

OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus*  
PAL5 EM SISTEMA DESCONTÍNUO VISANDO A MAXIMIZAÇÃO DA  
PRODUÇÃO DE BIOMASSA

**Scheila de Paula Oliveira Siqueira**

Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF

Campos dos Goytacazes - RJ  
Novembro de 2015

OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus*  
PAL5 EM SISTEMA DESCONTÍNUO VISANDO A MAXIMIZAÇÃO DA  
PRODUÇÃO DE BIOMASSA

**Scheila de Paula Oliveira Siqueira**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Prof. (a) Dra. Marília Amorim Berbert de Molina

Campos dos Goytacazes - RJ  
Novembro de 2015

OTIMIZAÇÃO DO CULTIVO DE *Gluconacetobacter diazotrophicus*  
PAL5 EM SISTEMA DESCONTÍNUO VISANDO A MAXIMIZAÇÃO DA  
PRODUÇÃO DE BIOMASSA

**Scheila de Paula Oliveira Siqueira**

Tese apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense – Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Doutora em Biociências e Biotecnologia.

Aprovada em 06 de novembro de 2015.

Comissão examinadora:

---

Prof. Dr. Arnaldo Márcio Ramalho Prata (Bs. em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica/Tecnologia de Fermentações) – EEL/USP

---

Prof. Dr. Fabrício Siqueira Boniolo (Bs. Em Biociências e Biotecnologia) – Corbion

---

Prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho (Bs. em Biociências e Biotecnologia) – CBB/UENF

---

Prof. Dra. Marília Amorim Berbert de Molina (Bs. em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica/Tecnologia de Fermentações) – CBB/UENF - Orientadora

“Não existe um caminho para a felicidade.  
A felicidade é o caminho.”

*Mahatma Gandhi*

Dedico este trabalho aos meus queridos e amados pais:  
Emanoel (*in memoriam*) e Maria Alice.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Norte Fluminense, e em particular ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, pela oportunidade de realização do curso;

Ao Laboratório de Biotecnologia (LBT/CBB), pelo espaço cedido para concretização deste trabalho;

À CAPES pelo apoio financeiro;

A Deus por me permitir chegar até aqui;

Ao meu pai, Emanuel de Paula Siqueira (*in memoriam*), pela sua sabedoria, por acreditar em mim, pela grandeza do seu amor. Você sempre estará presente em minha vida. Sua memória é exemplo de amor, dignidade e perseverança. Agradeço a você por ter sido meu pai! Amo-te eternamente!

À minha mãe, Maria Alice de Oliveira Siqueira, pelo amor e carinho de mãe, pelo seu incentivo, pelos seus gestos solidários, pela sua fé, por me ensinar a não desistir dos meus sonhos, por compartilhar de muitas das minhas angústias e conquistas. Você é tudo pra mim!

Ao meu noivo, Gerlan Gomes Rodriguez, que soube entender a minha ausência nos momentos que estava me dedicando às atividades do doutorado, pelo apoio e ajuda, pelo seu carinho e amor, e pela sua presença em minha vida;

À minha irmã, Consuelo, pelo carinho e apoio nos momentos difíceis;

À minha orientadora, professora Marília Amorim Berbert de Molina, pelo exemplo de competência, pelos ensinamentos, pelas críticas, pela paciência, e principalmente pela confiança em mim;

Ao professor Arnaldo Márcio Ramalho Prata por aceitar o convite de participar da banca examinadora;

Ao professor Fabrício Siqueira Boniolo por aceitar o convite de participar da banca examinadora;

Ao professor Gonçalo Apolinário de Souza Filho por aceitar o convite de participar da banca examinadora;

Ao professor Francisco José Alves Lemos por aceitar revisar a tese;

Ao professor Vanildo Silveira e seus alunos pelos ensinamentos e suporte na operação do HPLC durante as análises das amostras de fermentação;

À minha amiga da UFRJ, Stella Maris, pelo companheirismo, pelo apoio e pela reorganização das suas atividades institucionais de forma que permitisse o meu afastamento para a realização do doutorado;

A todos do grupo de trabalho: Franciele, Gabriela, Milena, Nathália e Raphael pelo suporte e convivência agradável, e especialmete à Wanessa pelo apoio nas inúmeras madrugadas que estava realizando os ensaios de fermentação.

