacillus*, sendo Gram Positivos, no formato celular de bastonete (HUANG et al., 2011b; REY et al., 2004; HUSSEIN et al., 2019).

Figura 10 – Crescimento dos microrganismos isolados em placa, (a) *Bacillus licheniformis*; (b) *Bacillus subtilis*

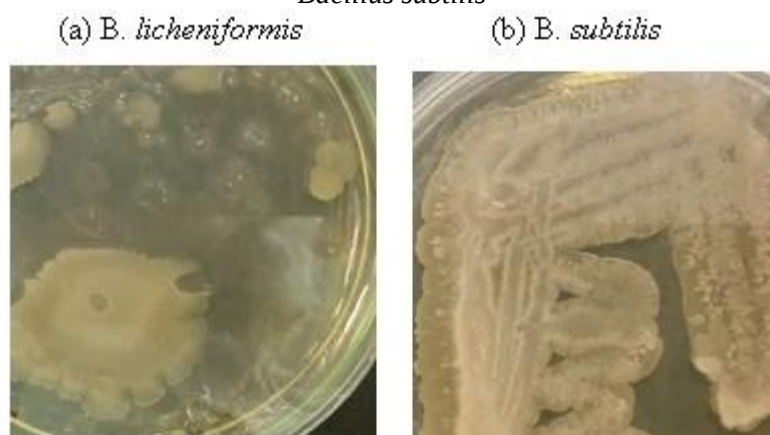
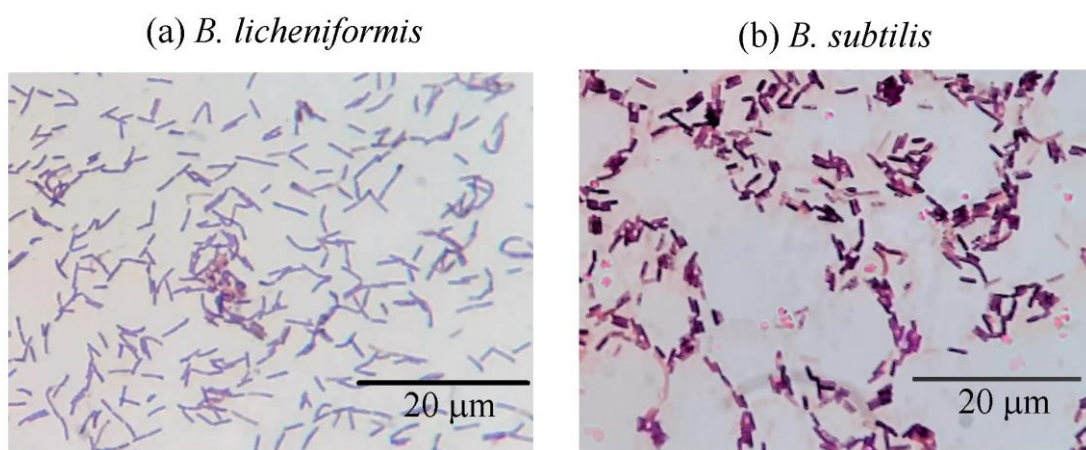


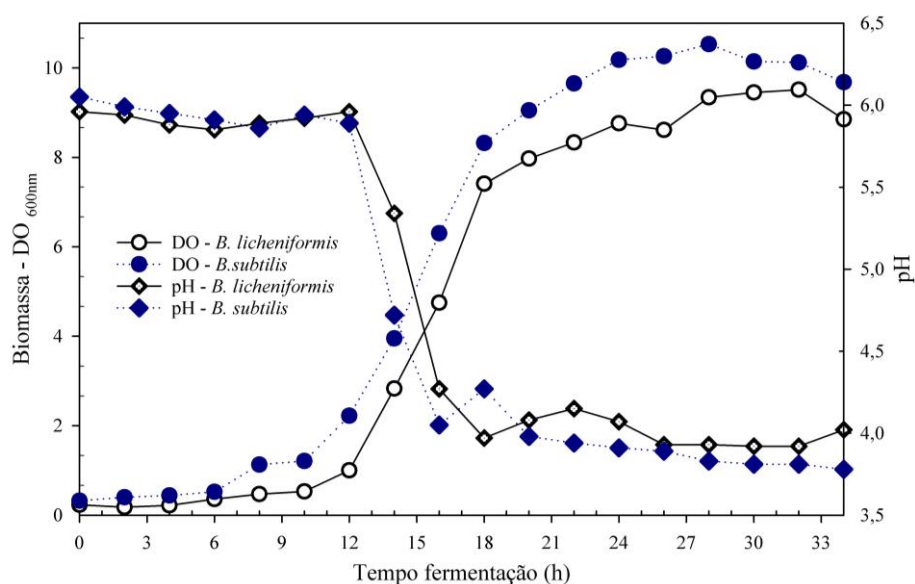
Figura 11 – Coloração de Gram: (a) *Bacillus licheniformis*; (b) *Bacillus subtilis*.



5.1.2 Avaliação do crescimento dos microrganismos

A Figura 12 apresenta a curva de crescimento e variação do pH em função do tempo em cultivo realizados em frascos. Pode-se observar que ambos os *Bacillus* atingem o ápice da fase exponencial após 16 horas de cultivo. O pH apresentou uma forte queda durante a fase exponencial de crescimento (até 15 h), mas também uma queda na fase de desaceleração do crescimento e início da fase de declínio. O pH progressivamente mais ácido pode ser devido a produção de γ -PGA a partir das fontes de carbono como glicerol e ácido glutâmico. Após 28 horas de cultivo pode-se observar uma redução da DO, indicativo da morte celular.

Figura 12 – Produção de biomassa e variação de pH dos microrganismos cultivados em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm

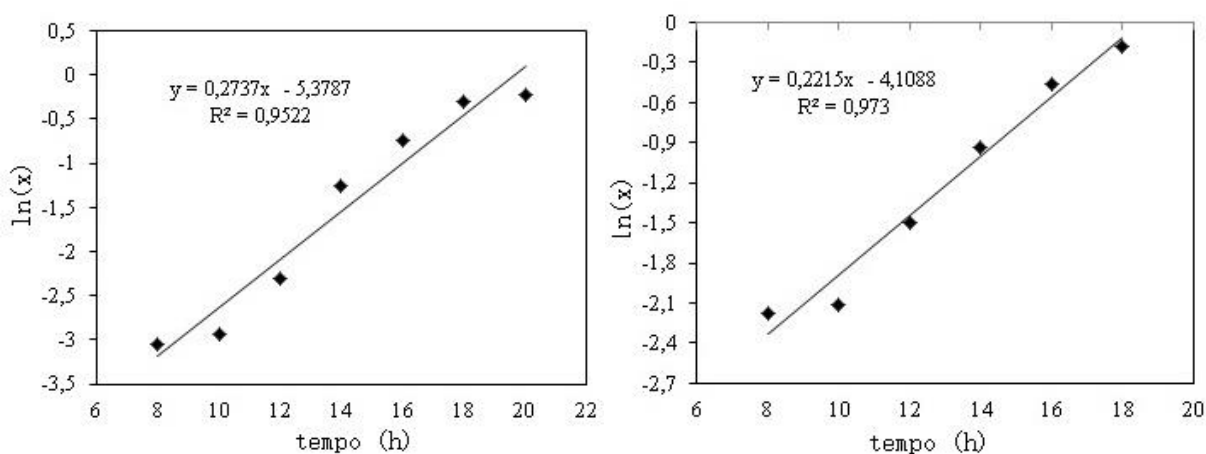


O objetivo desse teste preliminar foi verificar se havia alguma diferença na velocidade de crescimento entre as duas espécies microbianas, além de verificar o comportamento geral dos microrganismos no meio que foi definido para os estudos. De forma mais criteriosa, percebe-se que a fase exponencial é curta, e termina antes das 18 h de cultivo, provavelmente por limitações devido aos valores baixos de pH, além da falta de oxigênio. Depois desse tempo se observa um declínio na velocidade de crescimento, que se intensifica após 18 h.

A velocidade específica de crescimento (μ_x) foi determinada considerando uma extrapolação da fase exponencial até 20 h (Figura 13). Assim, uma aproximação da velocidade específica máxima de crescimento foi de $0,274 \text{ h}^{-1}$ para *B. licheniformis* e $0,221 \text{ h}^{-1}$ para *B. subtilis*. Essa velocidade específica de crescimento representa um tempo de duplicação de 2,52h para o *B. licheniformis* e 3,12h para *B. subtilis*.

Essas velocidades foram úteis para o planejamento dos cultivos em frascos Erlenmeyer, como também para os cultivos em biorreator. Entretanto, ficou claro a fragilidade do meio de cultura quanto a manutenção do pH e o provável efeito na limitação do crescimento, o que revela a necessidade do controle dessa variável.

Figura 13 – Determinação da velocidade específica de crescimento do *Bacillus licheniformis* (a) e *B. subtilis* (b). O eixo das abcissas é o tempo (h) e no eixo das ordenadas são os valores de $\ln(x)$. O valor do coeficiente linear da equação de ajuste representa o valor da velocidade específica de crescimento (h^{-1})



5.1.3 Avaliação da produção de γ -PGA em diferentes fontes de nitrogênio

A cinética de produção de γ -PGA e biomassa em três diferentes fontes de N está apresentada nas Figuras 14 a 16. Em todos os experimentos a produção máxima ocorreu em até 48 horas de cultivo, sinalizando o esgotamento dos recursos nutricionais, que pode ser pela falta de oxigênio e/ou de nutrientes essenciais para produção e excreção do biopolímero. No entanto, o rendimento de γ -PGA foi maior com o sulfato de amônio, de $0,215 \text{ g g}^{-1}$ para *B. subtilis*, e $0,157 \text{ g g}^{-1}$ para *B. licheniformis*, considerando a conversão de g de nutrientes de carbono (glicerol, glicose e ácido glutâmico) para g de γ -PGA produzidos.

A maior produção de γ -PGA pode ser justificada pelo fato de o sulfato de amônio possuir duas moléculas de nitrogênio em sua composição, que podem estar mais disponíveis que as duas moléculas de nitrogênio do nitrato de amônio, pela sua fácil dissociação, liberando também moléculas de enxofre importantes no desenvolvimento celular. O sulfato de amônio além de favorecer a produção de γ -PGA também é mais barato tanto com relação a outras fontes inorgânicas ou orgânicas.

Os melhores resultados na produção de γ -PGA em 48 horas correspondem ao *B. subtilis* em meio com cloreto e nitrato de amônio, 6,35 e 6,15 g L⁻¹ respectivamente, Figura 17.

Figura 14 – Produção de γ -PGA com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio no cultivo de *Bacillus licheniformis* (a), *B. subtilis* (b) em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm

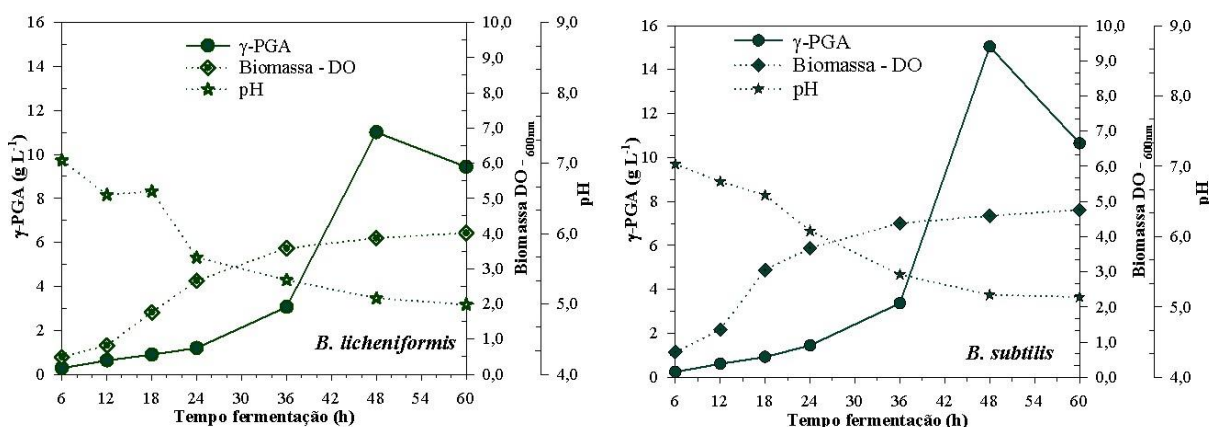


Figura 15 – Produção de γ -PGA com cloreto de amônio como fonte de nitrogênio no cultivo de *Bacillus licheniformis* (a), *B. subtilis* (b) em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm

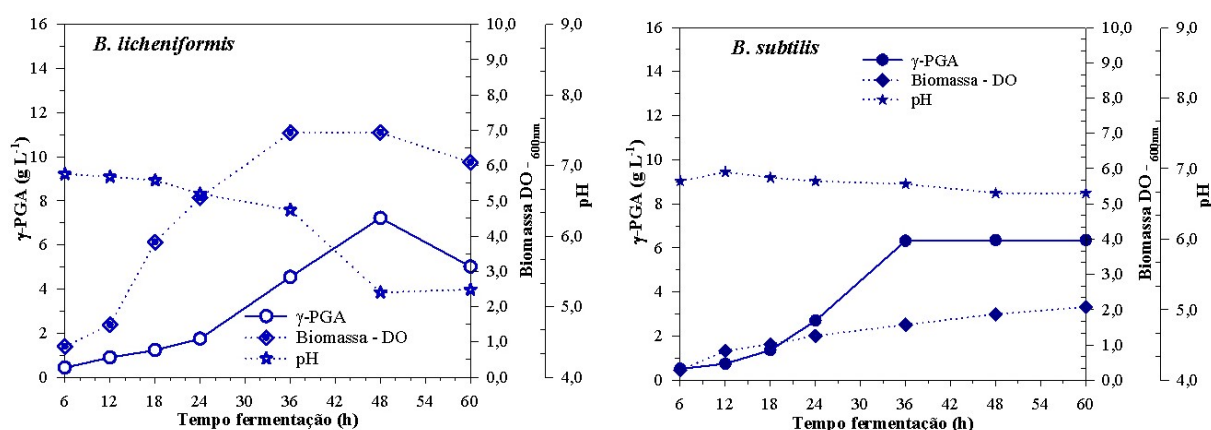


Figura 16 – Produção de γ -PGA com nitrato de amônio como fonte de nitrogênio no cultivo de *Bacillus licheniformis* (a) e *B. subtilis* (b) em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm

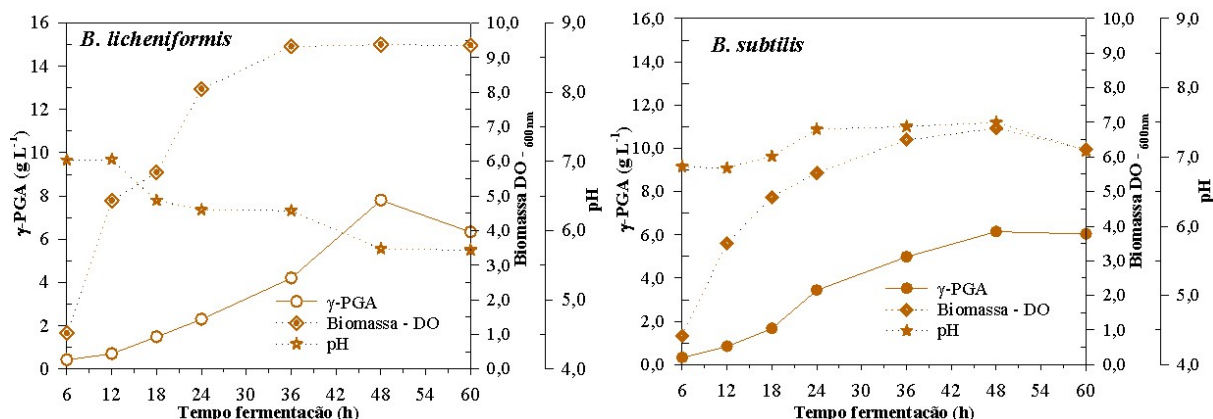
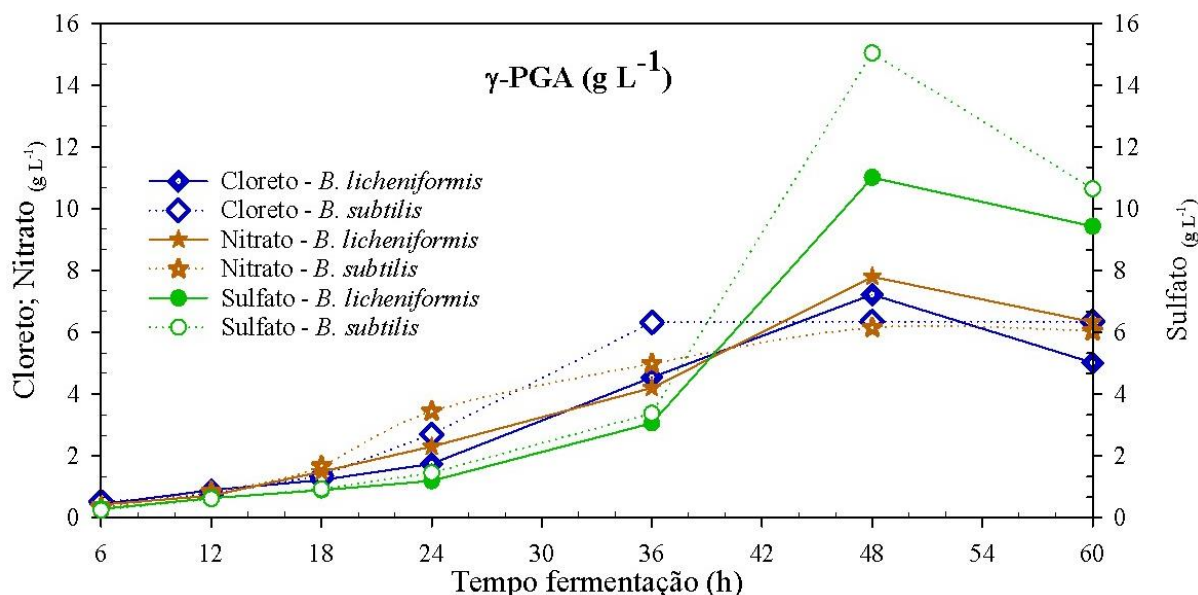


Figura 17 – Produção de γ -PGA com diferentes fontes de nitrogênio em cultivo com *Bacillus licheniformis* e *B. subtilis* em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm



Observa-se na figura 17, a produção de γ -PGA foi maior no meio suplementado com sulfato de amônio e menor em meio com nitrato de amônio, para o mesmo microrganismo *B. subtilis*. Porém, Shi et al. (2006) quase não obtiveram produção de γ -PGA com o sulfato, a maior produção foi obtida com nitrogênio orgânico a partir da triptona, enquanto Tork et al. (2015) apresentaram melhores resultados utilizando somente o ácido L-glutâmico como fonte de nitrogênio. O crescimento celular também foi distinto tanto para os diferentes meios como entre os microrganismos.

