

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
TRABALHO DE CONCLUSÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Aluna: Vanessa Zimmer da Silva
Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub, Dr.

CARACTERIZAÇÃO DE γ -PGA PRODUZIDO POR *Bacillus subtilis* BL53

Vanessa Zimmer da Silva*, Alessandra de Cesaro, Marco Antônio Záchia Ayub

Laboratório de Biotecnologia e Engenharia Bioquímica (BiotecLab), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15090, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil

RESUMO

O Ácido γ -Poliglutâmico (γ -PGA), alvo deste estudo, é um biopolímero produzido principalmente por espécies do gênero *Bacillus*, com potencial uso na indústria. O γ -PGA produzido por *B. subtilis* é facilmente extraído do meio de cultivo e a cepa BL53 mostrou-se uma boa produtora de γ -PGA em estudos anteriores. O microrganismo foi cultivado em caldo E em duplicata até 48 horas, sendo mantido em simplificada até 96 horas. Com o objetivo de comparar o biopolímero obtido nos dois tempos de cultivo foram realizadas análises para determinação da massa molecular média, em espalhamento de luz; e para determinação de viscosidade aparente em viscosímetro. Foi obtido um biopolímero de massa molecular média de $1,5 \times 10^6$ g.mol⁻¹ e $1,7 \times 10^6$ g.mol⁻¹ e viscosidade aparente (em 25 g.L⁻¹) de 48,42 mPa.s⁻¹ e 81,88 mPa.s⁻¹ em 48 e 96 horas respectivamente. Estes resultados ilustram o potencial uso do γ -PGA em diferentes setores da indústria, como espessante de alimentos e veículo de medicamentos.

Palavras-chave: Ácido γ -poliglutâmico, *Bacillus subtilis*, biopolímero, caracterização.

INTRODUÇÃO

O ácido γ -Poliglutâmico (γ -PGA) é um poliaminoácido, solúvel em água e muito higroscópico, formado por unidades repetitivas de glutamato que apresentam grupos carboxila ao longo da cadeia principal (4), sendo produzido principalmente por bactérias do gênero *Bacillus*. Para alguns microrganismos o γ -PGA pode ser um componente estrutural constituindo a cápsula (*B. anthracis* e *B. megaterium*) ou, para outros,

livremente difundido no meio auxiliando na sobrevivência (*B. licheniformis* e *B. subtilis*) (6).

Este biopolímero é essencial para as bactérias que o produzem, pois é produzido em condições de estresse, apresentando diferentes funções fisiológicas, dependendo da espécie. No *B. subtilis* é produzido para ser fonte de nutrientes em períodos de escassez, e como sequestrante de íons metálicos em solos contaminados (10). O γ -PGA pode ser aplicado em diversos setores da indústria, podendo ser utilizado na indústria de alimentos como crioprotetor,

*Corresponding Author. Mailing address: Laboratório de Biotecnologia e Engenharia Bioquímica (BiotecLab), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15090, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil E-mail: vanzim@terra.com.br

diminuindo a temperatura de congelamento do alimento; espessante, pela sua alta viscosidade; fator de prevenção à osteoporose, aumentando a biodisponibilização de cálcio no organismo com γ -PGA de alta massa molecular; quelante em tratamento de águas, sequestrando íons metálicos; embalagens biodegradáveis e como hidratante em cosméticos, substituindo o ácido hialurônico. Esta ampla utilização deve-se a sua não toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, solubilidade em água, e biossíntese. (1, 4, 16).

Em 1942, seguindo estudos iniciados em 1937, é estudada uma cepa de *B. subtilis* para a obtenção de ácido poliglutâmico (2). Este é produzido extracelularmente por *B. subtilis* e solubilizado no meio de cultivo, sendo assim mais facilmente separado das células, ao invés de ser sintetizado como componente da cápsula, como em *B. anthracis*. Quando presente na cápsula esse biopolímero é associado como fator de virulência, conferindo proteção anti-fagocitária ao microrganismo. A comprovação é feita quando o mesmo é facilmente fagocitado quando sua cápsula, composta por γ -PGA é degradada por enzimas (2, 14). O *B. subtilis* BL53, previamente selecionado como eficiente produtor de ácido γ -poliglutâmico (15), caracteriza-se por ser um bastonete Gram positivo e produtor de endósporos, além de apresentar colônias caracteristicamente mucóides.