À equipe técnica do LBT, Adão, Eduardo, Patrícia, Telma pelo suporte e por sempre estarem dispostos a ajudar. Especialmente a minha prima, Rívea, pelo apoio nos momentos necessários e pela amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram para realização e conclusão deste trabalho.

## RESUMO

*Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia, acidotolerante, endofítica de algumas espécies vegetais. Apresenta a capacidade de fixar nitrogênio atmosférico e excretar parte dele para o hospedeiro, além da habilidade de sintetizar hormônios que também auxiliam na promoção do crescimento vegetal. A bactéria oxida glicose a ácido glicônico por duas vias distintas: uma que inclui a captação e oxidação intracelular, mediada por uma NAD-GDH, seguida da dissimilação através da via das pentoses fosfato, e outra, que consiste na oxidação direta, no espaço periplasmático, através de uma PQQ-GDH ligada à membrana, a qual é a principal rota para o metabolismo do carboidrato. Também produz enzimas que levam a produção de polímeros de interesse da indústria de alimentos, como frutooligosacarídeos e levana. Em função das características metabólicas, a espécie tem grande potencial para aplicações biotecnológicas, como a produção de inoculantes agrícolas, ácido glicônico e os frutanos mencionados. O presente trabalho teve como objetivo estudar a cinética da fermentação de glicose por *G. diazotrophicus* PAL em diferentes condições, visando obter elevadas concentrações de células da bactéria, com vistas à sua aplicação em processo tecnológico de produção de inoculantes. A produção de ácido glicônico foi concomitantemente estudada, de modo a avaliar o potencial da bactéria para o processo comercial de obtenção do produto. Os ensaios foram feitos em biorreator de bancada com controle de todas as variáveis de processo, utilizando meio com glicose, extrato de levedura (YE), peptona e sais, pH 6,0 e 30 °C. Ensaios realizados em meios com concentrações iniciais crescentes de glicose ( $S_0$ ) (20-60 g/L) e sem controle das concentrações de oxigênio dissolvido (OD) mostraram a limitação do cultivo pelo oxigênio com o maior  $S_0$ . Com  $S_0$  entre 40 e 120 g/L e condições de aeração controladas para manter OD em 20% da saturação, as máximas velocidades específicas de crescimento ( $\mu_m$ ) não foram afetadas, indicando ausência de inibição do cultivo. A máxima concentração de células ( $X_m = 11,6$  g/L) aumentou com  $S_0$  até 80 g/L, mas foi prejudicada com  $S_0$  de 120 g/L ( $X_m = 9,7$  g/L), em consequência da escassez de YE no meio, com redução da produtividade em células ( $Q_x = 0,57$  g/L.h). A formação de ácido glicônico seguiu a mesma tendência, sendo obtido máximo rendimento (R) de 74% com  $S_0$  de 80 g/L. A realização de pulsos de nutrientes durante o cultivo mostrou que a concentração de extrato de levedura é determinante para o melhor desempenho da bactéria. Com concentração total de glicose de 91 g/L e dois pulsos de YE (total de 18 g/L), foram obtidos 14,6 g/L de células e aumento de  $Q_x$ , mas ao rendimento em ácido glicônico caiu para 46%. Ao alterar a relação C:N inicial do meio, com emprego de maior  $S_0$  e maior concentração inicial de YE, houve redução de  $X_m$  (máximo de 12,6 g/L) e do rendimento em ácido glicônico (R=48-59%). Os dados mostraram, portanto, que a melhor estratégia para o processo é adição parcelada de nutrientes durante o cultivo. As concentrações celulares obtidas no trabalho são expressivamente mais elevadas que os valores encontrados na literatura para *G. diazotrophicus* e reforçam a viabilidade para seu emprego no processo tecnológico de produção de inoculantes agrícolas. Da mesma forma, as concentrações de ácido glicônico alcançadas nas condições estudadas mostram que a bactéria também pode ser considerada para aplicação no processo de produção do composto em larga escala.