Na Figura 18 observa-se a produção de biomassa, onde o *B. licheniformis*, apesar da maior produção do biopolímero no meio com sulfato de amônio, apresenta um desenvolvimento

celular ligeiramente menor. Yu et al (2017) realizaram estudo onde a produção de γ -PGA foi reduzida com alimentação de glicose como fonte de carbono, enquanto o percentual de polissacarídeos aumentou, assim, utilizaram o método SWATH-MS (sequential window acquisition of all theoretical fragment-ion spectra) para esclarecer a regulação metabólica bacteriana em nível de proteína.

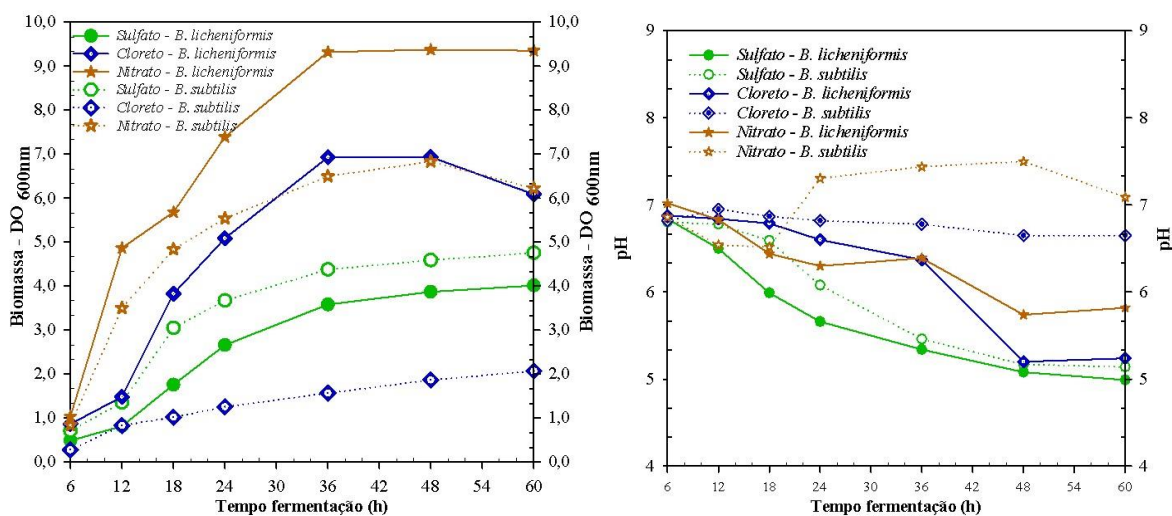
As proteínas de controle de carbono (CcpA e CcpN) detectadas, redistribuíram o fluxo de carbono de γ -PGA para a produção de polissacarídeo na presença de glicose. Concomitantemente, a proteína reguladora NrgB converteu o principal fluxo metabólico de nitrogênio de NH_4^+ em glutamato (YU et al., 2017).

É possível observar ainda uma cinética diferente no crescimento das células, o que reforça a necessidade de estudos genéticos dos *Bacillus* na produção de γ -PGA.

A análise de pH nesses experimentos apresentou correlação com a produção de γ -PGA, ou seja, houve uma similaridade com relação às mudanças no meio, com uma leve acidificação apesar do pH ter sido ajustado para 7,0 em todos os meios antes da esterilização. A exceção foi *B. subtilis* suplementado com nitrato de amônio, que apresentou leve alta no pH chegando a 7,5 em 48 horas, quando a produção de γ -PGA também apresentou valor máximo.

Esse comportamento é compreensível nos meios suplementados com nitrato de amônio. Nesse caso, o íon amônio do composto é primeiramente utilizado até a exaustão, acidificando o meio e posteriormente o nitrato é utilizado como fonte de nitrogênio, tornando o meio mais alcalino (STANBURY, 1995). No meio suplementado com sulfato de amônio percebe-se uma redução dos valores de pH mais pronunciada ao final do processo o que pode ser explicada pela maior quantidade de γ -PGA produzido (Figura 20).

Figura 18 – Crescimento celular e variação do pH com diferentes fontes de nitrogênio em cultivo com *B. licheniformis* e *B. subtilis*, frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm



5.1.4 Avaliação da produção de γ -PGA com diferentes fontes de carbono

5.1.4.1 Produção de γ -PGA em meio basal com adição de substratos ricos em carbono e n-heptano

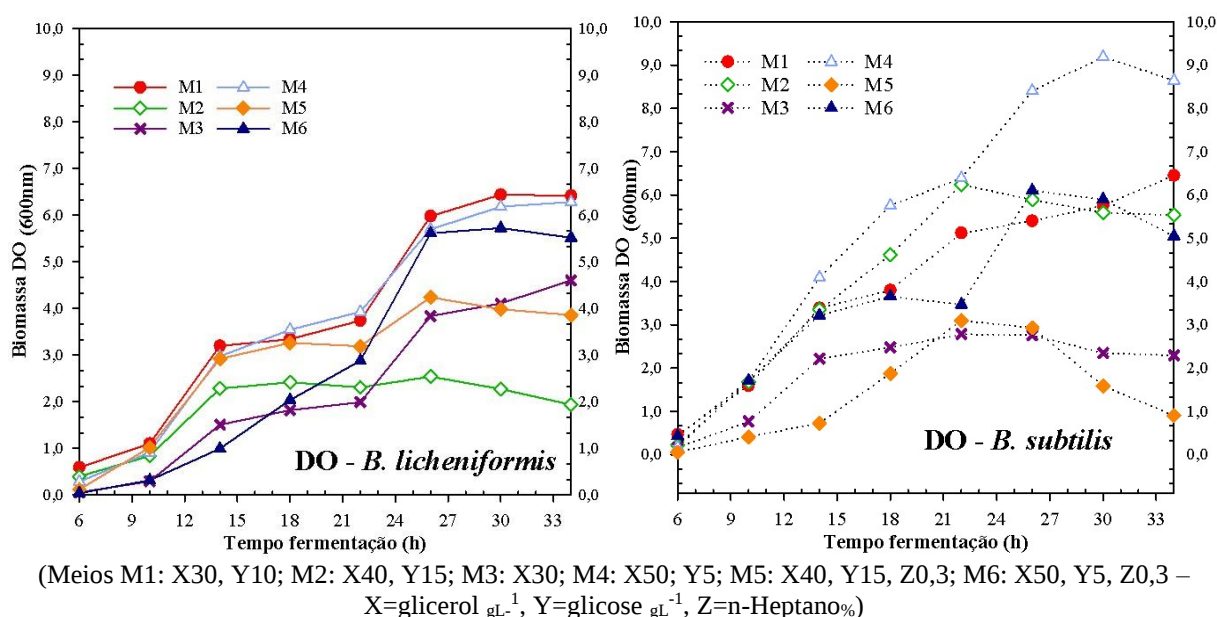
A principal diferença nesse experimento foi o tratamento com meio de cultura com substratos ricos em carbono, principalmente a glicose e o glicerol. A composição dos diferentes tratamentos é descrita na Tabela 2, onde aos meios M5 e M6 foram adicionados após inoculação 0,3% do solvente orgânico n-heptano para aumentar a solubilidade do oxigênio no meio.

Independente da formação do biopolímero, em todos os experimentos pode-se observar o crescimento da biomassa durante o cultivo (Figura 19). No entanto, nos experimentos com *B. licheniformis* e com os meios M2 e M5 observou-se um crescimento celular ligeiramente menor ao final do cultivo. Esses tratamentos foram suplementados com uma concentração de glicerol de 40 gL^{-1} e de glicose 10 gL^{-1} . Enquanto que no experimento com *B. subtilis* o meio M4, suplementado com 50 gL^{-1} de glicerol e 15 gL^{-1} de glicose, produziu mais biomassa ($9,19 \text{ gL}^{-1}$).

A análise do crescimento é importante pois o aumento do número das células pode interferir no pH, em maior consumo de substratos, entre outras alterações no meio de

fermentação que podem consequentemente afetar a produção de γ -PGA, considerando principalmente a produção do biopolímero associada ao crescimento celular.

Figura 19 – Crescimento celular em função do tempo de cultivo de *B. licheniformis* e *B. subtilis* em meio basal com diferentes tratamentos de nutrientes de carbono



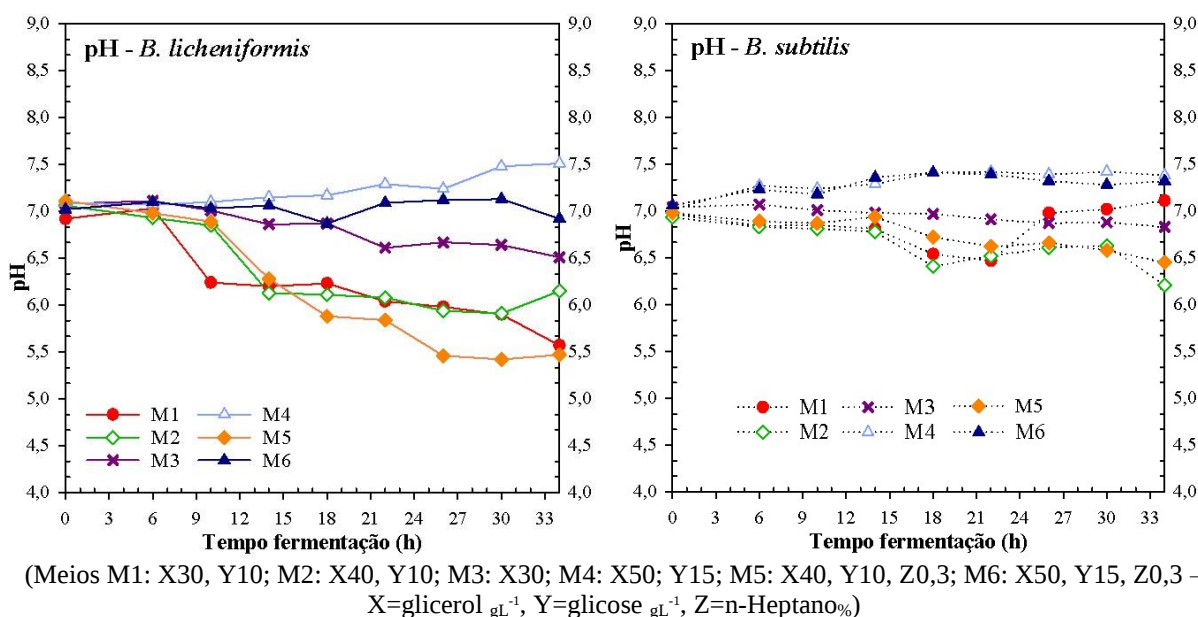
O pH nesse experimento apresentou variações em função do tempo de fermentação onde os meios sofreram alterações principalmente quanto à acidez à medida em que ocorria a produção de γ -PGA. Nos experimentos com cultivo de *B. subtilis* pode se observar um aumento no pH com os meios M4 e M6, ambos com 50 gL⁻¹ de glicerol e 15 gL⁻¹ de glicose. Observa-se também na Figura 20, uma diminuição do pH no meio com *B. licheniformis* nos meios M1, M2 e M5, suplementados com glicerol e 10 gL⁻¹ de glicose, embora a glicose quando metabolizada tende a reduzir o pH do meio, no tratamento M4 com concentrações mais altas de glicose o pH aumentou de 7,0 para 7,5.

Dessa forma, pode se observar uma interferência maior em função da suplementação com fontes de nitrogênio, a partir do consumo de nitrogênio, conforme analisado anteriormente, o meio pode apresentar um pH mais ácido quando os íons de amônio são consumidos e depois ser alcalinizado quando ocorre a conversão das fontes utilizadas, essas reações podem justificar as variações do pH durante o processo (TORK et al., 2015; WANG et al., 2015).

Quanto à variação de pH em função da produção de γ -PGA, esse comportamento foi mais evidenciado no cultivo com *B. licheniformis*, por outro lado, os tratamentos com maior

produção apresentaram valor de pH mais baixos. Segundo Wang et al. (2015), o estresse alcalino pode inibir a produção de γ -PGA com *B. subtilis*, enquanto pode ser favorável no cultivo com *B. licheniformis*.

Figura 20 – Análise do pH em função do tempo de cultivo de *B. licheniformis* e *B. subtilis* em meio basal com diferentes tratamentos de nutrientes de carbono



Conforme se observa na Figura 21, após 18h de cultivo com *B. licheniformis* ocorreu o esgotamento da glicose na maioria dos diferentes tratamentos, com exceção aos experimentos M2 e M6 onde a glicose foi esgotada somente após 21h de fermentação, embora possuíam diferentes concentrações iniciais de glicose. No cultivo com *B. subtilis*, o consumo da glicose foi mais lento, porém, com exceção ao meio M5, o carboidrato foi totalmente consumido ao final do cultivo, independente da concentração inicial dos experimentos.

No entanto, o consumo da glicose não foi proporcional à produção de γ -PGA, e essa dissociação com a formação do biopolímero pode estar relacionada à produção enzimática por genes específicos de alguns *Bacillus*, bem como às condições de processo, onde a glicose é direcionada para outras vias glicolíticas, conforme Yu et al. (2017).

O glicerol porém, foi consumido de forma mais gradual desde o início da fermentação, independente do tratamento. No entanto, após 22h de fermentação com *B. licheniformis* a velocidade de consumo foi reduzida. Importante lembrar que a concentração inicial de glicerol nos meios foi maior em relação à concentração inicial de glicose, também, a demora no

consumo total do glicerol, pode estar relacionada ao microrganismo, segundo Goto e Kunioka (1992) algumas linhagens de *Bacillus* podem ter preferência pela glicose por ser rapidamente convertida durante o processo (Figuras 21 e 22).

Outro fator que interfere no consumo dos substratos pode estar relacionado à genes específicos, conforme descrito por Hsueh et al. (2017) que descreve a dependência dos *Bacillus* por determinados nutrientes de carbono. Contudo, para ambos microrganismos, o residual de glicerol foi de mais de 9 gL⁻¹ mesmo após 30 horas de fermentação, embora a produção do biopolímero tenha cessado. Dessa forma, pode-se afirmar que a redução na produção de γ -PGA pode estar relacionada a outros fatores, como esgotamento da fonte de nitrogênio, redução do oxigênio dissolvido, pois não foi adicionado oxigênio ao experimento durante a fermentação, sendo esse nutriente essencial para o crescimento.

Figura 21 – Concentração de glicose em função do tempo de cultivo de *B. licheniformis* e *B. subtilis* em meio basal com diferentes tratamentos de nutrientes de carbono

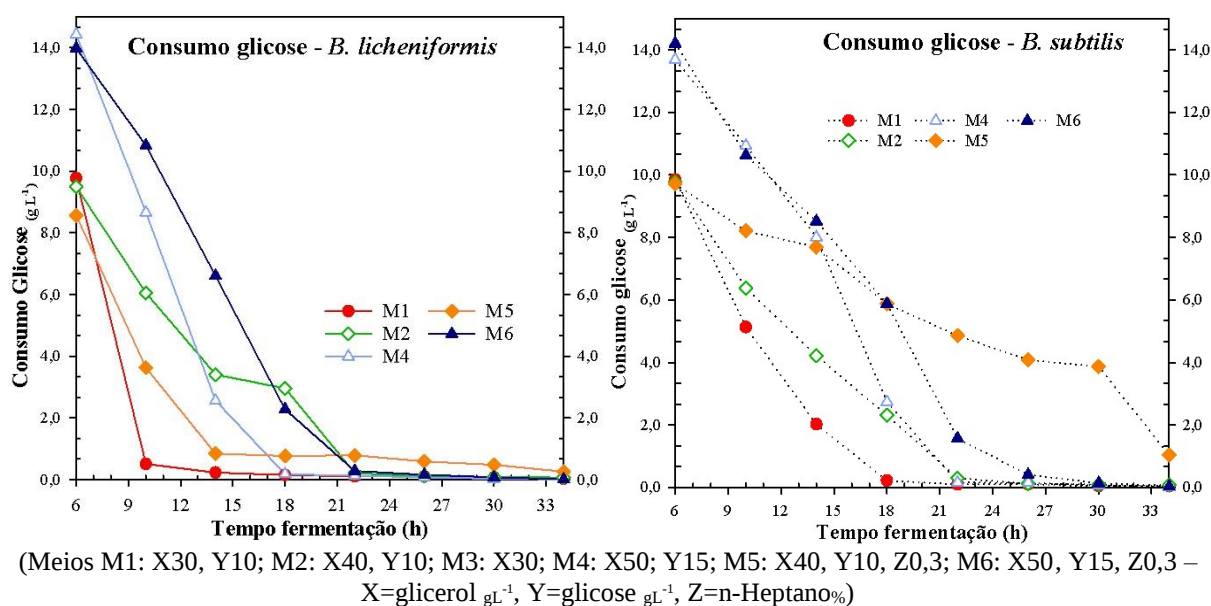
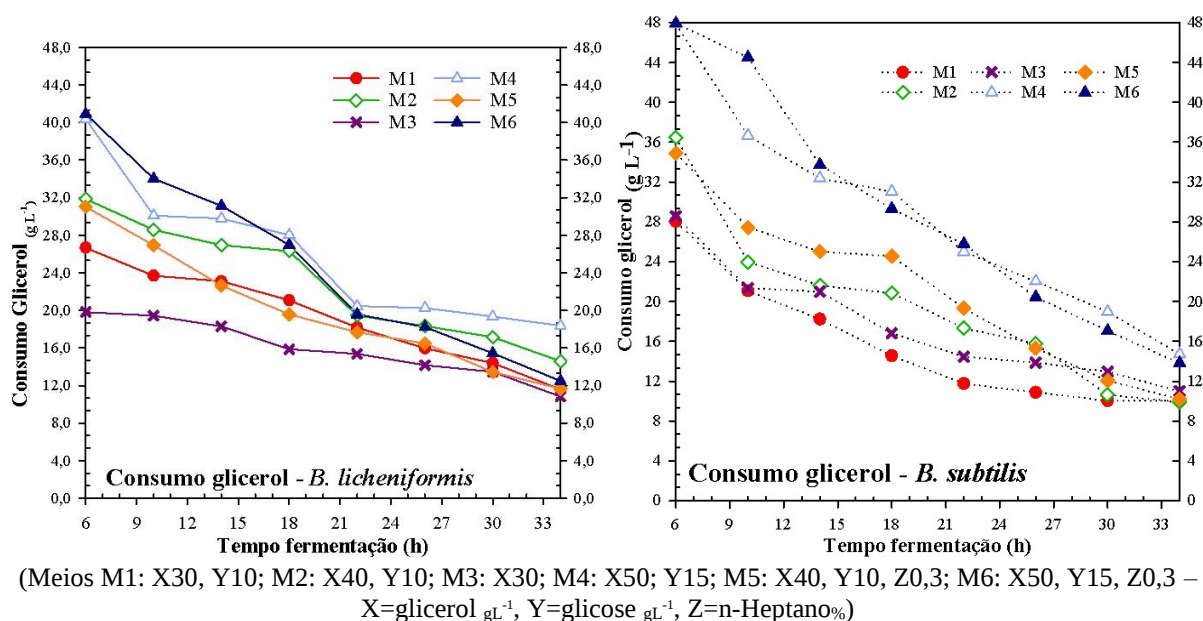