Com este trabalho visamos caracterizar o γ -PGA produzido quanto à massa molecular e viscosidade, comparando dois momentos durante o cultivo (48 e 96 horas) com o objetivo de padronizar o tempo de cultivo. A produção máxima de γ -PGA se dá em 48 h de cultivo (15), havendo intensa polimerização de γ -PGA através do microrganismo,

sendo sua concentração mantida aproximadamente constante durante o restante do tempo, uma vez que o cultivo é conduzido por 96 h. Além disto, também foram feitos testes quanto à eficiência da adição de uma etapa na extração do biopolímero, a concentração do cultivo com ultrafiltração anteriormente à precipitação com etanol.

MATERIAL E MÉTODOS

Microrganismo

O microrganismo produtor de γ -PGA utilizado foi *Bacillus subtilis* BL53, isolado de solo amazônico pelo professor Spartaco Astolfi-Filho do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas.

Cultivo

Foram utilizadas condições adaptadas de estudos anteriores (15), alterando-se apenas o meio de inóculo em biorreator: anteriormente utilizava-se o meio Luria Bertani (Peptona – 10 g.L⁻¹, Extrato de levedura – 5 g.L⁻¹ e NaCl – 10 g.L⁻¹), sendo substituído por Caldo E (pH 7,0 \pm 0,2), já utilizado durante o cultivo submerso e composto por ácido glutâmico (20 g.L⁻¹), ácido cítrico (12 g.L⁻¹), glicerol (80 g.L⁻¹), NH₄Cl (7 g.L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,5 g.L⁻¹), FeCl₃.6H₂O (0,04 g.L⁻¹), K₂HPO₄ (0,5 g.L⁻¹), CaCl₂.2H₂O (0,15 g.L⁻¹), MnSO₄.H₂O (0,04 g.L⁻¹), e ZnSO₄.7H₂O (0,35 g.L⁻¹) (11). O pré-inóculo foi feito em erlenmeyer de 1 L, com 250 mL de meio, por aproximadamente 40 h em agitador orbital (37 °C e 150 rpm), ou até atingir densidade óptica (D.O.) 1,0 \pm 0,1, medida em espectrofotômetro, a 600 nm. O inóculo em biorreator foi feito com 4% do volume total do meio (2,5 L), ou seja, 100 mL deste meio de pré-inóculo. Para o cultivo submerso

foi autoclavado 2,4 L de caldo E em um vaso de 5 L a 121° C e 1 atm por 15 min, a fim de esterilizar o meio e o vaso usado para a produção do biopolímero. O cultivo foi mantido a 37° C, com aeração de 2 vvm e agitação de 1000 rpm, sem controle de pH e com adição de antiespumante quando houver excesso de espuma visto que espuma em excesso pode danificar o aparelho. Este excesso de espuma deve-se a intensa agitação do meio (1000 rpm), que aumenta a transferência de oxigênio no meio. O cultivo foi controlado por uma unidade Biostat (B. Braun Biotech International, Alemanha) e mantido em duplicata até 48 h, mas um dos biorreatores continuou por mais 48 h em simplificada, totalizando 96 h, a fim de comparar as características de ambos os tempos de cultivo.

Extração e quantificação de γ -PGA no cultivo

Para quantificar a produção de γ -PGA durante o cultivo, foram retiradas amostras nos tempos: 0, 4, 8, 12, 24, 36 e 48 h de ambos os cultivos e 73 e 96 h do cultivo mantido por mais tempo. Para a extração do polímero, as amostras são adicionadas de ácido tricloroacético 6,25%, sofrendo uma centrifugação de 15.000 G e 15° C por 20 min. O sobrenadante, que contém o biopolímero, teve o pH ajustado a 7,0 e foi adicionado de etanol para nova centrifugação, sendo esta realizada a 15.000 G e 4° C, por 30 min. O precipitado foi ressuspensionado em tampão fosfato de sódio pH 7,0 \pm 0,2. Já na quantificação, foi feita uma complexação do γ -PGA com Brometo de cetiltrimetilamônio (CET), sendo a absorbância lida em comprimento de onda de 400 nm em espectrofotômetro (9).