## ABSTRACT

*Gluconacetobacter diazotrophicus* is a gram-negative, aerobic, acid tolerant an endophytic bacteria found in some plant species. It has the ability to fix  $N_2$  and to excrete part of this nutrient to the plant host. It has also the ability to synthesize hormones and other substances, which together with diazotrophic activity promote plant growth. The bacterium oxidizes glucose to gluconic acid by two different pathways: the uptake and intracellular oxidation mediated by an NAD-GDH, followed by dissimilation through the pentose phosphate pathway, and another one by direct oxidation by a PQQ-GDH membrane bound enzyme in the periplasm, which is the primary route for carbohydrate metabolism in this species. It also produces enzymes that lead to the production of polymers with food industry, as fructooligosaccharide and levan. These outstanding metabolic characteristics species make it a candidate for numerous biotechnological applications, including the production of agricultural inoculants, gluconic acid and fructans. This work aimed to study the kinetics of glucose fermentation by *G. diazotrophicus* PAL in different process conditions in order to obtain high cells concentrations, in view to their application to inoculants production. The gluconic acid production was concomitantly investigated in order to assess the bacteria potential of for the commercial production of this organic acid. The fermentation assays were done in a bench bioreactor fully equipped to control all process variables. A media containing glucose, yeast extract (YE), peptone and salts was used and the pH was kept at 6.0 and temperature at 30 °C. In media that had initial glucose concentrations ( $S_0$ ) from 20 to 60 g/L and without control of dissolved oxygen concentrations (DO) there was inhibitory effect by oxygen limitation when the highest  $S_0$  was used. With  $S_0$  between 40 and 120 g/L and DO values controlled at 20% of the saturation, the maximum specific growth rates ( $\mu_m$ ) were not affected, indicating lack of cells inhibition. The maximum cell concentration ( $X_m=11.6$  g/L) increased with  $S_0$  up to 80 g/L, but with 120 g/L the growth was lower ( $X_m=9.7$ g/L) due to YE limitation, with reduced cell productivity ( $Q_x=0.57$  g/L.h). The gluconic acid formation followed the same trend with maximum yield (R) of 74% with  $S_0$  of 80 g/L. Nutrient pulses during cultivation runs showed that the yeast extract concentration is essential for the best performance of the bacteria. With glucose concentration of 91 g/L and two glucose-YE pulses (total YE=18 g/L) the biomass concentration was 14.6 g/L with increased  $Q_x$ , however the gluconic acid yield was 46%. Changing the initial C:N employing higher  $S_0$  and higher initial YE concentration a reduction of the  $X_m$  (12.6 g/L) and the gluconic acid yield (R=48-59%) were observed. The data showed that the best strategy to increase cell concentrations is by addition of the nutrients during cultivation instead of the greater initial nutrient concentrations. The cell concentrations obtained in this work are significantly higher than the values found in the literature for *G. diazotrophicus* and reinforce the feasibility of its use in the biotechnological process for agricultural inoculants production. Likewise, the gluconic acid concentrations achieved shows that this bacterial species can also be considered a potential candidate for the industrial production of this organic acid.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Eletromicrografia da bactéria <i>G. diazotrophicus</i> , mostrando os flagelos peritríqueos e o formato baciliforme. As dimensões celulares são 0,7-0,9 $\mu\text{m}$ por 2 $\mu\text{m}$ (Gillis <i>et al.</i> , 1989).	21
<b>Figura 2</b>	Esquema simplificado do metabolismo de glicose em <i>G. diazotrophicus</i> . Enzimas: 1) glicoquinase, 2) glicose 6-fosfato desidrogenase, 3) lactonase, 4) 6-fosfogliconato desidrogenase, 5) transcetolase, 6) transaldolase, 7) NAD- glicose desidrogenase, 8) gliconoquinase, 9) NAD-gliconato desidrogenase, 10) 2-cetogliconato redutase, 11) 5-cetogliconato redutase, 12) 2-cetogliconato desidrogenase, 13) 5-cetogliconato desidrogenase, PQQ-GDH: Pirrolo-quinolino-quinona ligada a glicose desidrogenase. Adaptado de Alvarez e Martinez-Drets, 1995; Luna <i>et al.</i> , 2000	28
<b>Figura 3</b>	Curva de calibração para determinação da concentração celular por turbidimetria.	49
<b>Figura 4</b>	Concentração de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangledown$ ), ácido glicônico ( $\blacklozenge$ ) [A] e oxigênio dissolvido ( $\bullet$ ) [B] em função do tempo no ensaio G20.	54
<b>Figura 5</b>	Concentração de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangledown$ ), ácido glicônico ( $\blacklozenge$ ) [A] e oxigênio dissolvido ( $\bullet$ ) [B] em função do tempo no ensaio G40.	55
<b>Figura 6</b>	Concentração de células ( $\blacksquare$ ), glicose ( $\blacktriangledown$ ), ácido glicônico ( $\blacklozenge$ ) [A] e oxigênio dissolvido ( $\bullet$ ) [B] em função do tempo no ensaio G60.	56
<b>Figura 7</b>	Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) ( $\text{---}$ ), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) ( $\text{---}$ ), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) ( $\text{---}$ ), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) ( $\text{---}$ ) [A]; e velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) ( $\text{---}$ ), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) ( $\text{---}$ ), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) ( $\text{---}$ ) [B] em função do tempo no ensaio G20.	57
<b>Figura 8</b>	Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) ( $\text{---}$ ), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) ( $\text{---}$ ), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) ( $\text{---}$ ), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) ( $\text{---}$ ) [A]; e velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) ( $\text{---}$ ), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) ( $\text{---}$ ), e de formação de ácido glicônico	58

( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G40.

- Figura 9** Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; e velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G60. 60
- Figura 10** Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E], e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) [D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo nos Ensaio G20 (■ —); G40 (• —) e G60 (▼ —). 61
- Figura 11** Oxigênio dissolvido em função do tempo nos ensaios G20 (■), G40 (•) e G60 (▼). 64
- Figura 12** Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G40\*. 75
- Figura 13** Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G40\*. 75
- Figura 14** Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G60\*. 76
- Figura 15** Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G60\*. 76
- Figura 16** Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G80\*. 77
- Figura 17** Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G80\*. 77

<b>Figura 18</b>	Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G120*.	78
<b>Figura 19</b>	Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G120*.	78
<b>Figura 20</b>	Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E], e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) [D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo nos Ensaio G40 (■ —) e G40*(• - - -).	82
<b>Figura 21</b>	Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E], e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) [D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo nos Ensaio G60 (■ —) e G60*(• - - -).	83
<b>Figura 22</b>	Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E], e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) [D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo nos Ensaio G40* (■ —); G60* (• —); G80* (▼ —) e G120* (◆ —).	88
<b>Figura 23</b>	Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G40*-PG. A seta indica o momento da suplementação do meio com glicose.	92
<b>Figura 24</b>	Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A] e velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—) e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B], em função do tempo, no ensaio G40*-PG.	92
<b>Figura 25</b>	Concentração de células [A] e de ácido glicônico [B] em função do tempo nos ensaios G40* (■) e G40*-PG (•).	93
<b>Figura 26</b>	Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G40*-PGYE. A seta indica o momento da suplementação do meio com glicose e extrato de levedura.	95
<b>Figura 27</b>	Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido	95

glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G40\*-PGYE.

- Figura 28** Concentração de células [A] e de ácido glicônico [B] em função do tempo nos ensaios G40\*-PG (●) e G40\*-PGYE (■). 96
- Figura 29** Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (●) [B] em função do tempo no ensaio G40\*-2PGYE. As setas indicam o momento da suplementação do meio com glicose e extrato de levedura. 97
- Figura 30** Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [A] e velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) [B] em função do tempo no ensaio G40\*-2PGYE. 97
- Figura 31** Concentração de células em função do tempo nos ensaios G40\*-PGYE (■) e G40\*-2PGYE (●) [A]; Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) nos ensaios G40\*-PGYE (—) e G40\*-2PGYE (- - -) [B]. 98
- Figura 32** Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (●) [B] em função do tempo no ensaio G140\*-PYE. A seta indica o momento da suplementação do meio com extrato de levedura. 100
- Figura 33** Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; e velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G140\*-PYE. 101
- Figura 34** Concentração de células em função do tempo nos ensaios G140\*-PGYE (▲) e G40\*-2PGYE (●) [A]; Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) nos ensaios G140\*-PYE (—) e G40\*-2PGYE (- - -) [B]. 102
- Figura 35** Concentração de células em função do tempo nos ensaios G120\* (■) e G140\*-PYE (●) [A]; Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) nos ensaios G120\* (—) e G140\*-PYE (- - -) [B]. 103
- Figura 36** Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (●) [B] em função do tempo no ensaio G60\*-2YE. 106