Figura 22 – Concentração de glicerol em função do tempo de cultivo de *B. licheniformis* e *B. subtilis* em meio basal com diferentes tratamentos de nutrientes de carbono



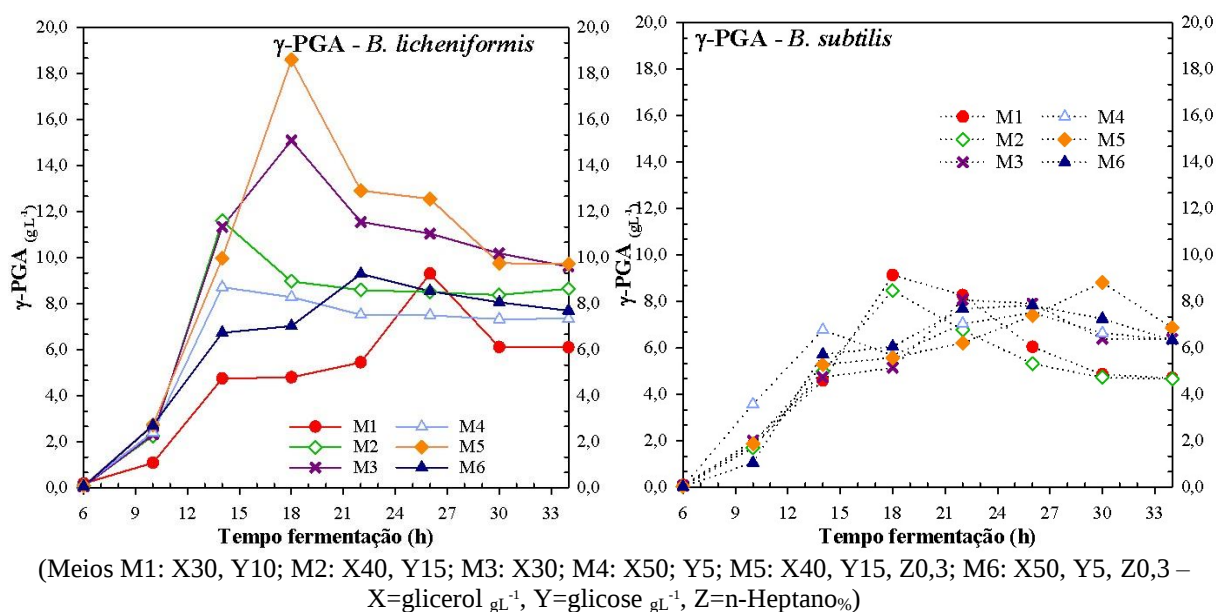
Apesar do crescimento da biomassa ter sido maior no tratamento com os meios M1 e M4, a produção de γ -PGA com *B. licheniformis* foi ligeiramente maior no meio M3 (lembrando que este meio não tem glicose na composição) e no meio M5, suplementado com 40 g L⁻¹ de glicerol e 10 g L⁻¹ de glicose, ao qual foi adicionado n-heptano no início da fermentação, a produção máxima de γ -PGA foi de 15,07 g L⁻¹ e 18,59 g L⁻¹, respectivamente (Figura 23). As condições de fermentação foram mantidas iguais em todos os tratamentos durante o experimento, assim, as variações na produção de γ -PGA podem ser justificadas em função das diferentes concentrações dos principais substratos de carbono de cada tratamento.

Nos experimentos cultivados com *B. subtilis*, a produção γ -PGA foi menor em comparação com *B. Licheniformis*. No entanto, quando se analisa a produção por microrganismo, para *B. subtilis* o meio M1 (glicerol 30 g L⁻¹, glicose 10 g L⁻¹) apresentou uma produção maior de γ -PGA (9,13 g L⁻¹), esse meio continha em sua composição o glicerol e a glicose, 30 g L⁻¹ e 10 g L⁻¹, respectivamente. Observa-se na Figura 25 contudo, pouca variação entre a produção de γ -PGA nos diferentes tratamentos de fontes de carbono no cultivo com *B. subtilis*.

No cultivo com *B. licheniformis* e meio M5 a produção de γ -PGA foi de 18,59 g L⁻¹ em apenas 18 horas de fermentação. Embora não seja possível afirmar a melhora na disponibilidade de oxigênio dissolvido com a adição de n-heptano, observa-se um aumento na produção de

γ -PGA nos tratamentos com adição de n-heptano com concentrações iguais de nutrientes de carbono e nitrogênio, sugerindo um efeito positivo que deve ser considerado.

Figura 23 – Produção de γ -PGA em função do tempo de cultivo com *B. licheniformis* e *B. subtilis* em meio basal com diferentes tratamentos de nutrientes de carbono



As Tabelas 3 e 4 apresentam os resultados da produção de γ -PGA, a produtividade e o rendimento do processo nos experimentos realizados com diferentes tratamentos de fontes de carbono, bem como a adição de n-heptano como vetor para o oxigênio.

Observe-se no cultivo com *B. subtilis* que o meio M1 apresentou melhor produção, produtividade e rendimento. No entanto, com o *B. licheniformis* os melhores resultados foram obtidos com o meio M5, esse meio foi suplementado com 40 g L⁻¹ de glicerol e 10 g L⁻¹ de glucose, além da adição de n-heptano. Na comparação entre os microrganismos, o *B. licheniformis* apresentou melhores resultados na produção de γ -PGA.

Nas condições dos experimentos com os diferentes tratamentos quanto às fontes de carbono, o cultivo com *B. licheniformis* apresentou baixa viscosidade e a produção da biomassa também foi menor quando comparada com o cultivo com *B. subtilis*. No entanto, a produção de γ -PGA foi muito maior no cultivo com *B. licheniformis*, a produção máxima de γ -PGA foi de 18,59 g L⁻¹ com *B. licheniformis*, enquanto que no cultivo com *B. subtilis* a produção máxima de γ -PGA foi de 9,13 g L⁻¹.

Observou-se ainda que o tratamento com diferentes fontes de carbono pode ser benéfico na produção de γ -PGA, pois o consumo dos recursos nutricionais pode ser direcionado à produção do biopolímero, melhorando a produtividade e o rendimento do processo, desde que as condições para a produção de γ -PGA sejam favoráveis também quanto ao pH do meio, a temperatura do processo de fermentação e ainda a disponibilidade de oxigênio dissolvido.

Também é importante considerar o consumo dos nutrientes com a produção de γ -PGA, pois com altas concentrações de nutrientes pode ocorrer sobra de nutrientes, ou a produção de subprodutos.

Tabela 3 – Resultados dos experimentos em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm, em fermentação com *B. subtilis* em meios com diferentes fontes de carbono

Tratamento	Tempo (h)	$P_{(\gamma\text{-PGA})}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	γ -PGA (g.L ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g _P .g _{subs} ⁻¹)
M1	18	0,507	9,13	0,152
M2	18	0,470	8,46	0,121
M3	22	0,367	8,07	0,115
M4	26	0,289	7,52	0,088
M5	30	0,294	8,82	0,126
M6	26	0,301	7,83	0,092

Tabela 4 – Resultados dos experimentos em frascos Erlenmeyer com agitação de 200 rpm, em fermentação com *B. licheniformis* em meios com diferentes fontes de carbono

Tratamento	Tempo (h)	$P_{(\gamma\text{-PGA})}$ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	γ -PGA (g.L ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g _P .g _{subs} ⁻¹)
M1	26	0,358	9,30	0,155
M2	14	0,828	11,60	0,166
M3	18	0,838	15,09	0,216
M4	14	0,623	8,72	0,103
M5	18	1,033	18,59	0,266
M6	22	0,422	9,20	0,109

5.2 Experimentos em biorreator *airlift*

5.2.1 Produção de γ -PGA com controles de pH e oxigênio dissolvido

Em processos essencialmente aeróbios, uma condição fundamental para a manutenção de um cultivo, além dos nutrientes, é a disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio. O fornecimento de oxigênio não foi possível nos experimentos realizados em frascos Erlenmeyer, dessa forma, optou-se pelo cultivo em biorreator *airlift*, onde foi possível a injeção de ar comprimido, aumentando a disponibilidade de oxigênio aos microrganismos. O uso do biorreator também permitiu o controle do pH, a manutenção da temperatura e melhor mistura, aumentando assim, também, a disponibilidade dos nutrientes à todas as células.

Nos experimentos realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, o *B. licheniformis* apresentou resultados melhores, considerando a produção de biomassa e produção de γ -PGA, dessa forma, o microrganismo foi utilizado nos experimentos em biorreator *airlift*.

A homogeneidade do meio, bem como a necessária oxigenação para o crescimento das células favorece as vias metabólicas para a produção de γ -PGA. A Figura 24 apresenta a produção de 15,21 g L⁻¹ do biopolímero em 19h de cultivo, e atingindo 21,31 g L⁻¹ após 27h do início do processo.

Os substratos glicerol e glicose foram reduzidos a aproximadamente 35% da concentração inicial, e o O₂ dissolvido caiu para menos de 10%, voltando a subir após a produção de γ -PGA reduzir (Figura 27). Conforme descrito no item 4.6, a temperatura foi mantida em 34±1 °C, o pH mantido em 7,0±0,2 pela adição de NaOH 0,2M ou H₂SO₄ 0,1M. A vazão de ar inicial do processo foi de 0,07 vvm e ajustada para 0,12 vvm ao final do cultivo para evitar o estresse dos microrganismos pela redução da disponibilidade de oxigênio dissolvido no meio.

Apesar do aumento do fluxo de ar, houve pouca formação de espuma, a qual foi atenuada com a adição de antiespumante poli-propilenoglicol, solução a 10%. Não se observou grande alteração da viscosidade, o que já era esperando, considerando a baixa viscosidade observada nos experimentos anteriores para o *B. licheniformis*. Nesse experimento observou-se ainda aumento da turbidez em função do crescimento das células e também uma leve alteração da coloração do meio para um amarelo claro, igualmente como observado nos cultivos com *B. licheniformis* em frascos Erlenmeyer.

Observou-se nesse experimento um aumento na produção de γ -PGA de aproximadamente 15% quando comparada aos experimentos em frascos agitados, com

rendimento de $0,304 \text{ g g}^{-1}$, embora a produtividade tenha sido menor ($0,789 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Esse resultado na produtividade pode ser justificado em função da melhor disponibilidade dos nutrientes aos microrganismos, pela introdução de ar comprimido, como também pela melhor homogeneização do meio em função da circulação externa do sistema.

Também se observou uma velocidade específica de crescimento dos microrganismos maior, $\mu_{\text{máx}} = 0,371 \text{ h}^{-1}$, porém, apesar da duplicação das células ocorrer em menos tempo, aproximadamente a cada duas horas, esse efeito não foi proporcional à produção de γ -PGA.

Outro fator observado, apesar da fermentação em biorreator *airlift* permitir a injeção de oxigênio através do ar comprimido, bem como contribuir com a homogeneização do meio permitindo uma maior disponibilidade de nutrientes aos microrganismos, a produção de γ -PGA reduziu após 30 horas de fermentação, enquanto havia um residual de substratos de carbono, o que sugere outros fatores limitantes à produção de γ -PGA além do oxigênio e controle de pH.

Figura 24 – Experimento 1: produção de γ -PGA *versus* crescimento de biomassa (a), produção de γ -PGA *versus* consumo de nutrientes de carbono (b) em cultivo com *B. licheniformis* em biorreator *airlift*

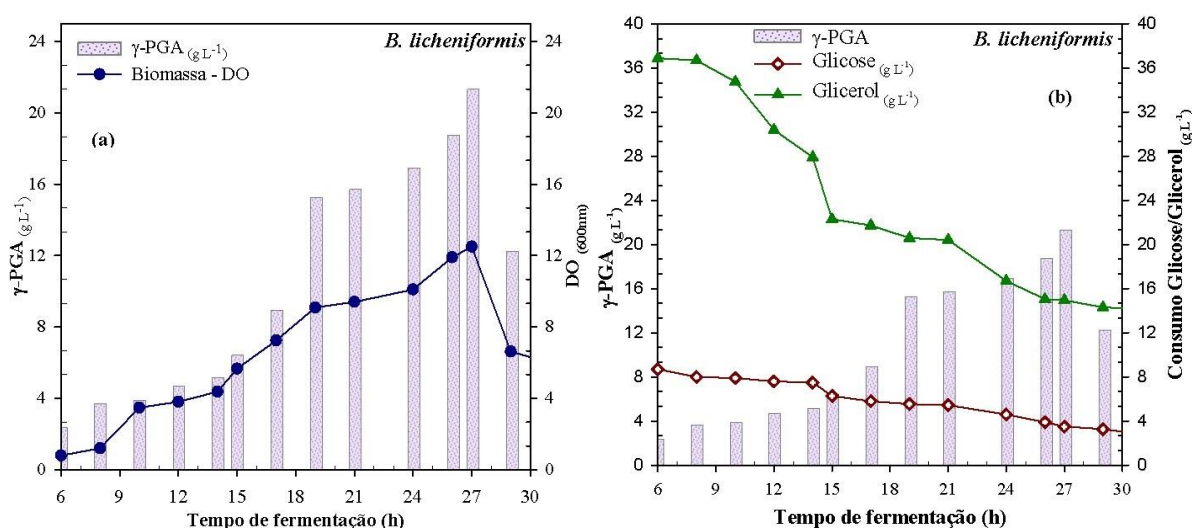
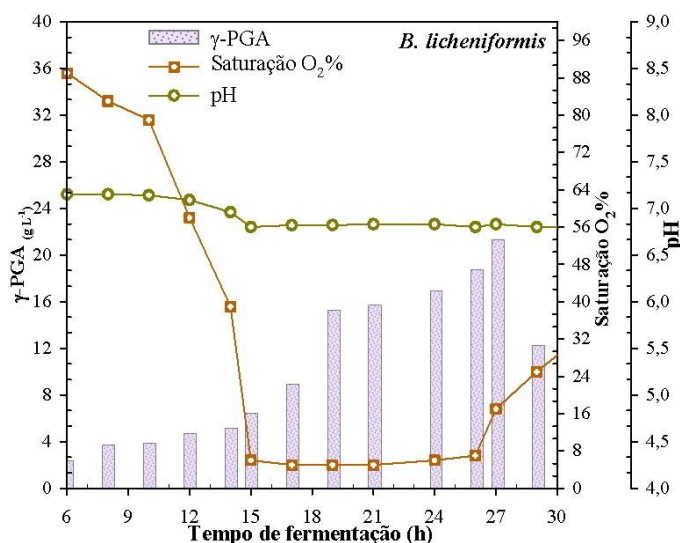


Figura 25 – Experimento 1: produção de γ -PGA versus O_2 dissolvido em cultivo com *B. licheniformis* em biorreator airlift



5.2.2 Produção de γ -PGA em batelada repetida suplementada com adições pontuais de glicose, glicerol e indutores do gene *pgsE*

Após 30 horas decorridas do experimento descrito no item anterior, foi removido 80% do caldo fermentativo, e adicionado meio de cultura fresco. A temperatura, pH e vazão de ar foram mantidos. O experimento foi conduzido de forma a manter os microrganismos ativos ambientados ao meio, no entanto, na Figura 26, pode-se observar que após 2 h de fermentação na batelada repetida (32^a h), a produção de γ -PGA foi discreta.

Com o objetivo de avaliar o crescimento celular, a variação no O_2 dissolvido e a produção de γ -PGA com interferências pontuais nas concentrações dos nutrientes, foram adicionados 100 mL de uma solução contendo 7,5 g de ácido L-glutâmico e em 36h foram também adicionados 100 mL de uma solução contendo 6,0 g de glicose, equivalendo a 3,2 g L e 2,55 g L no volume de fermentação, respectivamente.

Embora, segundo as análises, o meio de cultura ainda possuir nutrientes de carbono, a partir dessas adições pontuais observou-se uma brusca diminuição do percentual de OD, baixando de 98% para 4,0% (Figura 27), e a produção de γ -PGA após 40h de fermentação atingiu 16,44 g L⁻¹. Ainda que o consumo de glicose em 36h tenha sido de 54% e glicerol de apenas 23%, não houve alteração na produção de γ -PGA. Porém, após 68h observou-se um

residual de apenas 4,03 g L⁻¹ de glicose e 7,26 g L⁻¹ de glicerol, sem alteração significativa no percentual de O₂ dissolvido, sendo a produção de γ -PGA de 22,15 g L⁻¹.

Com a adição dos indutores do gene *pgsE*, cloreto de cálcio e sulfato de zinco 1 g L⁻¹, que ativam a síntese de γ -PGA, a produção máxima de γ -PGA foi de 23,32 g L⁻¹, o que corresponde à um aumento de 25% na produção quando comparada aos experimentos em frascos agitados. A produtividade calculada considerando o tempo da batelada repetida foi de 0,678 g L⁻¹ h⁻¹, com rendimento de aproximadamente 0,4 g g⁻¹.

Ao final do processo, os residuais de glicose e glicerol eram baixos, no entanto a produção de γ -PGA não foi inversamente proporcional, assim como o crescimento da biomassa. Dessa forma, conforme a literatura descreve, é possível a formação de subprodutos não investigados nesse processo (YU et al., 2017). O que sugere uma nova investigação com maior controle nutricional bem como um maior controle no crescimento celular.