Ultrafiltração

Ao final do cultivo de 48 h, o meio fermentado total sofreu de adição de ácido tricloroacético até pH 3,0 para precipitação de células e proteínas, sendo posteriormente centrifugado e tendo o pH do sobrenadante ajustado para 7,0. Na concentração foi utilizado o equipamento Advanced Midjet™ System, com a coluna de filtração UFP-100-E-3MA, que retém partículas maiores de 100000 g.mol⁻¹. Foram retiradas amostras a cada 100 mL de permeado, tanto da amostra retida quanto da amostra permeada, para posterior quantificação da concentração de γ -PGA.

Massa Molecular

A massa molecular média foi definida através de espalhamento de luz dinâmico (8), com o aparelho Brookhaven Instruments (goniômetro BI-200M e correlacionador BI-9000AT) com laser de He-Ne ($\lambda = 632,8$ nm) como fonte de luz. O equipamento foi calibrado previamente com tolueno, e as amostras de γ -PGA foram analisadas em diferentes concentrações: 50, 100, 250, 500, 750 e 1000 g.L⁻¹. Para a diluição das amostras foi utilizado o Tampão Fosfato de Sódio-Potássio pH 7,0 \pm 0,1.

Viscosidade aparente

Para a medição da viscosidade aparente foram utilizados: o viscosímetro Brookfield DV-II + Pro Digital e o programa RHEOCALC para melhor interpretação dos dados. Testes preliminares foram realizados a fim de definir a técnica utilizada na medição da viscosidade das amostras de γ -PGA. Estes testes tiveram por base a viscosidade esperada da amostra (7, 8), e a partir de então foram avaliadas diferentes velocidades e concentrações de γ -PGA,

obtendo uma variação no torque. A partir do torque e de acordo com as limitações do aparelho foi possível definir o spindle a ser utilizado (SC4-18) e as condições a serem empregadas (concentração e velocidade de agitação). Foram então definidas as concentrações de 15, 20 e 25 g.L⁻¹ de cada tempo de cultivo e a velocidade de 25 rpm, aplicada por 15 segundos e posteriormente sendo feita a leitura. Este procedimento foi repetido por 10 vezes, totalizando 10 leituras. O resultado final foi uma média destes pontos. As leituras de viscosidade foram feitas a temperatura de 24±2 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O cultivo de *B. subtilis*, nas condições pré-estabelecidas, alcançou valores próximos de 17 g.L⁻¹ em 24 horas e se manteve parcialmente constante no restante do cultivo (Figura 1). Esta concentração de γ -PGA foi obtida anteriormente apenas em 48 horas (15) e muito provavelmente a antecipação do resultado deveu-se a alteração do meio de inóculo, sendo o mesmo utilizado no cultivo e, por isso,

diminuindo a fase lag (de adaptação) do microrganismo.

Com a ultrafiltração foi possível concentrar a amostra ainda não purificada, onde o objetivo foi diminuir os custos com etanol absoluto e diminuir o tempo gasto, ambos na extração (5). A amostra utilizada, de 48 horas, tinha sua concentração inicial de 15 g.L⁻¹ e foi concentrada até 39,5 g.L⁻¹, não sendo possível concentrar mais pela alta pressão formada e o risco de danificar o equipamento. Tudo o que foi permeado não apresentou concentração expressiva de γ -PGA indicando que o biopolímero produzido apresenta massa molecular maior de 100.000 g.mol⁻¹.

Apesar da possibilidade de concentração da amostra em mais de duas vezes (de 15 g.L⁻¹ à 39,5 g.L⁻¹) e redução da quantidade de etanol utilizado na extração do γ -PGA, a ultrafiltração foi descartada por não ser vantajosa, uma vez que se mostrou uma etapa lenta, levando até 6 h para concentrar 1 litro de amostra, e com resultado pouco expressivo. O etanol utilizado na extração não agrega custos relevantes ao