<b>Figura 37</b>	Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G60*-2YE.	106
<b>Figura 38</b>	Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G80*-3YE.	107
<b>Figura 39</b>	Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G80*-3YE.	107
<b>Figura 40</b>	Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E], e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ )[D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo, nos Ensaios G60*-2YE (■ —) e G80*-3YE (• - -).	108
<b>Figura 41</b>	Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E] e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ )[D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo, nos Ensaios G60*-2YE (■ —) e G60* (• - -).	112
<b>Figura 42</b>	Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E] e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ )[D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo, nos Ensaios G80*-3YE(■ —) e G80* (• - -).	113

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Composição dos meios de cultivo DYGS <sub>m</sub> e GDS.	44
<b>Tabela 2</b>	Composição dos meios de cultivo GDS <sub>2N</sub> , GDS <sub>4N</sub> e GDS <sub>6N</sub> .	45
<b>Tabela 3</b>	Parâmetros gerais do cultivo de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 em meio GDS <sub>2N</sub> com concentrações iniciais crescentes de glicose, em ensaios realizados em fermentador de bancada sem controle da concentração de oxigênio dissolvido (Ensaio G20, G40 e G60).	62
<b>Tabela 4</b>	Máximas velocidades instantâneas de consumo de substrato (dS/dt), de formação de ácido glicônico (dP/dt), de consumo de ácido glicônico (dSP/dt) e de crescimento (dX/dt) nos ensaios G20, G40 e G60, com indicação dos níveis de concentrações de oxigênio dissolvido no intervalo em que foram observadas.	66
<b>Tabela 5</b>	Parâmetros gerais do cultivo de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 em meio GDS <sub>2N</sub> com concentrações iniciais crescentes de glicose de aproximadamente 40, 60, 80 e 120 g/L e concentração de oxigênio dissolvido controlada em 20% da saturação (Ensaio G40*, G60*, G80* e G120*, respectivamente).	79
<b>Tabela 6</b>	Parâmetros gerais do cultivo de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 em meio GDS <sub>2N</sub> com concentração inicial de glicose de 40 g/L e alimentação com glicose em um único pulso (G40*-PG), com glicose e extrato de levedura em um ou dois pulsos (G40*-PGYE e G40*-2PGYE, respectivamente) e com concentração inicial de glicose de 140 g/L e alimentação única com extrato de levedura (Ensaio G140*-PYE).	90
<b>Tabela 7</b>	Parâmetros gerais do cultivo de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 em meio GDS <sub>4N</sub> (Ensaio G60*-2YE) e GDS <sub>6N</sub> (Ensaio G80*-3YE).	105
<b>Tabela 8</b>	Principais parâmetros de fermentação relacionados ao crescimento de <i>G. diazotrophicus</i> PAL5 obtidos em diferentes ensaios.	114

## LISTA DE ABREVIações

$\Delta S$	Total de glicose consumida
$\mu m$	Micrômetro
$\mu_P$	Velocidade específica de formação de ácido glicônico
$\mu_S$	Velocidade específica de consumo de glicose
$\mu_x$	Velocidade específica de crescimento
$\mu_{xm}$	Máxima velocidade específica de crescimento
ADH	Álcool desidrogenase
AIA	Ácido indol-acético
ALDH	Aldeído desidrogenase
ATP	Adenosina trifosfato
C:N	Relação carbono:nitrogênio
DO	Densidade óptica
DYGSm	Meio DYGS modificado
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
FOS	Frutoligossacarídeos
GDH	Glicose desidrogenase
HMP	Via das hexoses monofosfato
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
KD	Quilodalton
$k_{La}$	Coefficiente volumétrico de transferência de oxigênio
LsdA	Levansucrase A
LsdB,	Levansucrase B
NAD-GDH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada a glicose desidrogenase
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
OD	Oxigênio Dissolvido
Pb	Par de bases
$pO_2$	Pressão parcial de oxigênio
PQQ	Pirroloquinolina quinona
PQQ-GDH	Pirroloquinolino quinona ligada a glicose desidrogenase