Figura 26 – Experimento 2: produção de γ -PGA *versus* crescimento de biomassa (a), produção de γ -PGA *versus* consumo de nutrientes de carbono (b) em cultivo com *B. licheniformis* em biorreator *airlift*

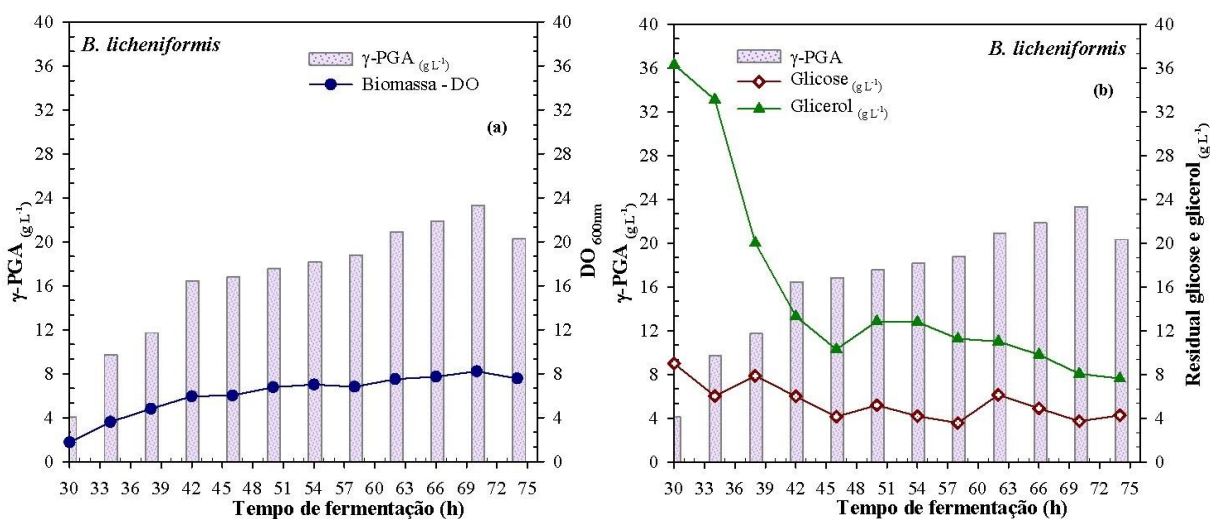
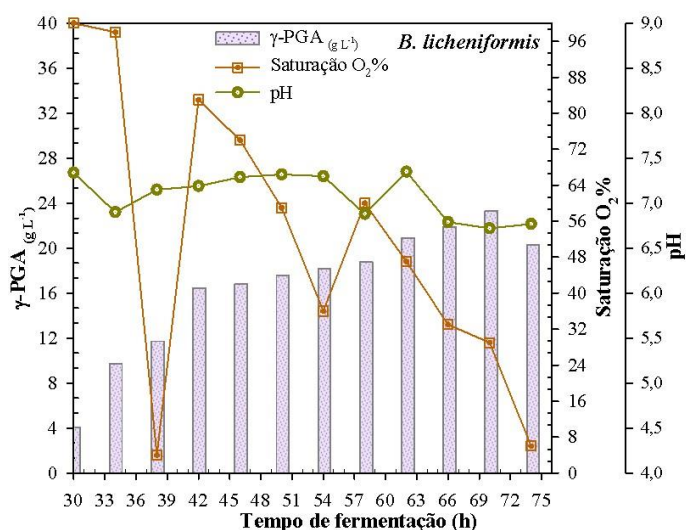


Figura 27 – Experimento 2: produção de γ -PGA versus O_2 dissolvido em cultivo com *Bacillus licheniformis* em biorreator airlift



5.2.3 Produção de γ -PGA em fermentação com alimentação contínua de meio de cultura

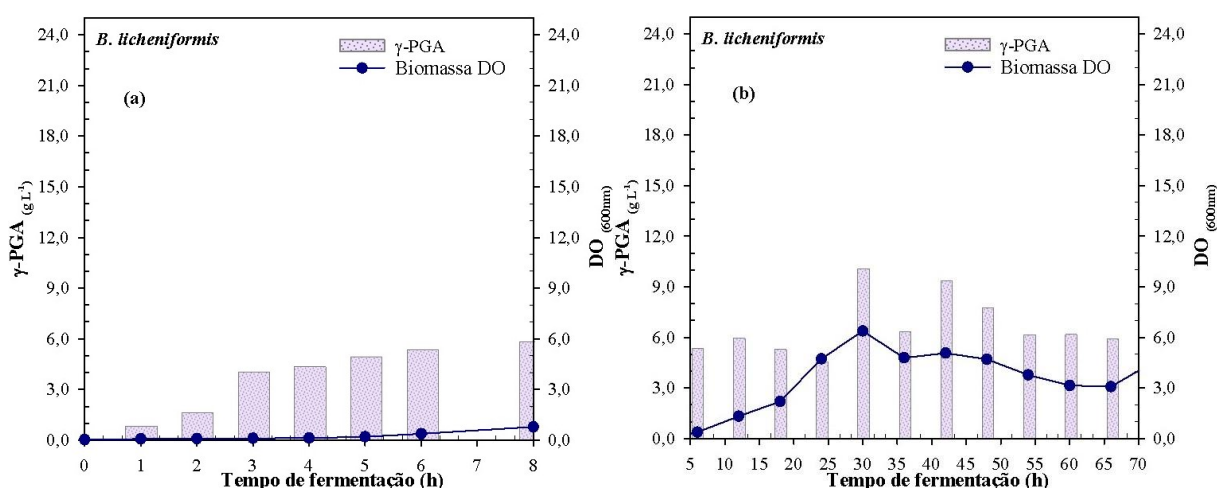
No experimento em biorreator com alimentação contínua, as condições do processo foram mantidas, como o controle de pH $7,0 \pm 0,4$, controle da temperatura 34 ± 1 °C e injeção de ar comprimido (vazão específica do ar em 0,10 vvm). A alimentação de nutrientes foi iniciada após 6 horas de fermentação com vazão de 13 mL min^{-1} ($D=0,339 \text{ h}^{-1}$), quando a velocidade específica de crescimento das células era de $0,244 \text{ h}^{-1}$. No cultivo com alimentação contínua sem o reciclo de células, a velocidade específica de crescimento celular foi calculada a partir de $\mu = D$, como sendo então, $\mu = 0,339 \text{ h}^{-1}$.

Assim, estimou-se a duplicação das células em aproximadamente 2 horas, este ciclo foi mantido no decorrer do experimento (Figura 28). Dessa forma, constatou-se que o processo de *washout* foi discreto, ou seja, $D > D_c$ (FACCIOTTI, 2001), onde as análises realizadas nas amostras da saída/dreno apresentaram valores iguais ou inferiores de biomassa com relação à amostragem no centro da coluna do biorreator, assim manteve-se células em condição para a produção de γ -PGA. Pode-se observar na Figura 28 uma produção de γ -PGA mesmo quando a variação da biomassa tenha sido menor.

O pH foi controlado pela adição de ácido ou base sempre que havia alteração do valor parametrizado para mais ou para menos, assim a variação do pH foi discreta, apesar do controle do pH pode-se observar na Figura 29 algumas oscilações, que podem ser justificadas em função

da produção de γ -PGA, como também pela dissociação do sulfato de amônio durante seu consumo, bem como pela alimentação e consumo dos demais nutrientes. Em função das propriedades do γ -PGA o meio se torna mais ácido durante a sua produção, assim como o sulfato de amônio usado como fonte de nitrogênio também gera acidez enquanto o íon amônio é consumido. Dessa forma, o pH foi constantemente controlado pela adição de hidróxido de sódio 0,2N.

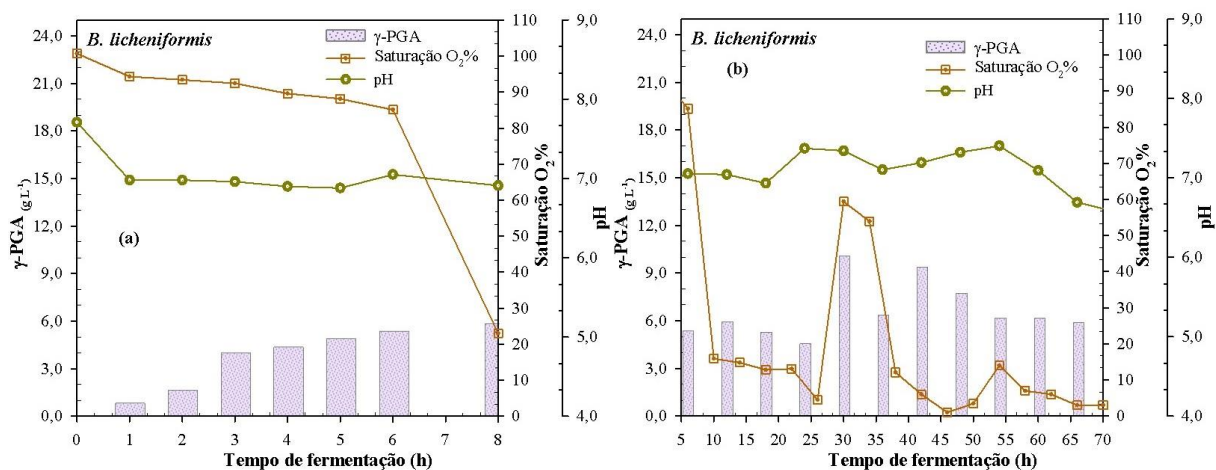
Figura 28 – Experimento 3: produção de γ -PGA *versus* a variação do crescimento de biomassa, etapa inicial batelada (a), etapa alimentação contínua (b), em cultivo com *B. licheniformis* em biorreator *airlift*



A Figura 29 apresenta além da variação do pH, o percentual em relação a saturação de O₂ durante o processo. É possível observar três momentos de queda mais acentuada no OD, essas oscilações observadas na Figura 31 justificam-se em parte, em função de ajustes necessários na vazão de entrada de ar que foi aumentada para 0,28 vvm para manter o percentual de saturação de O₂ acima de 10%, ainda assim, após 25 horas de processo a saturação baixou para 4,5%, a vazão foi então novamente ajustada, para 0,56 vvm após 45 horas de fermentação.

O crescimento celular, bem como a produção de γ -PGA após 50 horas de fermentação foram constantes, apesar da redução no percentual de saturação de oxigênio. Também não foi observada visualmente uma alteração do aspecto do meio de cultivo com relação à viscosidade, a formação de espuma, bem como a coloração do meio que se manteve levemente amarelada.

Figura 29 – Experimento 3: produção de γ -PGA *versus* percentual de saturação de O_2 e variação do pH, etapa inicial batelada (a), etapa alimentação contínua (b), em cultivo com *B. licheniformis* em biorreator airlift

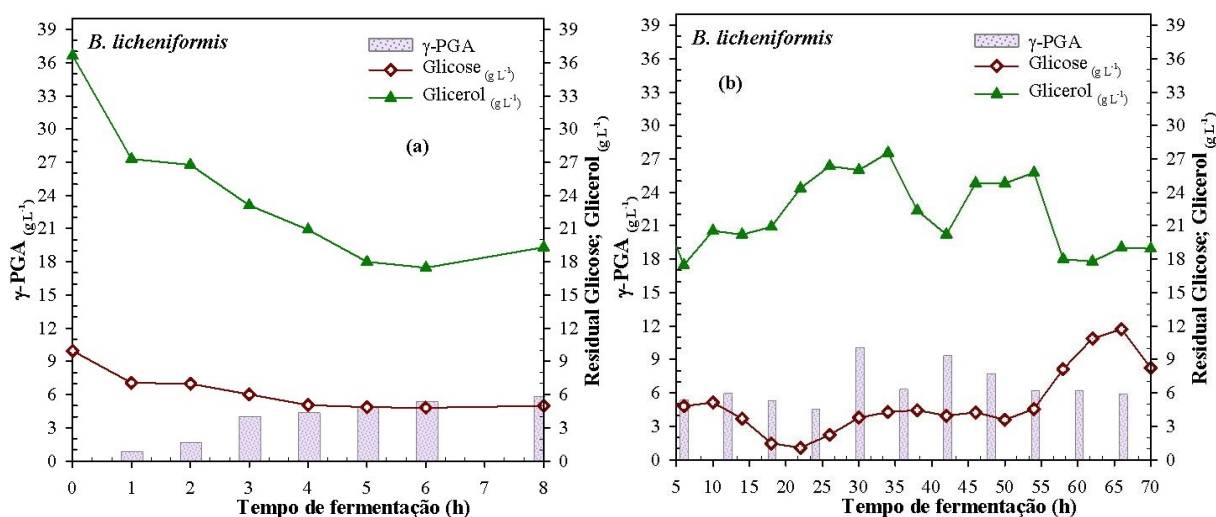


Na análise do consumo de glicose e glicerol, ambos precursores do γ -PGA, observou-se um consumo médio, conforme a Figura 30, de 45% de glicose (aproximadamente 4,59 g L⁻¹) e 43% de glicerol (aproximadamente 17,37 g L⁻¹) durante o cultivo. Lembrando que a vazão de entrada de nutrientes foi a mesma vazão de saída, sem o reciclo de células e sem o retorno dos nutrientes não utilizados no cultivo. Contudo, novamente o consumo de carbono não foi inversamente proporcional à produção de γ -PGA.

Também se observou após 70 horas de fermentação um grande volume residual dos nutrientes de glicose e glicerol e baixa concentração de γ -PGA. Esse cenário pode ocorrer ainda em função de outras variáveis, considerando que o experimento ainda apresentava um crescimento celular, porém com baixa concentração de oxigênio dissolvido, apesar do aumento na vazão de ar comprimido.

Assim, é possível a produção de outros compostos, como enzimas, muito estimuladas em processos industriais com bacilos e fontes nutricionais de carbono, bem como a formação de outros polissacarídeos.

Figura 30 – Experimento 3: produção de γ -PGA *versus* o consumo de nutrientes de carbono, etapa inicial batelada (a), etapa alimentação contínua (b), em cultivo com *B. licheniformis* em biorreator *airlift*



Tang et al (2015) obtiveram 73 g L^{-1} de γ -PGA com rendimento de $0,811 \text{ g g}^{-1}$, a fermentação foi iniciada com xilose e alimentação contínua de glicose com sistema fechado. Quando esgotado a xilose, segundo o estudo, a produção máxima ocorreu após 90 horas de fermentação, com o esgotamento da glicose. Nair et al. (2021), apresentam numa revisão diferentes resultados na produção de γ -PGA, onde se observou uma produtividade de até $2,42 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em estudo com *B. subtilis* em fermentação batelada. Em outro experimento o artigo apresenta uma produtividade de γ -PGA de até $2,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ em batelada alimentada com *B. siamensis* IR10 e *Bacillus* sp.

Nos experimentos realizados nesse estudo (experimento 3), observou-se a produção de $13,81 \text{ g L}^{-1}$ de γ -PGA em 46h de fermentação, conforme as Figuras 28 a 30. A produtividade nesse experimento foi de $2,45 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, com rendimento de $0,507 \text{ g g}^{-1}$, considerando todas as fontes de carbono adicionadas ao meio, sendo superior aos experimentos anteriores, considerando aqui a produção contínua da fermentação.

Nesse ensaio também se observou um residual das principais fontes de carbono analisadas, chegando à 42% de glicerol e até 65% de glicose. Dessa forma, um novo ensaio foi realizado com uma concentração mais reduzida de nutrientes e minerais, bem como uma vazão de alimentação menor, aumentando o tempo para a duplicação das células.

Esse residual é um fator importante para ser considerado, pois eleva o custo de produção pela não conversão de substrato em produto desejado, como também pode resultar

em custo no tratamento de efluentes, então um novo experimento foi realizado com uma concentração de substratos ainda mais reduzidos em relação à concentração inicial dos experimentos em biorreator.

Dessa forma, na sequência são apresentados os resultados do experimento que foi conduzido com uma vazão de alimentação de nutrientes ajustada em 8 mL min^{-1} , iniciada após 8 horas de fermentação em meio com baixa concentração de substratos, considerando as análises de DO_{600} , o consumo de substratos e também a saturação de O_2 . As informações do meio de cultura estão apresentadas na metodologia, com a concentração inicial de 30% dos substratos e demais minerais e nutrientes para o meio base de cultivo utilizado no biorreator airlift, adaptado de Jeong (2010).

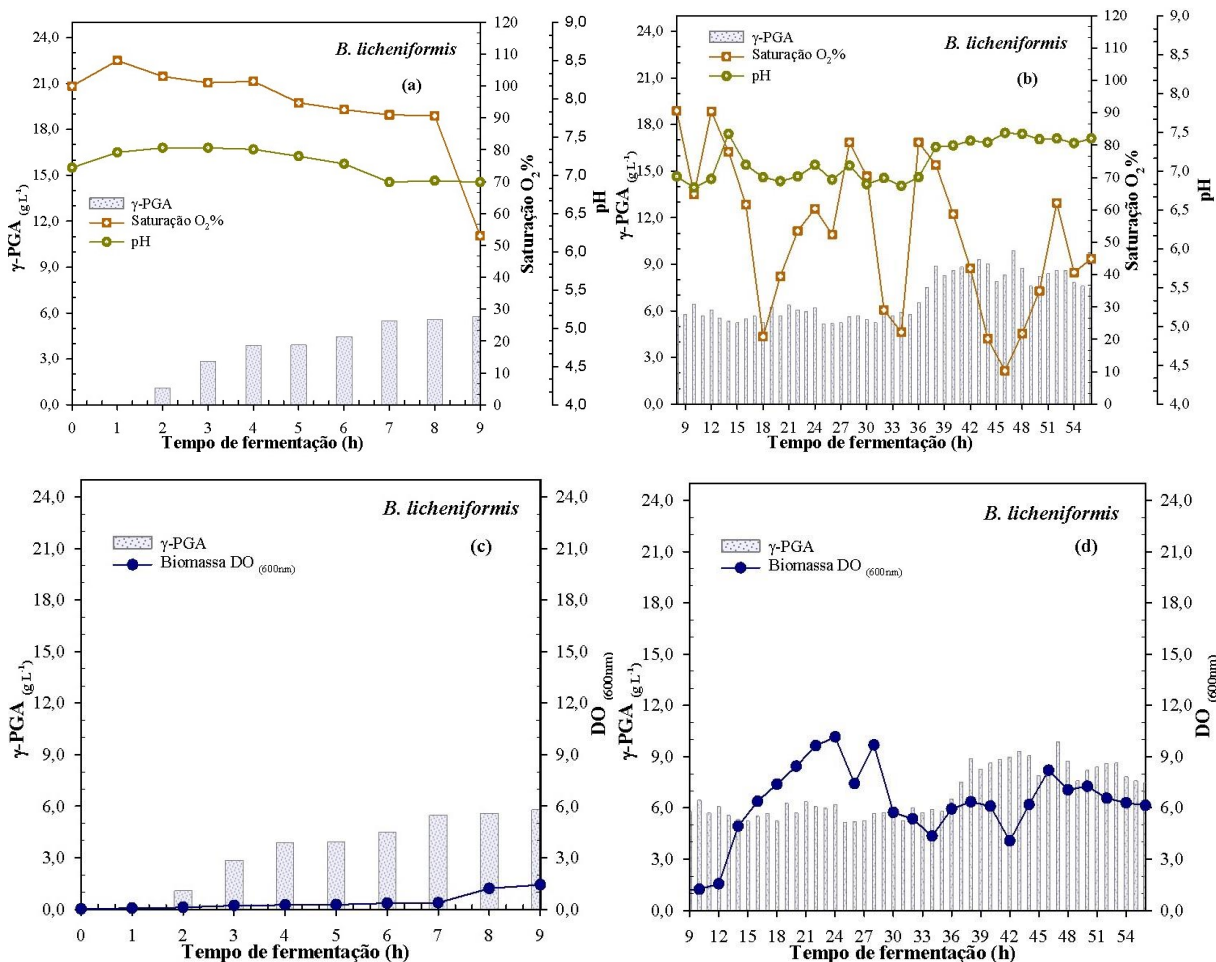
Conforme se observa na Figura 33, o OD nesse cultivo oscilou bastante no período de alimentação contínua, isso pode ser devido à constante alimentação de nutrientes, mas também pelos ajustes na vazão de entrada do ar pressurizado sempre que o percentual do O_2 estava abaixo de 10%.