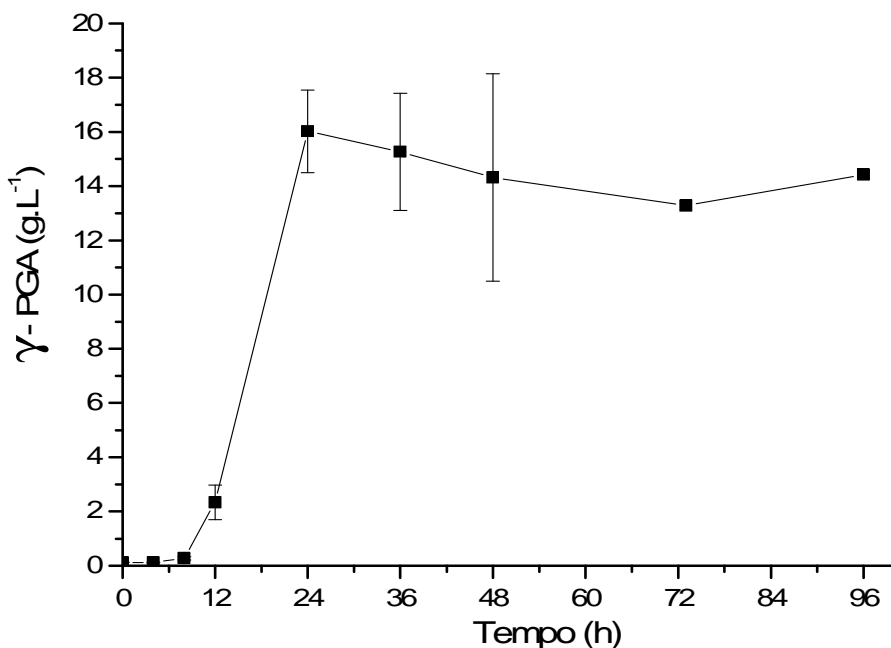


Figura 1: Produção de γ -PGA obtida nos diferentes momentos do cultivo. O desvio padrão indica a diferença na duplicata até 48 horas.

programa, além de poder ser reutilizado na rotina diária do laboratório.

No espalhamento de luz dinâmico foi possível estabelecer a massa molecular de ambas as amostras, 48 e 96 horas respectivamente sendo $(1,5 \pm 0,3) \times 10^6$ g.mol⁻¹ e $(1,7 \pm 0,35) \times 10^6$ g.mol⁻¹, além do raio de giro 108 nm e 116 nm, e o segundo coeficiente virial $1,44 \times 10^{-3}$ cm³.mol.g⁻² e 5×10^{-4} cm³.mol.g⁻². A figura 2 apresenta o diagrama de zimm, obtido no espalhamento de luz, para cada amostra. A massa molecular encontrada está dentro do esperado, uma vez definida entre 10⁵ e 10⁶ g.mol⁻¹ (11) e o resultado é muito promissor, pois, moléculas de γ -PGA com alta massa molecular (10⁶ g.mol⁻¹) são potenciais elementos terapêuticos, sendo veículo para drogas contra o câncer, podendo aumentar a expectativa de vida de pacientes; e no aumento da absorção do cálcio pelo organismo, prevenindo

doenças relacionadas com a falta deste (16). O sinal positivo do coeficiente virial indica que o tampão utilizado é um bom solvente para o biopolímero, mantendo-o estável em solução, com seus domínios bem definidos.

Esperava-se uma massa molecular e viscosidade maiores no tempo de 48 h, pois se acreditava que haveria escassez de nutrientes a partir deste período e posterior quebra do γ -PGA em moléculas menores para disponibilização destes nutrientes. Com os dados obtidos podemos supor que há intensa polimerização ao menos até 96 horas, podendo haver quebras nas extremidades das moléculas, pois a concentração de γ -PGA não se altera, mas possivelmente há diferença na distribuição da massa molecular. Esta suposição é feita a partir dos dados de viscosidade aparente, que como vistos na figura 3, é consideravelmente maior