PQQH <sub>2</sub>	Pirroloquinolina quinona reduzida
Q <sub>P</sub>	Produtividade em produto
Q <sub>X</sub>	Produtividade em células
R	Rendimento em ácido glicônico
RNA	Ácido ribonucléico
RNA <sub>r</sub>	Ácido ribonucléico ribossomal
RNA <sub>t</sub>	Ácido ribonucléico transportador
S <sub>0</sub>	Concentração inicial de substrato
S <sub>t</sub>	Concentração do substrato no instante t
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
t <sub>f</sub>	Tempo total de fermentação
t <sub>xm</sub>	Tempo para obtenção da máxima concentração celular
v/v	Volume por volume
X	Concentração celular
X <sub>0</sub>	Concentração celular inicial
X <sub>m</sub>	Máxima concentração celular
Y <sub>P/S</sub>	Fator de conversão de glicose em ácido glicônico
Y <sub>X/S</sub>	Fator de conversão de substrato em células

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
1.1 <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....	19
1.1.1 - Aspectos fenotípicos, fisiológicos e genotípicos .....	19
1.1.2 - Caracterização metabólica.....	23
1.1.3 - A associação com plantas e os benefícios da atividade diazotrófica .....	29
1.1.4 - Potencial agrobiotecnológico .....	32
1.1.5 - Outras características de interesse industrial .....	35
1.1.5.1 - Produção de ácido glicônico e ceto-derivados.....	35
1.1.5.2 - Produção de frutanos .....	38
1.2 - Processo fermentativo com <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> .....	39
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
2.1 - Objetivo Geral .....	43
2.2 - Objetivos específicos .....	43
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
3.1 - Micro-organismo.....	44
3.2 - Meios de Cultivo.....	44
3.3 - Condições de cultivo .....	45
3.3.1 - Preparo das culturas estoque .....	45
3.3.2 - Preparo de inóculo.....	46
3.3.3 - Ensaio de fermentação .....	46
3.4 - Métodos Analíticos.....	48
3.4.1 - Morfologia celular.....	48
3.4.2 - Concentração celular .....	48
3.5 - Concentração de glicose.....	50
3.6 - Quantificação de ácido glicônico e seus cetos-derivados .....	50
3.7 - Cálculos de parâmetros de fermentação.....	50
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
4.1 - Fermentação em meios com concentrações iniciais crescentes de glicose.....	53
4.2 - Fermentação em meios com concentrações iniciais crescentes de glicose e com controle da concentração de oxigênio dissolvido .....	74
4.3 - Cinética da fermentação com variação das concentrações de glicose e extrato de levedura no meio	89

4.3.1 - Alimentação dos nutrientes no curso do processo.....	89
4.3.2 - Meios com maior concentração inicial de extrato de levedura .....	103
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>115</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>116</b>

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

### 1.1.1 - Aspectos fenotípicos, fisiológicos e genotípicos

*Gluconacetobacter diazotrophicus* é uma espécie bacteriana da família Acetobacteriaceae, que compreende um grupo conhecido como Bactérias do Ácido Acético (BAA) (Yamada e Yukphan 2008; Mamlouk e Gullo, 2013). Muitas possuem uma cadeia respiratória caracteristicamente ativa e podem oxidar alcoóis, açúcares e açúcares-álcool, excretando para o meio de cultivo os produtos correspondentes da reação (Matsushita *et al.*, 1994; Matsushita *et al.*, 2004). Este processo recebe o nome de “fermentação oxidativa”, uma vez que envolve a oxidação incompleta do substrato e acúmulo de grande quantidade do produto gerado (Adachi *et al.*, 2003; Mamlouk e Gullo, 2013).