A mesma variação ocorreu com a produção de biomassa analisada por DO_{600} e nas leituras de pH. A velocidade específica de crescimento de $0,315 \text{ h}^{-1}$ foi determinada antes do início da alimentação, lembrando que para a verificação de possível *washout*, foram realizadas além da análise de DO das amostras do biorreator, também a análise de amostras da corrente de saída (dreno) do biorreator.

As análises apresentaram uma boa quantidade de células saudáveis no teste Gram e mais biomassa na amostragem do biorreator em comparação com as amostras de saída/dreno, apesar da oscilação de biomassa conforme as Figura 31, estimou-se a duplicação das células em aproximadamente 3h com $D = \mu_{\text{máx}}$. O pH foi controlado com a adição de NaOH 0,2N sempre que o valor estava abaixo de 6,6 e quando acima de 7,4 foram adicionados automaticamente H_2SO_4 0,1N (Figura 31), assim, é possível observar as variações no meio até o ponto de ajuste pela adição de ácido ou base durante a fermentação.

No entanto, ao final da cultivo observou-se a tendência de basificar o meio de cultura. Nesse ponto é possível que todo o nitrogênio tenha sido consumido, apesar do meio de cultivo de alimentação conter além de ácido L-glutâmico, o sulfato de amônio.

Figura 31 – Experimento 4: produção de γ -PGA *versus* percentual de O_2 dissolvido em relação à saturação e variação do pH na etapa inicial de batelada (a). Etapa de alimentação contínua (b). Variação do crescimento na etapa inicial batelada (c). Etapa alimentação contínua (d), em cultivo com *B. licheniformis* em biorreator *airlift*



Com relação ao consumo de substratos e a produção de γ -PGA observa-se na Figura 32 um residual baixo de substratos especialmente de glicose mesmo após o início da alimentação de nutrientes, no entanto, a disponibilidade reduzida de nutrientes não limitou a produção de γ -PGA. Percebe-se, dessa forma, o equilíbrio no consumo desses substratos sem acúmulo de nutrientes.

A produção se manteve constante durante a fermentação, foram produzidos em média 7,33 g L⁻¹ de γ -PGA considerando a produção a partir do início da alimentação contínua, em $D = \mu_{\text{máx}}$. Assim, a produção total do processo foi estimada em mais de 350 g de γ -PGA, caso todo o meio fosse aproveitado, em 58 horas de fermentação e o rendimento desse experimento foi de 0,678 g g⁻¹, considerando a soma de todas as fontes de carbono adicionadas ao meio.

A partir do rendimento de $0,678 \text{ g g}^{-1}$ e da produtividade de $2,31 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ observados nesse experimento, pode-se analisar esse processo como uma alternativa para a produção de γ -PGA, considerando o uso de equipamentos de baixo custo, quando comparados aos outros modelos de fermentadores.

A utilização de substratos de baixo custo, facilmente disponíveis no mercado, com boas concentrações de carbono e nitrogênio. Também pode ser considerado nessa análise o bom desempenho das bactérias, tanto do *B. licheniformis* como o *B. subtilis* são resistentes, de fácil replicação e manutenção, além de ambos já serem amplamente utilizados na indústria, bem como no agronegócio.

O experimento com a alimentação contínua de nutrientes, com baixa vazão de alimentação, como também baixa concentração de nutrientes, também favoreceu a produção de γ -PGA, tornando o processo ainda mais interessante economicamente.

Uma particularidade desse processo ocorreu com a alteração de cor do meio, das 19 horas até 36 horas, o meio tornou-se rosa/salmão (Figura 33), após esse período a produção de γ -PGA foi ligeiramente superior, média de $8,36 \text{ g L}^{-1}$ de γ -PGA. O consumo de substratos se manteve, uma hipótese pode ser uma outra via metabólica com produção de outros polissacarídeos e/ou proteínas.

A produção de enzimas pelos microrganismos utilizados combinados aos substratos ricos em carbono é bastante estudada e aplicada por indústrias de diversos setores, em especial na indústria de alimentos e produtos farmacêuticos. Algumas enzimas como as proteases, mananases e glucanases são facilmente produzidas pelos bacilos e são caracterizadas como enzimas hidrolíticas (OORT, 2010; OLIVEIRA et al., 2016).

Figura 32 – Experimento 4: produção de γ -PGA *versus* o consumo de nutrientes de carbono, etapa inicial batelada (a), etapa alimentação contínua (b), em cultivo com *B. licheniformis* em biorreator *airlift*

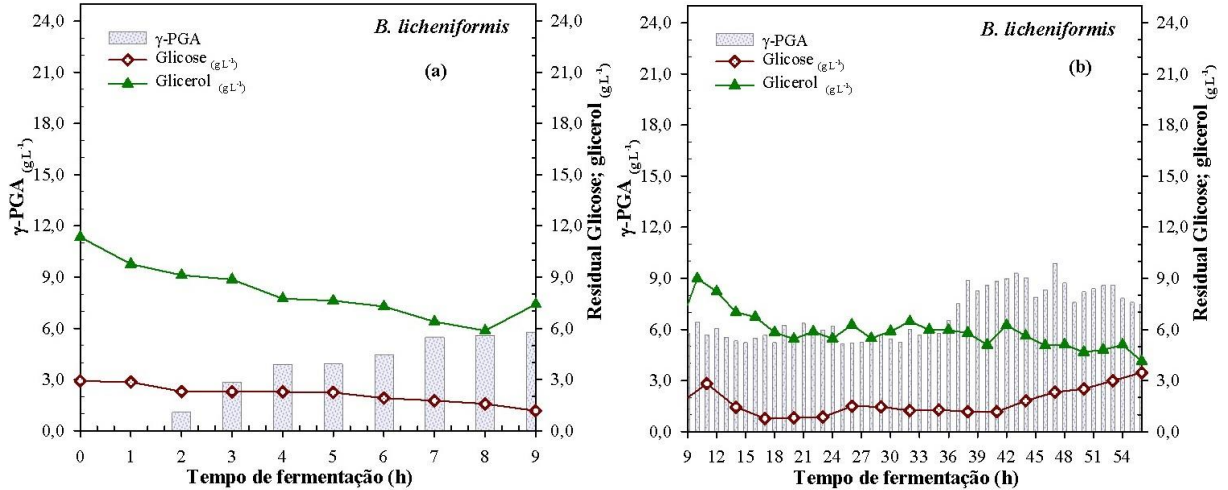
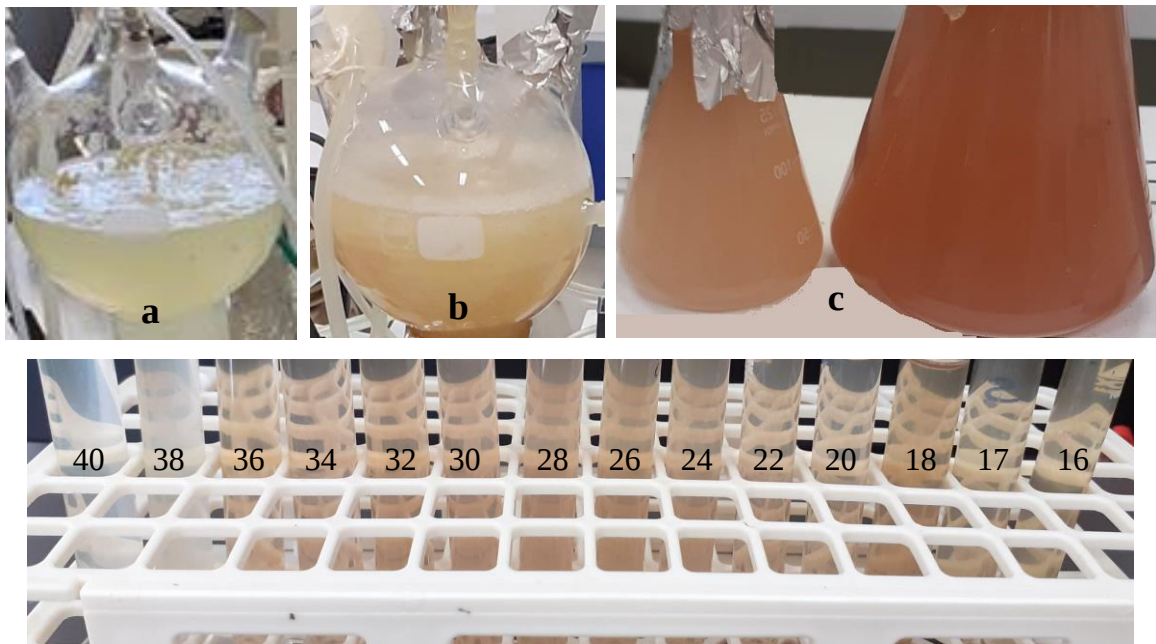


Figura 33 – Experimento 4: Alteração da coloração no meio de cultivo com *B. licheniformis* em biorreator *airlift*. Tempo de fermentação, (a) 39 horas; (b) 19 horas; (c) 25 horas. Tubos, amostras de 40 a 16 horas



Fonte: Acervo pessoal

A Figura 34 apresenta imagem do cultivo em biorreator *airlift*, onde pode-se observar a formação de bolhas pelo fluxo de ar ascendente. O processo contribuiu para a produção de γ -PGA sem alterações significativas na viscosidade do meio, facilitando a constante homogeneização do líquido no interior do biorreator, mantendo assim as condições de temperatura e disponibilização de nutrientes para todas as células presentes no meio. Para reduzir a formação de espuma foi adicionado no decorrer da fermentação o poli-propilenoglicol.

Figura 34 – Produção de γ -PGA em biorreator *airlift*, sistema em funcionamento com coloração amarelo claro, sem formação excessiva de espuma



Fonte: Acervo pessoal

As Tabelas 6 e 7 apresentam o resumo com melhores resultados de rendimento obtidos na produção de γ -PGA, bem como a produtividade nos experimentos com *B. licheniformis* e *B. subtilis*. Os melhores resultados desse estudo foram obtidos a partir de experimentos com meios suplementados com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio para a produção do biopolímero. Com relação ao rendimento, os experimentos em biorreator e meios de cultivo com menores concentrações de substratos apresentaram maior produção, bem como maior produtividade.

Com base nestes resultados observou-se a influência dos diferentes substratos para as vias metabólicas às quais os microrganismos se desenvolvem e secretam o γ -PGA ou outros polissacarídeos (YU et al., 2017). As mesmas condições com pequenas alterações nas fontes de nitrogênio e/ou carbono apresentaram diferenças no crescimento celular, bem como na produção de γ -PGA. A adição de cofatores, ativadores enzimáticos também interferiu na produção de γ -PGA, favorecendo a produtividade e o rendimento.

Nos experimentos desse estudo não foram realizadas análises filogenéticas dos *Bacillus*, que poderiam elucidar com mais precisão os diferentes resultados, nos meios e condições de processos experimentados, considerando os resultados de outros pesquisadores, com diferentes linhagens/cepas de bacilos. Foi realizada somente a amplificação do DNA confirmando as espécies de *B. licheniformis* e *B. subtilis* (WECKEL et al., 2006).

5.3 Análise de infravermelho com transformada de Fourier

A análise do espectro de infravermelho do padrão bem como da amostra foi baseada em literatura e comparada com publicações como a análise de Chaisorn et al. (2016). As bandas de absorção em IR da amostra de γ -PGA apresentam similaridade com o padrão e com espectros de publicações para o biopolímero, qualificando assim, a identidade do produto obtido nas fermentações por *B. licheniformis*. A Tabela 5 apresenta o resumo das principais bandas de absorção no IR obtidas em pastilha de KBr (LOPES e FASCIO, 2004).

Os picos de absorção característicos para COOH podem ser observados nas bandas próximas entre 3200 a 2500 cm^{-1} e 1300 a 1200 cm^{-1} com deformações em 1420 cm^{-1} . Para a identificação de grupamentos amida CONH_2 pode-se observar os diferentes estiramentos em bandas próximas a 3500 a 3200 cm^{-1} (2 bandas, amida primária) (CHAIORN, 2016). Segundo Ho et al. (2006) a banda observada próxima a 1643 cm^{-1} é característica de grupamento amida I CONHR, sendo a absorção próxima a 1614 cm^{-1} também característica de grupamento

carboxila. Enquanto os grupamentos NH e C-N apresentam estiramentos entre 1680 até 1530 cm^{-1} , Figuras 35 e 36.

Posto isto, pode-se confirmar a presença dos principais grupos funcionais característicos da amida, carboxila e carbonila, além de grupo hidroxila, o que reforça as propriedades físico-químicas para sua ampla utilização, principalmente para ligações com íons metálicos divalentes (CHAISORN, 2016).

Tabela 5 – Análise dos grupos funcionais para γ -PGA em FTIR

Composto	N – H	NH ₂	Amida I	C = O	C – O	C – N	N – H
Padrão γ -PGA	3.565,69	3.270,64	1.614,11	1.448,26 1.400,05	1.575,54	1.268,92	777,16
Amostra	3.561,85	3.270,65	1.643,73	1.456,02 1.417,46	1.542,73	1.211,02	667,26

Fonte: Adaptado de CHAISORN et al. ,2016; LOPES; FASCIO, 2004.

Figura 35 – Espectro infravermelho do padrão de γ -PGA seco após precipitação com etanol
PA

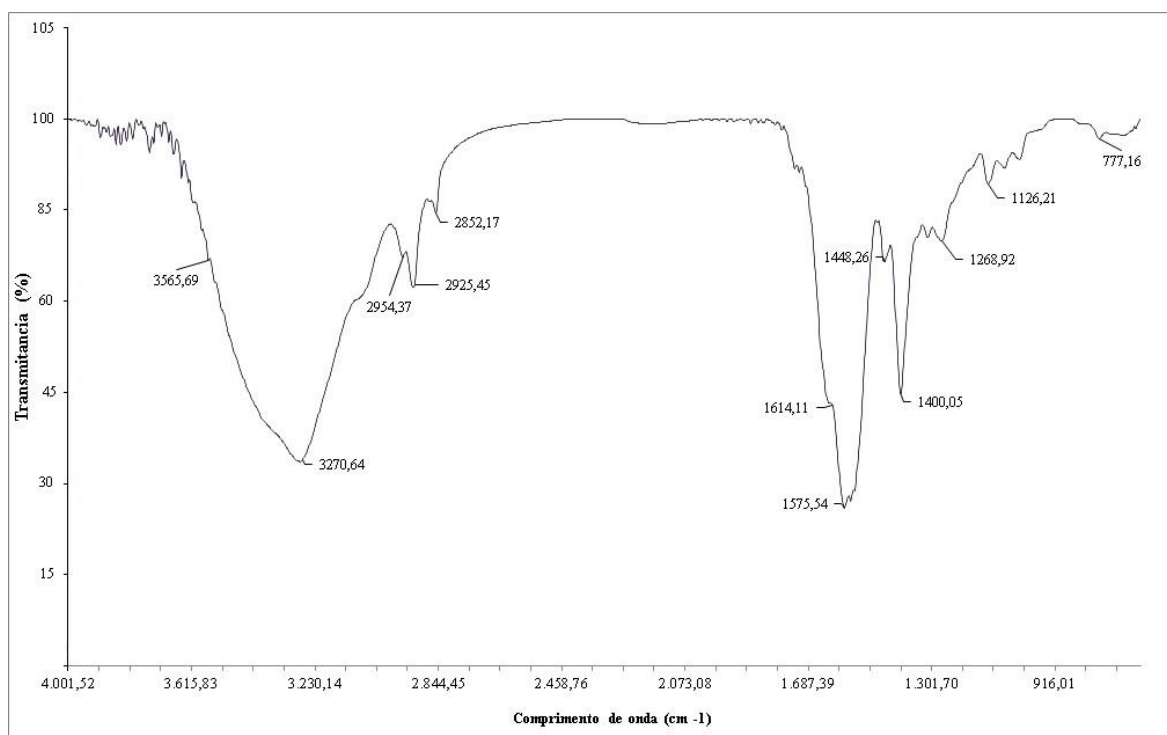


Figura 36 – Espectro infravermelho de amostra de γ -PGA seca após precipitação com etanol
PA