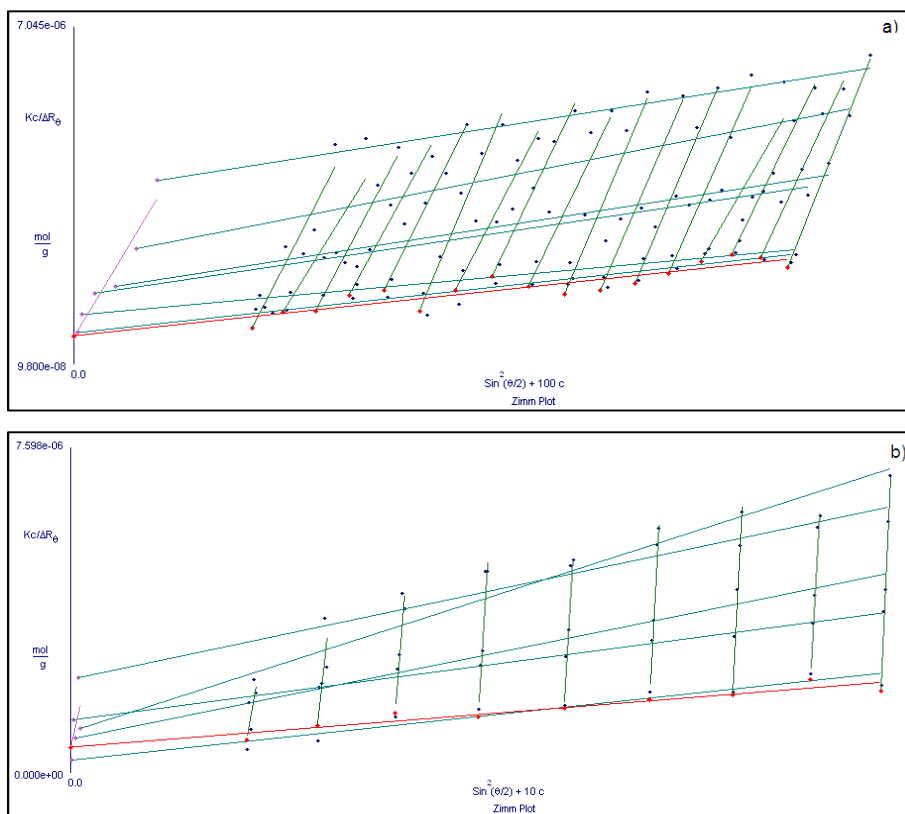


Figura 2: Gráfico de zimm, gerado pelo equipamento de espalhamento de luz, através das amostras referentes ao cultivo de 48 horas (a) e 96 horas (b).

em 96 horas. Baseando-se nesta informação, e sabendo que quanto maior a massa molecular maior a viscosidade, pode-se deduzir que a amostra de tempo de cultivo menor, 48 h, tenha menor distribuição de massa molecular em torno do valor médio obtido no espalhamento de luz, e definido como mínimo de $100000 \text{ g.mol}^{-1}$ pelo teste da ultrafiltração, revelando esta amostra como mais homogênea. Porém, em 96 h possivelmente há maior distribuição de massa molecular em torno da média, apresentando γ -PGA polimerizado com maior massa molecular.

Esta quebra nas cadeias de γ -PGA polimerizado é realizada pelas enzimas endo- γ -glutamil-peptidase e a exo- γ -glutamil-peptidase, que apresentam temperatura e pH ótimos respectivamente $30\text{-}45^\circ \text{ C}$ e $7,0\text{-}10,0$. (13). No *B. subtilis*, estas enzimas não distinguem PDGA de PLGA, apresentado a quebra de ambos enantiômeros de forma semelhante. Porém, a exo- γ -glutamil-peptidase degrada o γ -PGA primeiro em moléculas com 10^5 g.mol^{-1} e então a endo- γ -glutamil-peptidase degrada os intermediários, com 10^5 g.mol^{-1} , em glutamato (3, 10), o que muito provavelmente acontece com a amostra de 96 horas, onde temos grandes cadeias polimerizadas de γ -PGA e algumas já sendo clivadas por estas enzimas, uma vez que estas enzimas agem na fase estacionária tardia (10).

Além da quebra por enzimas, a alta rotação das aletas do biorreator, para gerar a velocidade de agitação de 1000 rpm, poderia estar cisalhando as moléculas de γ -PGA ao longo do tempo. Sendo este cisalhamento percebido mais claramente em 96 horas que em 48 horas.

Para comprovar a polidispersão do polímero nas amostras poderia ser testada a Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), que apresenta faixas de massa molecular nas bandas do gel, e não apenas a média da amostra. O teste não foi realizado devido a não solubilidade do γ -PGA na fase móvel do equipamento disponível.

Também poderiam ser realizados ensaios enzimáticos para averiguar a atuação das enzimas endo- γ -glutamil-peptidase e a exo- γ -glutamil-peptidase sobre as moléculas de γ -PGA ao final do cultivo.

Para concluir, estudos posteriores podem ser elaborados para a definição dos melhores parâmetros para o microrganismo em questão, relacionando com sua fisiologia. Além disto, as condições de uso nas aplicações deverão ser estabelecidas, elaborando testes e análises para comprovar a utilidade e as propriedades do γ -PGA.