Mais de 10 gêneros fazem parte da família Acetobacteriaceae (Yamada e Yukphan, 2008), mas *Gluconacetobacter* é o gênero com o maior número de espécies e maior variedade de características fisiológicas, incluindo a produção de ácidos orgânicos, a fixação de nitrogênio, a síntese de polímeros, como celulose e levana, entre outros. O habitat destas espécies inclui frutas, soluções açucaradas, insetos e vegetais (Velasco-Bedrán e López-Isunza, 2007).

A primeira descrição da bactéria *G. diazotrophicus* data de 1988, quando Cavalcante e Döbereiner publicaram os dados sobre seu isolamento a partir de colmos e raízes de plantas frescas de cana-de-açúcar (Cavalcante e Döbereiner, 1988). O achado foi feito durante pesquisa sobre eventuais espécies bacterianas relacionadas à fixação de nitrogênio nesta espécie vegetal, e foi realizada em diversas regiões produtoras do Brasil. Baseado nas diferentes características morfológicas e fisiológicas analisadas no estudo, os pesquisadores denominaram a nova espécie como *Saccharobacter nitrocaptans*, e ressaltaram a sua capacidade diazotrófica como uma característica peculiar e de potencial importância prática. Um ano mais tarde, tomando como base resultados de hibridização DNA-RNA e homologia DNA-DNA, juntamente com análises fenotípicas e quimiotaxonômicas, Gillis *et al.* (1989) consideraram que o isolado constituía uma espécie do gênero *Acetobacter*, pela habilidade de crescer em meios com pH baixos e formar ácido acético a partir de etanol. Por outro lado, em função também da capacidade de

utilizar N<sub>2</sub> como única fonte de nitrogênio para crescimento, os autores propuseram a substituição da nomenclatura para *Acetobacter diazotrophicus*. Posteriormente, Yamada *et al.* (1997), baseando-se em análises de sequências do RNA ribossomal 16S, recomendaram um novo esquema taxonômico para a família Acetobacteriaceae, renomeando mais uma vez a bactéria, que passou a se chamar *Gluconacetobacter diazotrophicus*.

A amplificação do gene RNA ribossomal 16S de *G. diazotrophicus* e das espécies diazotróficas *G. johanne* e *G. azocaptans*, isoladas posteriormente, mostraram que a amplificação deste fragmento pode ser considerada específica para tais bactérias fixadoras de nitrogênio (Sievers *et al.*, 1998). A caracterização específica de *G. diazotrophicus* pode ser feita mediante amplificação do RNA ribossomal 23S (Kirchhof *et al.*, 1998).

Os trabalhos de Cavalcante e Döbereiner (1988) e Gillis *et al.* (1989), que realizaram diferentes testes bioquímicos e fenotípicos, resultaram na caracterização detalhada de *G. diazotrophicus*. Trata-se de uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonetes com extremidades arredondadas, com 0,7 e 0,9 µm de diâmetro e 1 a 2 µm de comprimento, com 1 a 3 flagelos laterais. É ácido-tolerante, não formadora de esporos e aeróbica obrigatória. A Figura 1 apresenta uma eletromicrografia da bactéria, publicada no trabalho de Gillis *et al.* (1989). Os autores relataram que, em cultivos em meio não agitados, a bactéria forma longas formas de involução. Boniolo *et al.* (2009) verificaram, por outro lado, que em cultivos em frascos agitados, em meios contendo fontes complexas de nitrogênio, as células de *G. diazotrophicus* PAL5 apresentaram-se em arranjos de diplobacilos curtos, mas formaram longos filamentos quando o meio foi suplementado com 200 mM de NaCl. Células longas e pleomórficas da bactéria também foram observadas por Muthukumarasamy *et al.* (2002) durante cultivo em meios com altos níveis de íons amônio.