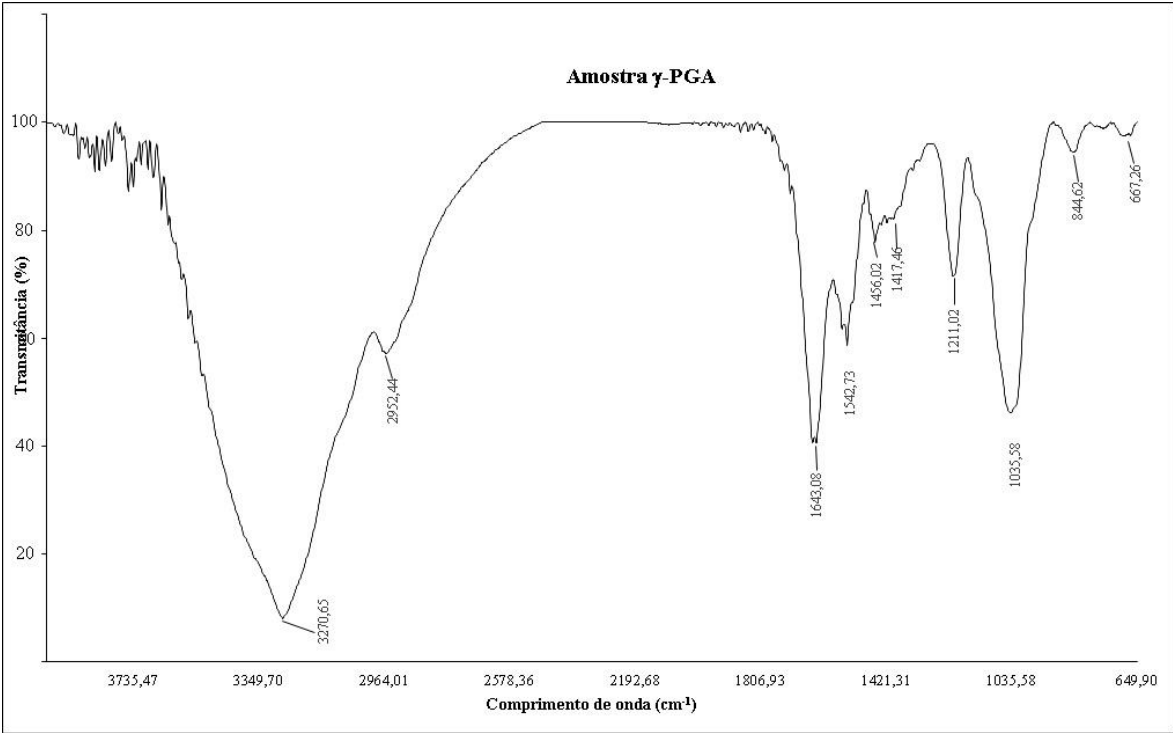


Tabela 6 – Principais resultados de produção de γ -PGA com *Bacillus subtilis* deste estudo e de pesquisas publicadas

<i>Bacillus subtilis</i>	Método	Principais nutrientes		γ -PGA g L ⁻¹	Temp. °C	Tempo h	Produtivi- dade g L ⁻¹ h ⁻¹	Rendim. g g ⁻¹	Referência
		Nitrogênio	Carbono						
ATCC 2382	Frascos Erlenmeyer, mesa agitadora, 200 rpm	Sulfato (NH ₄) ₂ SO ₄	Glicerol, Glicose, Ác. L- Glutâmico	15,04	33	48	0,313	0,215	Este estudo - (Experimento suplementação de nitrogênio)
ATCC 2382	Frascos Erlenmeyer, mesa agitadora, 200 rpm	Sulfato (NH ₄) ₂ SO ₄	Glicerol, Glicose, Ác. L- Glutâmico, Ác. Cítrico	9,13	35	18	0,507	0,140	Este estudo - (Experimento suplementação de carbonos)
NX-2	Batelada alimentada	Sulfato (NH ₄) ₂ SO ₄	Palha de arroz hidrolisada, Glutamato, Glicose, Xilose	73,00	32	90	0,81	0,910	Tang et al. (2015)
NX-2	Biorreator de tanque agitado, 150rpm (7,5L)	Sulfato (NH ₄) ₂ SO ₄	Glicose, Glutamato	71,21	32	57	1,240	0,419	XU et al. (2014)
MJ80	Biorreator de tanque agitado, 150rpm (3L)	Urea	Glicerol, Glicose, Ác. L- Glutâmico, Ác. Cítrico, Amido	75,50	37	72	1,050	0,415	WT et al. (2014)
NX-2	Frascos Erlenmeyer, mesa agitadora, 200 rpm	Sulfato (NH ₄) ₂ SO ₄	Glicerol, Glicose, Ác. L- Glutâmico	31,70	32,5	48	0,660	0,317	WU et al. (2010)
CGMCC1250	Batelada alimentada, biorreator de tanque agitado, 200 - 450rpm (100L)	Extrato de levedura	Glicose, Glutamato	101,00	37	46	2,190	0,570	Huang, et al 2011

Tabela 7 – Principais resultados de produção de γ -PGA com *B. licheniformis* deste estudo e de pesquisas publicadas

<i>Bacillus licheniformis</i>	Método	Principais nutrientes		γ -PGA g L ⁻¹	Temp. °C	Tempo h	Produtividade g L ⁻¹ h ⁻¹	Rendim. g g ⁻¹	Referência
		Nitrogênio	Carbono						
NCTC 10341	Frascos Erlenmeyer, mesa agitadora, 200 rpm	Sulfato (NH ₄) ₂ SO ₄	Glicerol, Glicose, Ác. L-Glutâmico	11,01	33	48	0,229	0,157	Este estudo - (Experimento suplementação de nitrogênio)
NCTC 10341	Frascos Erlenmeyer, mesa agitadora, 200 rpm	Sulfato (NH ₄) ₂ SO ₄	Glicerol, Glicose, Ác. L-Glutâmico, Ác. Cítrico	18,59	35	18	1,033	0,266	Este estudo - (Experimento suplementação de carbonos)
NCTC 10341	Biorreator airlift (3L)	Sulfato (NH ₄) ₂ SO ₄	Glicerol, Glicose, Ác. L-Glutâmico, Ác. Cítrico	21,31	35	27	0,789	0,304	Este estudo - (Experimento adição de oxigênio)
NCTC 10341	Biorreator airlift (3L), batelada repetida com adições pontuais de glicose, glicerol	Sulfato (NH ₄) ₂ SO ₄	Glicerol, Glicose, Ác. L-Glutâmico, Ác. Cítrico	23,32	35	70	0,333	0,388	Este estudo - (Experimento em batelada repetida suplementada com indutores do gene pgsE)
NCTC 10341	Biorreator airlift (3L), alimentação contínua	Sulfato (NH ₄) ₂ SO ₄	Glicerol, Glicose, Ác. L-Glutâmico, Ác. Cítrico	*	35	70	7,230	0,507	Este estudo - (Experimento com alimentação contínua)
NCTC 10341	Biorreator airlift (3L), alimentação contínua	Sulfato (NH ₄) ₂ SO ₄	Glicerol, Glicose, Ác. L-Glutâmico, Ác. Cítrico	**	35	58	6,830	0,678	Este estudo - (Experimento com alimentação contínua, baixa concentração de nutrientes)
<i>P-104</i>	Batelada alimentada - Biorreator de tanque agitado, 150rpm (7L)	Sulfato (NH ₄) ₂ SO ₄	Glicose, Glutamato de sódio, Citrato de sódio	41,60	37	39	1,060	0,260	Zhao et al. (2013)
<i>NCIM 2324</i>	Frascos Erlenmeyer, mesa agitadora, 200 rpm	Cloreto NH ₄ Cl	Ác. L-Glutâmico, Ác. Cítrico, Glicerol, L-Glutamina, Ác. α -	35,75	37	96	0,370	0,366	Bajaj et al. (2009)
<i>SAB-26</i>	Frascos Erlenmeyer, mesa agitadora, 200 rpm	Sulfato (NH ₄) ₂ SO ₄	Glucose, glycerol, citrate sodium, casein hydrolysate	59,90	37	96	0,620	0,334	Yasser et al. (2007)
<i>CGMCC 2876</i>	Frascos Erlenmeyer, mesa agitadora, 200 rpm	Cloreto NH ₄ Cl	Citrato tri-sódico, Glicose, Ác. L-glutâmico, Glicerol	21,80	37	20	1,090	0,436	YAN et al. (2015)
<i>ATCC 9945a</i>	Biorreator de tanque agitado, 150rpm (2L)	Cloreto NH ₄ Cl	Glicerol, Ác. L-Glutâmico, Ác. Cítrico	20,50	37	96	0,210	0,183	KO, GROSS (1998)

* Fermentação em sistema contínuo aberto, sem reciclo de células e sem aproveitamento de produção, a produção total de γ -PGA consta na tabela 19.

** Produção pontual de γ -PGA consta na tabela 20.

6 CONCLUSÕES

A velocidade específica de crescimento de *Bacillus licheniformis* e de *B. subtilis* foi similar nos experimentos realizados nos meios básicos de cultivo. O tempo de duplicação das células foi estimado em aproximadamente 3 horas.

Nos experimentos realizados com diferentes fontes de nitrogênio, a produção de γ -PGA foi maior quando o meio de cultivo foi suplementado com o sulfato de amônio, esse resultado é também observado em estudos publicados comparando inclusive esse mineral com nitrogênio orgânico.

Nos experimentos conduzidos para analisar as diferentes fontes de carbono para a produção de γ -PGA observou-se em especial a importância em disponibilizar os nutrientes essenciais para produção do biopolímero, os meios suplementados com glicerol apresentaram melhores resultados, porém quando em concentrações inferiores a 40 g L^{-1} . A glicose como fonte de carbono também foi importante na produção de γ -PGA, no entanto, observou-se produção de γ -PGA em meio sem glicose, enquanto houve baixa produção quando uma concentração de glicose superior a 15 g L^{-1} foi adicionada ao meio de cultivo.

A adição de n-heptano no início das fermentações como vetor para aumentar a solubilidade de oxigênio no meio de cultivo, foi favorável para o crescimento da biomassa, principalmente para o *B. licheniformis*, houve aumento também na produção de γ -PGA em comparação aos experimentos sem a adição do solvente orgânico.

A produção de γ -PGA em biorreator *airlift* foi maior em relação à produção obtida nos experimentos em frascos Erlenmeyer, considerando as melhores condições como controle de pH e ajuste quando necessário para manter o meio de cultivo mais apropriado para a produção de γ -PGA. Agitação/homogeneização e disponibilização de oxigênio às células através da injeção de ar comprimido, além de maior controle também da temperatura de fermentação.

Nas fermentações em biorreator *airlift*, a produção de γ -PGA foi ainda maior com a adição de indutores de genes dos *Bacillus* como o zinco, bem como na adição de cofatores como a niacina para a biossíntese dos microrganismos.

A fermentação com alimentação contínua de nutrientes, em sistema aberto, ou seja, sem o reciclo de células e com vazão de saída igual à vazão de entrada de alimentação, apresentou uma produtividade e rendimento ainda maior quando comparada à produção em batelada no biorreator *airlift*. A alimentação constante de nutrientes favoreceu a produção de γ -PGA.

O rendimento na produção de γ -PGA foi superior no experimento em biorreator *airlift* com alimentação contínua quando a concentração de nutrientes no meio foi menor. A limitação

de nutrientes além de favorecer a produção de γ -PGA, também gerou um residual menor de substratos, o que favorece o custo de produção com menos resíduos para tratamento.

Os experimentos em biorreator *airlift* apresentaram resultados promissores, considerando as vantagens das condições de processo, onde é possível uma constante homogeneização do meio sem o risco de cisalhamento das células, o sistema favoreceu o crescimento celular sem aumentar a viscosidade do meio, possibilitou também o fornecimento de nutrientes de carbono e nitrogênio, além do fornecimento de oxigênio através da injeção de ar comprimido.

REFERÊNCIAS

ANSARI, F.A., AHMAD, I. Fluorescent *Pseudomonas* -FAP2 and *Bacillus licheniformis* interact positively in biofilm mode enhancing plant growth and photosynthetic attributes. **Scientific Report**, v.9:4547, 2019.

ASHIUCHI, M. Analytical approaches to poly- γ -glutamate: Quantification, molecular size determination, and stereochemistry investigation. **Journal of Chromatography B**, v. 879 n.29, p. 3096-3101, 2011.

ASHIUCHI, M.; SODA, K.; MISONO, H. A poly- γ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: Gene cloning and biochemical analysis of poly- γ -glutamate produced by *Escherichia coli* clone cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 263, p. 6–12, 1999.

BAJAJ, I. B.; SINGHAL, R. S. Poly (glutamic acid) - An emerging biopolymer of commercial interest. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5551–5561, 2011.

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

BRITO, P. N. “**Produção de Ácido gama-Poliglutâmico: Estudo e Otimização do Processo Utilizando Resíduos Agroindustriais**”. 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas, 2014.

BUESCHER, J. M.; MARGARITIS, A. Microbial Biosynthesis of Polyglutamic Acid Biopolymer and Applications in the Biopharmaceutical, Biomedical and Food Industries. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 27, n. 1, p. 1–19, 1 jan. 2007.

CAMPOS, V.; et al. Biosynthesis of γ -Polyglutamic Acid by *Bacillus licheniformis* Through Submerged Fermentation (SmF) and Solid-state Fermentation (SSF). **Chem. Biochem. Eng. Q.**, v. 35, n. 3, p. 333–344, 2021.

CAMPOS, V., PIMENTEL FILHO, N. J., MEDEIROS, T. A. M. Study of *Bacillus spp.* strains used in the production of γ -polyglutamic acid in submerged culture. **Int Food Res J**, 27(3): 427- 434, 2020.

CAMPOS, V. et al. Physicochemical characterization and evaluation of PGA bioflocculant in coagulation-flocculation and Campos, V., Fernandes, A. R. A. C., Medeiros, T. A. M., e Andrade, E. L. (2016). Journal of Environmental Chemical Engineering Physicochemical

characterize. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 4, p. 3753–3760, 2016.

CANDELA, T.; FOUET, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 5, p. 1091–1098, 2006.

CANDELA, T.; MOCK, M.; FOUET, A. CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. **J. Bacteriol.**, v.187, p. 7765–7772, 2005.

CARVALHO, J.C.M.; SATO, S. Fermentação descontínua alimentada. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coord.) **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 541 p. (Biotecnologia Industrial v. 2)

CHAISORN, W.; POONSUK, P.; O-THONG, S.; METHACANON, P. Production and characterization of biopolymer as bioflocculant from thermotolerant *Bacillus subtilis* WD161 in palm oil mill effluent. **Int Journal of Hydrogen Energy**. 41, 21657-21664. 2016.

CHANG, J. et al. Fabrication of Poly(γ -glutamic acid)-coated Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles and Their Application in Heavy Metal Removal. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 11, p. 1244–1250, 2013.

CLADERA-OLIVERA, F.; CARON, G. R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 53-58, 2004.

DEL BIANCHI, V.L., MORAES, I.O., CAPALDO, D.M.F. **Fermentação em Estado Sólido**. In: SCHMIDELL, W., LIMA, V.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. Biotecnologia Industrial. V 2. São Paulo. Editora Edgard Blucher, p 247 – 276. 2001.

DOBSON, R.; GRAY, V.; RUMBOLD, K. Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 39, p217–226, 2012.

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

FACCIOTTI, M.C.R. Fermentação contínua. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coord.) **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 541 p. (Biotecnologia Industrial v. 2).

FERNANDES, A., ANDRADE, E., CAMPOS, V. Propriedades flocculantes em água artificial do ácido γ -poliglutâmico produzido por *Bacillus subtilis* em substrato de soja fermentada (natto). *Brazilian Journal of Development*, v. 6, p. 14668-14683, 2020.

GADEN, E.L. Jr. Fermentation kinetics and productivity. **Chem. Ind.**, 12:154-159, 1955.

GOTO, A.; KUNIOKA, M. Biosynthesis and Hydrolysis of Poly (GAMMA.-glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 7, p. 1031–1035, 1992. Published online: 2014.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. *In: Biotecnologia Industrial Vol II: Engenharia Bioquímica*. (Schmidell W., Lima U.A., Aquarone E., Borzani W., eds.), São Paulo, Ed. Edgard Blücher Ltda., p. 93-122, 2001.

HO, G. H; et al. Gamma-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.

HSUEH, Y.-H.; Huang, K.-Y.; Kunene, S.C.; Lee, T.-Y. Poly- γ -glutamic Acid Synthesis, Gene Regulation, Phylogenetic Relationships, and Role in Fermentation. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, p. 2644, 2017.

HUANG, B. et al. Effects of CaCl_2 on viscosity of culture broth, and on activities of enzymes around the 2-oxoglutarate branch, in *Bacillus subtilis* CGMCC 2108 producing poly-(γ -glutamic acid). **Bioresource Technology**, v.102(3), p. 3595-3598, 2011a.

HUANG, J., et al. High yield and cost-effective production of poly(γ -glutamic acid) with *Bacillus subtilis*. **Eng. Life Sci.**, v.11, p. 291-297, 2011b.

HUSSEIN, Z.M.; ABEDALI, A. H.; AHMEAD, A. S. Improvement Properties of Self - Healing Concrete by Using Bacteria. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, Volume 584, Intern. Conf. on Civil and Environ. Engineering Technologies, Iraq, 2019.

HWAN, J. et al. The production of surfactin during the fermentation of cheong gukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1347-1354, 2012.

IVÁNOVICS, G.; BRUCKNER, V. Über die chemische Natur der immunspezifischen Kapselsubstanz der Milzbrandbazillen. **Naturwissenschaften**. v. 25, p. 250, 1937.

IVÁNOVICS, G.; BRUCKNER, V. Über das natürliche Vorkommen und über eine einfache biologische Gewinnungsart der l(—)-Glutaminsäure. **Biol. Chem.**, v. 247, n. 6, p. 281, 1937.

JEONG, J-H., et al. The statistically optimized production of poly(c-glutamic acid) by batchfermentation of a newly isolated *Bacillus subtilis* RKY3. **Bioresource Technology**, v.101, p. 4533–4539, 2010.

JUNG, Duk-Yeon; et al. Influences of Cultural Medium Component on the Production of Poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus* sp. RKY3. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, p. 289-295, 2005.

KAMBOUROVA, M.; TANGNEY, M.; PRIEST, F. Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67: p. 1004–1007, 2001.

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

KEMBLOWSKI, Z.; PRZYWARSKI, J.; DIAB, A. An Average Gas Holdup and Liquid Circulation in *Airlift* Reactors with External Loop, **Chem. Eng. Sci.**, v.48, p. 4023, 1993.

KO Y. H, GROSS, R. A. Effects of glucose and glycerol on gamma-poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. **Biotechnol Bioeng.** v. 57, n. 4, p. 430-7. 1998.

KOMPALA, D.S., et al. Investigation of bacterial growth on mixed substrates: Experimental evaluation of cybernetic models. **Biotechnol. Bioeng.**, v.28, p. 1044-1055, 1986.

KONGKLOM, N.; et al. Production of poly- γ -glutamic acid by glutamic acid-independent *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 using different feeding strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v.100, p. 67-75, 2015.