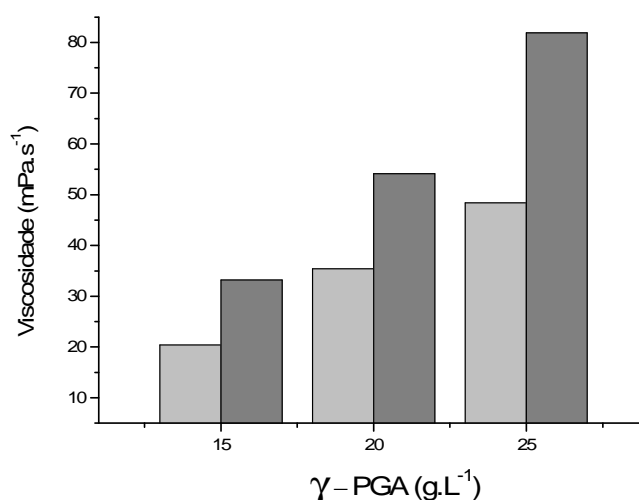


Figura 3: Comparação da viscosidade do γ -PGA em amostras de cultivo de 48 horas (barra cinza claro) e de 96 horas (barra cinza escuro).

BIBLIOGRAFIA

1. Bajaj, I.; Singhal, R. (2011). Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*, 102, 5551-5561.
2. Bovarnick, M. (1942). The formation of extracellular D(-)glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 145, 415-424.
3. Buescher, J. M.; Margaritis, A. (2007). Microbial biosynthesis of polyglutamic acid biopolymer and applications in the biopharmaceutical, biomedical and food industries. *Critical Reviews in Biotechnology*, 27 (1), 1-19.
4. Candela, T; Fouet, A. (2006). Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Molecular Microbiology*, 60 (5), 1091-1098.
5. Do, H.J.; Chang, H.N.; Lee, S.Y. (2001). Efficient Recovery of γ -Poly (Glutamic Acid) from highly viscous culture broth. *Biotechnology and Bioengineering*, 76 (3), 219-223.
6. Gross, R. A. (1998). “Bacterial γ -Poly(glutamic acid)”, in: *Biopolymers from Renewable Resources*, D. L. Kaplan, Ed., Springer-Verlag, Berlin, cap 8, 195 – 219.
7. Ho *et al* (2006). γ -Polyglutamic Acid Produced by *Bacillus subtilis* (natto): Structural Characteristics, Chemical Properties and Biological Functionalities. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 53, 1363-1384.
8. Irurzun, I.; Bou, J. J.; Pérez-Camero, G.; Abad, C., Campos, A.; Muñoz-Guerra, S. (2001). Mark-Houwink Parameters of Biosynthetic Poly(γ -glutamic acid) in Aqueous Solution. *Macromol. Chem. Phys.*, 202, 3253–3256.
9. Kanno, A.; Takamatsu, H. (1995). Determination of polyglutamic acid in “Natto” using cetyltrimethylammonium bromide (Studies on “Natto” part V). *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 42, 878–886.
10. Kimura, K.; Tran, L.S.P.; Uchida, I.; Itoh, Y. (2004). Characterization of *Bacillus subtilis* γ -glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly- γ -glutamate. *Microbiology*, 150, 4115–4123.
11. Kunioka, M. (2004). Biodegradable water absorbent synthesized from bacterial poly(amino acid)s. *Macromolecular Bioscience*, 4, 324–329.
12. Leonard, C.G.; Housewright, R.D.; Thorne, C.B. (1958). Effects of some metallic ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 76 (5), 499-503.
13. Richard, A.; Margaritis, A. (2006). Kinetics of molecular weight reduction of poly(glutamic acid) by in situ depolymerization in cell-free broth of *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal*, 30, 303–307.
14. Scorpio, A; Chabot, D.J.; Day, W.A.; O’Brien, D.K.; Vietri, N.J.; Itoh, Y.; Mohoamadzhdeh, M.; Friedlander, A.M. (2007). Poly- γ -Glutamate Capsule-Degrading Enzyme Treatment Enhances Phagocytosis and Killing of Encapsulated *Bacillus anthracis*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 51 (1).
15. Silva, S.B. (2010). Produção e otimização do processo de obtenção de ácido γ - poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53. Tese de doutorado –Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
16. Sung, M.H.; Park, C.; Kim, C.J.; Poo, H.; Soda, K.; Ashiuchi, M. (2005). Natural and Edible Biopolymer Poly-g-glutamic Acid: Synthesis, Production, and Applications. *The Chemical Record*, 5, 352–366.