KUMAR, A. N.; KUMAR, U.; AZMI, W. “The Emergence of Oxygen Vectors in Overcoming the Challenges of Oxygen Transfer Rate in Aerobic Bioprocesses”, **Current Biochemical Engineering (Discontinued)**, v.4(3), 2017.

KUMAR, R.; PAL, P. Fermentative production of poly (c-glutamic acid) from renewable carbon source and downstream purification through a continuous membrane-integrated hybrid process. **Bioresource Technology**, v.177, p. 141–148, 2015.

KUNIOKA, M. Biodegradable water absorbent synthesized from bacterial poly(aminoacid)s. **Macromolecular Bioscience**, v. 4, p. 324-329, 2004.

KUNIOKA, M. Biosynthesis of poly (γ -glutamic acid) from L-glutamine, citric acid and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 44, p.501-506, 1995.

LAI, L.T.; TSAI, T-H.; WANG, T.C. Application of oxygen vectors to *Aspergillus terreus* cultivation, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, num. 5, p. 453-459, 2002.

LEE, Bao-Hong; LAI, Yi-Syuan; Wu, She-Ching. Antioxidation, angiotensin converting enzyme inhibition activity, nattokinase, and antihypertension of *Bacillus subtilis* (natto)-fermented pigeon pea, **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23(4), p. 750-757, 2015.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Quim. Nova**, Vol. 27(4), p. 670-673, 2004.

LUEDEKING, R.; PIRET, E. L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. **J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng.**, v. 1, p.393, 1959.

LUO, Z. et al. Microbial synthesis of poly- γ -glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 134, 2016.

MELO, T. A. de; et al. The *Bacillus* genus applied to the biological control of plant diseases. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. e18110917817, 2021.

MITCHEL, D. A. (org). **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. Springer, 2006.

MORAES, L. P.; ALEGRE, R. M. Produção de ácido γ -Poliglutâmico por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 utilizando glicerol do biodiesel como fonte de carbono sem a utilização de ácido glutâmico como substrato. **XX COBEQ – Congresso Brasileiro de Engenharia Química**. Florianópolis: 19-22 de outubro de 2014.

MSADEK, T. KUNST, F. KLIER, A. Rapoport G. DegS–DegU and ComP–ComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene degQ. **J Bacteriol.**, v. 173, p. 2366–77, 1991.

NAIR, P.; NAVALE, G.R.; DHARNE, M.S. Poly-gamma-glutamic acid biopolymer: a sleeping giant with diverse applications and unique opportunities for commercialization. **Biomass Conv. Bioref.** v1., p.1, 2021.

OLIVEIRA, D.W.F., et al. Estudo da capacidade de produção de enzimas amilase, protease e lipase por uma linhagem de *B. subtilis* isolada de solo de manguezal. In: **anais do congresso brasileiro de engenharia química**, Anais eletrônicos. Campinas, Galoá, 2016. Disponível em: <<https://proceedings.science/cobeq/cobeq-2016/papers/estudo-da-capacidade-de-producao-de-enzimas-amilase--protease-e-lipase-por-uma-linhagem-de-b--subtilis-isolada-de-solo-d>>. Acesso em: 22 set. 2021.

OLIVEIRA, D. W. F. et al. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B:Biointerfaces**, v. 101, p. 34–43, 2013.

OORT, M. V. **Enzymes in food technology – introduction**. in: *Enzymes in food technology*. Org. Whitehurst, Robert J., OORT, Maarten van. 2nd ed., Blackwell Publishing Ltd. 2010.

OPPERMANN-SANIO, F.; STEINBÜCHEL, A. Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. **Naturwissenschaften**, v. 89(1), p. 11–22, 2002.

PARK, Sung-Bin; et al. Poly (glutamic acid): Production, composites, and medical applications of the next-generation biopolymer, **Progress in Polymer Science**, v. 113, 101341, 2021.

PIEDRAHITA-AGUIRRE, C.A., et al. The influence of process parameters in production of lipopeptide iturin A using aerated packed bed bioreactors in solid-state fermentation. **Bioprocess Biosyst Eng**, v.37, 1569–1576, 2014.

PIRTTIJÄRVI, T. S. M.; ANDERSON, M. A.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial process. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 231-239, 2000.

REN, X. **Application of hydrocarbon and perfluorocarbon oxygen vectors to enhance heterologous production of hyaluronic acid in engineered *Bacillus subtilis***. 98f. Thesis (Master in Chemical Engineering). UWSpace (University of Waterloo). 2017

REIS, A. et al. Monitoring population dynamics of the thermophilic *Bacillus licheniformis* CCM11034 in batch and continuous cultures using multi-parameter flow cytometry. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 199-210, 2005.

REY, M.W., et al. Complete genome sequence of the industrial bacterium *Bacillus licheniformis* and comparisons with closely related *Bacillus* species. **Genome Biology**, 5, r77, 2004.

ROSENOW, E. C. Studies on Elective Localization Focal Infection with Special Reference to Oral Sepsis. **Journal of dental research.**, v. 1(3), p. 205-267, 1919.

ROSSI, M.J., et al. *Airlift* bioreactor fluid-dynamic characterization for the cultivation of shear stress sensitive microorganisms. **Journal of Advances in Biotechnology.**, v. 5, p. 639, 2016.

ROSSI, M.J. **Tecnologia para produção de inoculantes de fungos ectomicorrízicos utilizando cultivo submerso em biorreator *airlift***. 188 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina). 2006.

ROSSI, M.J.; SOUZA, J.A.R.; OLIVEIRA, V.L. Inoculum production of the ectomycorrhizal fungus *Pisolithus microcarpus* in an *airlift* bioreactor. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.59, p. 175–181, 2002.

SALES, A. E.; TAKAKI, G. M. C.; SILVA, C. A. A. Avaliação da produção de bacitracina em diferentes temperaturas por *Bacillus licheniformis* (UCP 1016), utilizando meios alternativos contendo soro de leite. **Exacta**, vol. 9, núm. 2, 2011, pp. 231-240 Universidade Nove de Julho São Paulo, Brasil.

SCHMIDELL, W. Microrganismos e meios de cultura para utilização industrial. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coord.) **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 541 p. (Biotecnologia Industrial v. 2)

SCHMIDELL, W; FACCIOTTI, M.C.R. Biorreatores e processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W. et al. (Coord.) **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 541 p. (Biotecnologia Industrial v. 2)

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

SHIH, I. L. Application of statistical experimental methods to optimize production of poly (γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 31, p. 213–220, 2002.

SHIH, I. L. et al. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 267-272, 2001.

SILVA, S. B. **Produção e otimização do processo de obtenção de ácido γ -poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53**. 2010. 128 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2010.

STANBURY, P.F.; WHITAKER, A.; HALL, S.J. **Principles of Fermentation Technology**, 2a. edição, New York: Pergamon, 357p., 1995.

TANG, B.; et al. Highly efficient rice straw utilization for poly-(γ -glutamic acid) production by *Bacillus subtilis* NX-2, **Bioresource Technology**, v. 193, p. 370-376, 2015.

TORK, S. A. et al. Purification and characterization of gamma-polyglutamic acid from newly *Bacillus licheniformis* NRC2. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.74, p. 382–391, 2015.

TRINDER, P. Determination of Glucose in Blood Using Glucose Oxidase with an Alternative Oxygen Acceptor. **Annals of Clinical Biochemistry**. v. 6, n.24, 1969.

TROY, F.A. Chemistry and biosynthesis of the poly(γ -D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis* I. Properties of the membrane-mediated biosynthetic reaction. **J. Biol. Chem.**, v.248, p. 305–315, 1973.

WANG, J.; et al. Enhancement of poly- γ -glutamic acid production by alkaline pH stress treatment in *Bacillus licheniformis* WX-02. **J Chem Technol Biotechnol**, 2016; v.91, p.2399–2403, 2015.

WECKEL, T. et al. Cell Envelope Stress Response in *Bacillus licheniformis*: Integrating Comparative Genomics, Transcriptional Profiling, and Regulon Mining To Decipher a Complex Regulatory Network. **Journal of Bacteriology**, v. 188(21), pg. 7500-7511, 2006.

WU, Q. et al. Contribution of Glycerol on Production of Poly(γ -Glutamic Acid) in *Bacillus subtilis* NX-2. **Appl Biochem biotechnol**. v. 160, p. 386-392, 2010.

YAN, S.; et al. Poly-c-glutamic acid Produced from *Bacillus licheniformis* CGMCC 2876 as a Potential Substitute for Polyacrylamide in the Sugarcane Industry. **Biotechnology Progress**, v. 31, n.5, p. 1287-1294, 2015.

YAO, J. et al. Analysis of Carbon Metabolism and Improvement of γ -Polyglutamic Acid Production from *Bacillus subtilis* NX-2. **Appl Biochem Biothechnol**. v.160, p. 2332-2341, 2010.

YAO, J.; et al. Investigation on enzymatic degradation of γ -polyglutamic acid from *Bacillus subtilis* NX-2. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 158-164, 2009

YOON, H. Y. et al. Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**. v. 22, p. 585–588, 2000.

YU, W.; et al. Effect of glucose on poly- γ -glutamic acid metabolism in *Bacillus licheniformis*. **Microb Cell Fact**, v. 16, p. 22, 2017.

ZENG, W.; et al. Studies on the UV spectrum of poly (γ -glutamic acid) based on development of a simple quantitative method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 83-90, 2012.

ZHAN, Y. et al. Improvement of glycerol catabolism in *Bacillus licheniformis* for production of poly- γ -glutamic acid. **Appl Microbiol Biotechnol**. v. 101, p. 7155–7164, 2017.

ZHANG, S.; SONG, P.; LI, S. Application of n-dodecane as an oxygen vector to enhance the activity of fumarase in recombinant *Escherichia coli*: role of intracellular microenvironment, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 49, num. 3, p. 662-667, 2018.

ZHANG, D.; FENG, X.; LI, S.; CHEN, F.; XU, H. Effects of oxygen vectors on the synthesis and molecular weight of poly(γ -glutamic acid) and the metabolic characterization of *Bacillus subtilis* NX-2. **Process Biochemistry**, v. 47, num. 12, p. 2103-2109, 2012.

ZHAO, C.; et al. Production of Ultra-high Molecular Weight Poly- γ -Glutamic Acid with *Bacillus licheniformis* P-104 and Characterization of its Flocculation Properties. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 170, p. 562–572, 2013.

ZIMMER, V. S.; CESARO, A.; AYUB, M.A.Z. Caracterização de γ -PGA produzido por *Bacillus Subtilis* BL53. **Brazilian Journal of Microbiology**., p. 01-07, 2012.

XU, Z., et al. Enhanced poly(γ -glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis* NX-2 immobilized in an aerobic plant fibrous-bed bioreactor, **Bioresource Technology**, v. 155, p. 8-14, 2014.

APÊNDICE A

Aqui estão descritos os dados numéricos dos quais foram elaboradas as figuras que apresentam os resultados obtidos no item 5 (Resultados e Discussão). As tabelas estão apresentadas na ordem das figuras com as devidas correlações.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos no ensaio para avaliação do crescimento dos microrganismos em meio BHI. Os dados geraram a Figura 12 do item 5.1.2.

Tabela 8 – Crescimento dos microrganismos em frascos Erlenmeyer com agitação em mesa agitadora a 200 rpm – meio BHI (Figura 14)

Meio BHI	Densidade Óptica - DO 600nm		pH	
Tempo Fermentação (h)	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>	<i>B. subtilis</i>
0	0,023	0,030	5,96	6,04
2	0,085	0,055	5,96	6,08
4	0,155	0,115	5,94	6,05
6	0,270	0,265	5,96	6,05
8	0,645	0,470	5,95	6,02
10	0,880	0,705	5,93	5,53
12	1,040	1,675	5,39	5,09
14	2,460	3,010	5,34	4,72
16	3,350	4,050	4,88	4,39
18	4,448	4,995	4,27	4,05
20	4,400	4,835	3,97	4,27
22	4,508	5,273	4,08	3,98
24	4,505	5,073	4,15	3,94
26	4,368	5,160	4,07	3,91
28	4,770	5,410	3,93	3,89
30	4,520	5,423	3,93	3,83
32	4,605	5,603	3,92	3,81
34	4,240	5,128	3,92	3,81
36	4,148	4,728	4,02	3,78

Na produção de γ -PGA a partir de diferentes fontes de nitrogênio obteve-se os resultados conforme as Tabelas 9 a 11. Os dados geraram as Figuras 14 a 18 do item 5.1.3.

Tabela 9 – Produção de γ -PGA com sulfato de amônio como fonte de nitrogênio (Figuras 14 a 18)

Sulfato de Amônio		Tempo Fermentação (h)						
		6	12	18	24	36	48	60
<i>B. licheniformis</i>	γ -PGA (g L ⁻¹)	0,28	0,63	0,89	1,19	3,06	11,01	9,43
	Biomassa - DO _{600nm}	0,487	0,819	1,760	2,659	3,582	3,870	4,016
	pH	7,04	6,50	6,99	5,66	5,34	5,08	4,99
<i>B. subtilis</i>	γ -PGA (g L ⁻¹)	0,24	0,61	0,92	1,45	3,37	15,04	10,64
	Biomassa - DO _{600nm}	0,713	1,353	3,049	3,673	4,378	4,59	4,757
	pH	7,03	6,78	6,59	6,08	5,46	5,17	5,14

Tabela 10 – Produção de γ -PGA com cloreto de amônio como fonte de nitrogênio ((Figuras 14 a 18)

Cloreto de Amônio		Tempo Fermentação (h)						
		6	12	18	24	36	48	60
<i>B. licheniformis</i>	γ -PGA (g L ⁻¹)	0,43	0,89	1,22	1,74	4,54	7,22	5,01
	Biomassa - DO _{600nm}	0,869	1,484	3,827	5,088	6,931	6,935	6,086
	pH	6,88	6,84	6,79	6,60	6,37	5,20	5,24
<i>B. subtilis</i>	γ -PGA (g L ⁻¹)	0,51	0,75	1,36	2,70	6,32	6,35	6,35
	Biomassa - DO _{600nm}	0,279	0,832	1,019	1,257	1,568	1,868	2,071
	pH	6,82	6,95	6,87	6,82	6,78	6,65	6,65

Tabela 11 – Produção de γ -PGA com nitrato de amônio como fonte de nitrogênio (Figuras 14 a 18)

Nitrato de Amônio		Tempo Fermentação (h)						
		6	12	18	24	36	48	60
<i>B. licheniformis</i>	γ -PGA (g L ⁻¹)	0,42	0,71	1,49	2,30	4,20	7,80	6,33
	Biomassa - DO _{600nm}	1,036	4,868	5,684	8,092	9,321	9,375	9,353
	pH	7,02	7,03	6,44	6,30	6,39	5,74	5,82
<i>B. subtilis</i>	γ -PGA (g L ⁻¹)	0,33	0,84	1,67	3,44	4,98	6,15	6,04
	Biomassa - DO _{600nm}	0,841	3,502	4,837	5,539	6,497	6,835	6,226
	pH	6,86	6,54	6,12	7,40	7,44	7,50	7,09

No item 5.1.4 foi avaliada a produção de γ -PGA com diferentes fontes de carbono, as Tabelas 12 a 14 apresentam os dados dos experimentos com o meio Basal enriquecido com glicose, glicerol e ácido L-glutâmico, gerando as Figuras de 19 a 23 do item 5.1.4.1.

Tabela 12 – Crescimento da biomassa em meio Basal e adição substratos ricos em carbono
(Figuras 19 a 23)

Biomassa DO _(600 nm)		Tempo Fermentação (h)							
		6	10	14	18	22	26	30	34
<i>B. licheniformis</i>	M1	0,594	1,104	3,199	3,344	3,742	5,976	6,440	6,416
	M2	0,405	0,843	2,289	2,421	2,309	2,543	2,277	1,940
	M3	0,060	0,297	1,508	1,823	1,992	3,837	4,109	4,603
	M4	0,288	0,918	2,977	3,547	3,931	5,697	6,183	6,284
	M5	0,123	1,023	2,923	3,263	3,193	4,241	3,983	3,860
	M6	0,045	0,321	0,997	2,038	2,880	5,613	5,726	5,516
<i>B. subtilis</i>	M1	0,464	1,598	3,387	3,802	5,121	5,403	5,760	6,450
	M2	0,225	1,680	3,351	4,620	6,240	5,892	5,590	5,535
	M3	0,167	0,765	2,216	2,477	2,782	2,763	2,350	2,295
	M4	0,171	1,718	4,094	5,757	6,390	8,405	9,188	8,648
	M5	0,054	0,413	0,732	1,878	3,105	2,933	1,590	0,908
	M6	0,432	1,710	3,219	3,659	3,469	6,103	5,900	5,053

Tabela 13 – Produção de γ -PGA em meio Basal e adição substratos ricos em carbono
(Figuras 19 a 23)

γ -PGA _(400 nm) g L ⁻¹		Tempo Fermentação (h)							
		6	10	14	18	22	26	30	34
<i>B. licheniformis</i>	M1	0,19	1,09	4,75	4,80	5,45	9,30	6,12	6,10
	M2	0,10	2,26	11,60	8,97	8,60	8,51	8,38	8,66
	M3	0,06	2,32	11,34	15,09	11,55	11,05	10,19	9,61
	M4	0,11	2,41	8,72	8,29	7,52	7,50	7,33	7,36
	M5	0,08	2,73	9,97	18,59	12,91	12,55	9,76	9,72
	M6	0,06	2,72	6,74	7,03	9,29	8,55	8,06	7,70
<i>B. subtilis</i>	M1	0,29	1,83	4,58	9,13	8,27	6,04	4,86	4,70
	M2	0,23	1,70	4,99	8,46	6,77	5,32	4,72	4,66
	M3	0,37	2,01	4,74	5,14	8,07	7,90	6,39	6,37
	M4	0,33	3,57	6,77	5,68	7,04	7,52	6,64	6,35
	M5	0,24	1,87	5,28	5,58	6,22	7,39	8,82	6,87
	M6	0,23	1,06	5,72	6,06	7,69	7,83	7,25	6,33

Tabela 14 – Variação do pH em meio Basal com adição substratos ricos em carbono (Figuras 19 a 23)

pH		Tempo Fermentação (h)							
		6	10	14	18	22	26	30	34
<i>B. licheniformis</i>	M1	7,03	6,24	6,20	6,23	6,04	5,98	5,90	5,57
	M2	6,93	6,85	6,13	6,11	6,08	5,94	5,91	6,15
	M3	7,11	7,01	6,86	6,87	6,61	6,67	6,64	6,51
	M4	7,07	7,10	7,15	7,17	7,29	7,24	7,48	7,51
	M5	6,98	6,89	6,28	5,88	5,84	5,46	5,42	5,47
	M6	7,10	7,03	7,06	6,87	7,09	7,12	7,13	6,92
<i>B. subtilis</i>	M1	6,84	6,85	6,81	6,54	6,47	6,98	7,02	7,11
	M2	6,83	6,81	6,78	6,41	6,52	6,61	6,63	6,21
	M3	7,07	7,01	6,98	6,97	6,91	6,87	6,88	6,83
	M4	7,27	7,24	7,29	7,41	7,42	7,39	7,42	7,38
	M5	6,89	6,87	6,94	6,72	6,62	6,66	6,58	6,45
	M6	7,23	7,18	7,36	7,41	7,39	7,32	7,28	7,32

Tabela 15 – Residual de glicerol em meio Basal com adição substratos ricos em carbono
(Figuras 19 a 23)

Residual de glicerol g L ⁻¹		Tempo Fermentação (h)							
		6	10	14	18	22	26	30	34
<i>B. licheniformis</i>	M1	26,67	23,69	23,11	21,07	18,17	15,97	14,40	11,59
	M2	31,86	28,59	26,96	26,31	19,45	18,35	17,16	14,60
	M3	19,81	19,43	18,29	15,87	15,37	14,16	13,46	10,83
	M4	40,37	30,09	29,79	28,04	20,46	20,26	19,35	18,38
	M5	31,03	26,92	22,64	19,57	17,67	16,48	13,44	11,66
	M6	40,92	34,03	31,12	26,97	19,58	18,23	15,44	12,49
<i>B. subtilis</i>	M1	28,04	21,08	18,24	14,57	11,77	10,89	10,06	10,03
	M2	36,48	23,98	21,62	20,87	17,34	15,77	10,65	9,93
	M3	28,56	21,37	20,99	16,82	14,47	13,88	12,96	11,00
	M4	47,87	36,67	32,39	31,06	25,02	22,04	18,97	14,73
	M5	34,89	27,44	25,03	24,56	19,33	15,32	12,08	10,21
	M6	47,93	44,51	33,74	29,32	25,79	20,45	17,06	13,83

Tabela 16 – Residual de glicose em meio Basal com adição substratos ricos em carbono
(Figuras 19 a 23)

Residual de glicose g L ⁻¹		Tempo Fermentação (h)							
		6	10	14	18	22	26	30	34
<i>B. licheniformis</i>	M1	9,77	0,51	0,23	0,15	0,11	0,10	0,07	0,03
	M2	9,49	6,05	3,41	2,96	0,21	0,12	0,09	0,07
	M3								
	M4	14,43	8,66	2,56	0,18	0,13	0,08	0,03	0,01
	M5	8,57	3,63	0,84	0,77	0,79	0,59	0,48	0,26
	M6	13,98	10,83	6,61	2,28	0,28	0,16	0,08	0,01
<i>B. subtilis</i>	M1	9,85	5,13	2,02	0,22	0,10	0,10	0,05	0,05
	M2	9,78	6,39	4,22	2,31	0,30	0,12	0,09	0,07
	M3								
	M4	13,69	10,94	8,01	2,74	0,16	0,15	0,07	0,02
	M5	9,71	8,21	7,69	5,88	4,86	4,08	3,87	1,04
	M6	14,21	10,63	8,52	5,88	1,57	0,41	0,14	0,03

A Tabela 17 apresenta os resultados das análises realizadas do experimento 1 em biorreator *airlift* para avaliação da produção de γ -PGA, bem como das condições de processo no biorreator (Figuras 24 e 25, item 5.2.1). A Tabela 18 apresenta os resultados do experimento 2 em biorreator para a produção de γ -PGA em batelada repetida suplementada com adições pontuais de glicose, glicerol e indutores do gene *pgsE* (Figuras 26 e 27, item 5.2.2).

Tabela 17 – Experimento 1 – Resumo dos ensaios, Biorreator *airlift* (Figuras 24 e 25)

<i>B. licheniformis</i>	Experimento 1 <i>airlift</i>					
Tempo Fermentação (h)	γ-PGA (g L⁻¹)	DO 600nm	pH	Saturação (O₂%)	Glicose (g L⁻¹)	Glicerol (g L⁻¹)
2	1,32	0,000	7,15	100,0	9,87	38,40
4	2,07	0,430	7,14	93,0	9,00	38,00
6	2,35	0,800	7,15	89,0	8,70	36,89
8	3,69	1,200	7,15	83,0	8,00	36,70
10	3,88	3,480	7,14	79,0	7,91	34,76
12	4,71	3,810	7,09	58,0	7,60	30,40
14	5,18	4,370	6,96	39,0	7,50	27,93
15	6,43	5,660	6,80	6,0	6,28	22,30
17	8,92	7,240	6,82	5,0	5,81	21,74
19	15,27	9,090	6,82	5,0	5,55	20,60
21	15,72	9,400	6,83	5,0	5,45	20,43
24	16,91	10,100	6,83	6,0	4,60	16,72
26	18,76	11,900	6,80	7,0	3,90	15,05
27	21,31	12,500	6,83	17,0	3,50	14,96
29	12,25	6,620	6,80	25,0	3,28	14,31
30	12,25	6,010	6,80	32,0	2,81	14,19

Tabela 18 – Experimento 2 – Resumo dos ensaios, Biorreator *airlift* (Figuras 26 e 27)

<i>B. licheniformis</i>	Experimento 2 <i>airlift</i>					
Tempo Fermentação (h)	γ -PGA (g L ⁻¹)	DO _{600nm}	pH	Saturação (O ₂ %)	Glicose (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)
30	4,09	1,760	7,34	100,00	8,98	36,29
32	4,44	2,390	7,52	98,00	6,95	36,76
34	9,70	3,620	6,90	98,00	6,01	33,11
36	10,33	4,650	7,10	4,00	8,41	26,90
38	11,73	4,820	7,15	4,00	7,86	20,00
40	13,21	5,070	7,15	83,00	6,80	18,46
42	16,44	5,960	7,19	83,00	5,98	13,31
44	16,51	5,980	7,09	83,00	5,14	12,54
46	16,81	6,020	7,29	74,00	4,13	10,28
48	17,03	6,520	7,32	69,00	6,19	12,20
50	17,55	6,780	7,32	59,00	5,18	12,84
52	18,10	7,080	7,28	38,00	4,46	12,90
54	18,17	7,020	7,30	36,00	4,17	12,79
56	18,20	6,950	7,16	48,00	4,08	12,36
58	18,79	6,810	6,88	60,00	3,55	11,25
60	19,18	7,400	7,09	68,00	6,14	11,09
62	20,92	7,510	7,35	47,00	6,12	11,00
64	21,64	7,810	6,82	38,00	5,48	10,67
66	21,89	7,730	6,79	33,00	4,88	9,79
68	22,15	8,380	6,77	32,00	4,73	9,00
70	23,32	8,230	6,72	29,00	3,71	8,04
72	21,78	8,580	6,77	11,00	4,46	7,94
74	20,32	7,570	6,77	6,00	4,25	7,61
76	16,56	4,130	6,86	4,00	4,03	7,26

A Tabelas 19 e 20 apresentam os resultados das análises realizadas a partir dos experimentos em biorreator *airlift* para avaliação da produção de γ -PGA com alimentação contínua de nutrientes, bem como das condições de processo no biorreator e adição de nutrientes e indutores no decorrer da fermentação. Os dados geraram as Figuras 28 a 32 do item 5.2.3.

Tabela 19 – Experimento 3 – Resumo dos ensaios, Biorreator *airlift* (Figuras 28 e 32)

<i>B. licheniformis</i>	Experimento 3 <i>airlift</i>					
Tempo Fermentação (h)	γ-PGA (g L⁻¹)	DO 600nm	pH	Saturação (O₂%)	Glicose (g L⁻¹)	Glicerol (g L⁻¹)
0	0,00	0,032	7,71	100,70	9,95	36,63
1	0,83	0,075	6,98	94,30	7,06	27,29
2	1,64	0,085	6,98	93,40	6,98	26,76
3	4,02	0,108	6,96	92,40	6,01	23,11
4	4,36	0,126	6,90	89,60	5,05	20,90
5	4,91	0,203	6,88	88,14	4,86	18,00
6	5,36	0,379	7,05	85,10	4,80	17,46
8	5,84	0,790	6,91	23,00	4,98	19,31
10	6,26	0,885	6,97	15,90	5,14	20,54
12	5,95	1,325	7,04	22,90	4,13	18,28
14	7,29	1,535	7,04	14,80	3,69	20,20
16	5,09	1,740	6,88	15,20	3,18	19,84
18	5,29	2,200	6,93	12,80	1,46	20,90
20	4,38	1,860	7,24	12,60	1,17	22,79
22	3,74	3,750	7,17	13,10	1,08	24,36
24	4,54	4,730	7,37	9,10	1,76	25,14
26	7,76	4,770	7,39	4,50	2,23	26,34
28	8,22	5,220	7,37	66,50	3,21	26,30
30	10,09	6,380	7,34	59,40	3,77	26,00
32	9,44	4,830	7,52	64,90	3,65	25,38
34	6,70	6,390	6,90	53,90	4,27	27,54
36	6,33	4,790	7,10	15,80	4,56	26,00
38	9,72	4,650	7,15	12,10	4,44	22,36
40	11,53	4,820	7,15	2,90	4,19	22,11
42	9,35	5,070	7,19	6,00	3,95	20,22
44	8,21	4,965	7,09	7,00	4,20	22,28
46	13,81	4,980	7,29	1,00	4,25	24,82
48	7,73	4,700	7,32	8,00	4,37	24,93
50	9,55	3,520	7,32	3,50	3,59	24,81
52	7,10	4,020	7,38	4,00	5,59	27,00
54	6,17	3,768	7,40	14,00	4,55	25,76
56	8,20	3,750	7,16	13,00	5,09	24,89
58	5,79	3,810	6,58	7,00	8,12	18,00
60	6,18	3,150	7,09	10,00	11,48	18,67
62	5,92	2,148	7,35	6,00	10,88	17,79
64	5,61	2,180	6,82	4,00	11,73	19,00
66	5,89	3,080	6,69	3,00	11,71	19,04
68	3,12	4,300	6,77	4,00	10,46	18,61
70	2,79	4,060	6,52	3,00	8,25	18,94
72	2,18	4,500	6,57	4,00	6,45	16,75
74	2,42	4,910	6,67	4,00	4,25	15,43
76	1,56	4,130	6,66	4,00	4,03	12,36

Tabela 20 – Experimento 4 – Resumo dos ensaios, Biorreator *airlift* (Figuras 28 e 32)

<i>B. licheniformis</i>	Experimento 4 <i>airlift</i>					
Tempo Fermentação (h)	γ-PGA (g L⁻¹)	DO 600nm	pH	Saturação (O₂ %)	Glicose (g L⁻¹)	Glicerol (g L⁻¹)
0	0,00	0,028	7,10	100,00	2,92	11,34
1	0,00	0,064	7,30	108,00	2,85	9,76
2	1,08	0,108	7,36	103,00	2,30	9,11
3	2,84	0,220	7,36	101,00	2,30	8,86
4	3,86	0,250	7,34	10,50	2,28	7,74
5	3,91	0,270	7,25	94,80	2,24	7,62
6	4,47	0,356	7,15	92,60	1,91	7,28
7	5,47	0,380	6,91	91,00	1,77	6,39
8	5,59	1,220	6,93	90,70	1,58	5,86
9	5,79	1,430	6,91	53,00	1,17	7,41
10	6,45	1,240	6,79	64,90	2,61	8,99
11	5,70	1,615	7,07	60,80	2,82	10,08
12	6,07	1,560	6,90	90,50	2,56	8,23
13	5,56	2,970	7,32	67,00	2,76	6,41
14	5,33	4,930	7,88	78,00	1,44	7,01
15	5,23	7,410	7,83	81,60	0,78	7,18
16	5,51	6,380	7,08	61,70	0,77	6,73
17	5,67	6,490	6,79	10,90	0,77	6,19
18	5,23	7,390	6,92	20,80	0,81	5,83
19	6,26	8,050	6,83	15,30	0,84	5,61
20	5,70	8,440	6,87	39,50	0,82	5,44
21	6,36	9,640	7,08	52,10	0,79	6,01
22	6,07	9,640	6,93	53,50	0,83	5,87
23	5,98	10,780	6,84	53,00	0,85	6,01
24	6,19	10,150	7,08	60,40	0,71	5,46
25	5,14	11,950	6,92	61,20	0,68	5,27
26	5,18	7,430	6,89	52,40	1,49	6,27
27	5,23	8,270	6,83	60,70	1,57	5,81
28	5,65	9,680	7,07	80,90	1,74	5,48
29	5,70	9,240	7,20	66,10	1,46	6,34
30	5,42	5,740	6,83	70,40	1,38	5,89
31	5,23	4,910	7,02	30,10	1,08	6,00
32	6,02	5,360	6,91	29,10	1,24	6,47
33	5,70	4,460	6,81	24,40	1,60	6,82
34	5,91	4,350	6,81	22,20	1,05	5,99
35	5,79	4,970	6,83	44,20	1,28	6,22
36	6,54	5,940	6,92	80,90	1,49	5,96
37	7,52	5,270	6,88	65,00	1,22	5,67
38	8,88	6,360	7,31	74,00	1,17	5,80
39	8,25	5,110	7,38	46,20	1,16	5,31
40	8,62	6,100	7,63	58,70	1,09	5,09

<i>B. licheniformis</i>	Experimento 4 <i>airlift</i>					
Tempo Fermentação (h)	γ -PGA (g L ⁻¹)	DO _{600nm}	pH	Saturação (O ₂ %)	Glicose (g L ⁻¹)	Glicerol (g L ⁻¹)
41	8,83	4,140	7,73	54,80	1,17	5,33
42	8,98	4,070	7,59	41,90	1,59	6,24
43	9,30	5,010	7,65	5,90	1,71	6,13
44	9,04	6,200	7,67	20,20	1,81	5,62
45	7,90	8,190	7,73	18,50	1,26	5,49
46	8,33	8,200	7,79	10,30	1,45	5,06
47	9,88	5,260	7,35	7,30	2,32	5,24
48	8,73	7,060	7,48	21,80	1,98	5,11
49	7,59	7,915	7,78	31,60	1,75	5,62
50	8,21	7,265	7,81	35,00	2,51	4,67
51	8,39	8,630	7,73	37,60	2,04	4,71
52	8,59	6,565	7,82	62,20	3,47	4,80
53	8,62	6,535	7,73	48,40	2,99	4,93
54	7,83	6,295	7,76	40,70	4,23	5,10
55	7,59	6,721	7,86	34,80	3,88	4,66
56	7,47	6,152	7,82	44,90	3,47	4,13
57	7,01	7,024	7,84	41,30	3,56	4,55
58	6,58	6,803	7,83	28,90	3,92	4,88

APÊNDICE B

Parte da pesquisa foi publicada conforme segue:

V. Campos et al., Biosynthesis of γ -Polyglutamic Acid..., *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 35 (3) 333–344 (2021)

333

Biosynthesis of γ -Polyglutamic Acid by *Bacillus licheniformis* Through Submerged Fermentation (SmF) and Solid-state Fermentation (SSF)



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

V. Campos,^{a,*} R. M. Kaspary,^a M. J. Rossi,^b and T. A. M. Medeiros^a

^aSão Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology, Sorocaba/SP/Brazil

^bFederal University of Santa Catarina, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Florianópolis/SC/Brazil

doi: <https://doi.org/10.15255/CABEQ.2021.1921>

Original scientific paper

Received: January 26, 2021

Accepted: July 28, 2021

Gamma-Polyglutamic acid (γ -PGA) was produced from fermentation processes by inoculating the bacterium *Bacillus licheniformis* on different substrates. In submerged fermentation (SmF), glycerol and glucose were used as the main carbon substrates while ammonium sulfate served to provide nitrogen. In solid-state fermentation (SSF), soybean was used as the main substrate. Tests carried out in an airlift bioreactor with *B. licheniformis* showed a maximum productivity of 0.789 g L⁻¹ h⁻¹ and a yield of 0.4 g g⁻¹. Different soybean cultivars from the 2015 and 2016 crops were used in the SSF. The BRS 1001IPRO cultivar, from the 2016 crop, showed the highest production, i.e., 1.2 g L⁻¹ of γ -PGA. This cultivar was subjected to different levels of milling (fine, intermediate and coarse). Coarsely milled grains increased γ -PGA production to 2.7 g L⁻¹. Moreover, coarse milling made the internal nutrients of the grains available for fermentation and this particle size did not compromise aeration during fermentation.

Keywords:

γ -polyglutamic acid, biosynthesis, *B. licheniformis*, SmF, SSF

Introduction

The industrial importance of bioprocessing and bioprospecting of microorganisms cannot be overstated. In recent decades, in addition to basic nutrition functions, food has been found to possess other functional properties that benefit the chemical and pharmaceutical industry, and more recently, that have been applied to the treatment of waste and effluents. The use of compounds made from biodegradable polymers of vegetable or microbial origin is extremely important from the standpoint of saving resources. Since such biodegradable polymers are of natural origin, they can be incorporated into the natural carbon cycle, which involves natural recycling.

The use of renewable sources in the production of consumer goods offers substantial socioeconomic and environmental benefits. The final destination of soybeans must go beyond oil and bran processing, extending its use to different sectors of the economy. The development of a bioprocess to produce bioactive compounds is of interest to environmental and human health, reducing the generation of sludge from water treatment plants, and hence, of

aluminum concentrations that contribute to Alzheimer's disease.

Brazil is the world's biggest soybean producer; hence, the production of γ -PGA in fermented soy substrate shows a very promising potential to add economic and technological value to commodities, as well as future research. γ -PGA is naturally present in products of fermented soybean mucilage consumed in Asian countries, and soy and its derivatives are therefore potential substrates for the production of biopolymer. Thus, glycerol considered a by-product in the production of biodiesel from soy, can be an inexpensive source of nutrients to produce γ -PGA.

Soybean bagasse, which is also a by-product of the biodiesel extraction process, still contains quantities of nutrients that serve as food sources for many microorganisms, thereby producing new compounds. γ -PGA is produced from carbon and nitrogen-based nutrients that are present in soybeans. Therefore, it is important to know the variations in cultivars in order to select the best properties for conversion in the fermentation process.

Since γ -PGA has various biochemical properties, this polymer can perform different functions, depending on the organism and the environment^{1,2}.

*Corresponding author. E-mail: v.campos@unesp.br