O isolamento de *G. diazotrophicus* pode ser realizado em meios de cultivo semi-sólido isento de fonte de nitrogênio e a distinção entre a bactéria e outras espécies do gênero pode ser feita pela sua capacidade de formar colônias de cor marrom escuro, após sete dias de incubação, em meio de cultura ágar batata contendo 10% de sacarose. As colônias são planas e de formato irregular (Cavalcante e Döbereiner (1988). Em meio LGI-P (Magalhães *et al.*, 1983) semi-sólido, pobre em nitrogênio, e contendo azul de bromotimol, verifica-se a formação de uma película aerotóxica de cor amarela, situada logo abaixo da superfície.

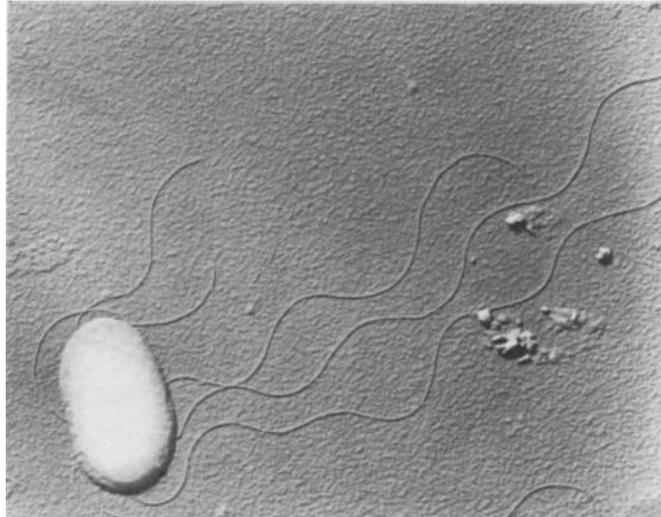


Figura 1 – Eletromicrografia da bactéria *G. diazotrophicus*, mostrando os flagelos peritríqueos e o formato baciliforme. As dimensões celulares são 0,7-0,9  $\mu\text{m}$  por 2  $\mu\text{m}$  (Gillis *et al.*, 1989).

Além da capacidade de utilizar  $\text{N}_2$  atmosférico, a bactéria pode ser cultivada em meios minerais contendo íons amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989; Alvarez e Martinez-Drets, 1995; Atwood *et al.*, 1991). No entanto, o emprego de fontes complexas de nitrogênio e outros nutrientes, como extrato de levedura e peptonas, favorece a produção de biomassa (Atwood *et al.*, 1991; Boniolo *et al.*, 2009; Nunes, 2010; Molinari e Boiardi, 2013).

Nitrato não é reduzido pela bactéria, que não possui a enzima nitrato redutase, e nem o crescimento nem a atividade nitrogenase são afetadas por altas (10 mM) concentrações deste íon (Cavalcante e Döbereiner, 1988).

Cavalcante e Döbereiner (1988) verificaram que, além de sacarose e glicose, *G. diazotrophicus* pode crescer em meio com outras fontes de carbono, incluindo frutose, galactose, arabinose, manose, etanol, glicerol, manitol, i-inositol e maltose. À exceção dos três últimos, a produção de ácido foi observada na presença de todas os demais compostos, o que foi verificado, no trabalho destes autores, apenas pela redução do pH do meio. Os ácidos produzidos pela bactéria são o ácido glicônico e seus derivados, 2-cetoglicônico e 5-cetoglicônico (Gillis *et al.*, 1989; Atwood *et al.*, 1991; Stephan *et al.*, 1991; Galar e Boiardi, 1995; Alvarez e Martinez-Drets, 1995; Molinari e Boiardi, 2013). De acordo com Alvarez e Martinez-Drets (1995), a bactéria não é capaz de utilizar os ácidos dicarboxílicos fumarato, succinato e malato para o

crescimento, embora as vias de metabolismo destes compostos estejam presentes na bactéria. No entanto, Cavalcante e Döbereiner (1988) observaram baixo crescimento na presença dos dois últimos, bem como com acetato, citrato e lactato. Tejera *et al.* (2004) verificaram que aminoácidos como glutamato, serina, alanina e histidina também podem ser utilizadas eficientemente pela bactéria como fonte de carbono e de nitrogênio.

A temperatura ótima para o crescimento está em torno de 30 °C (Gillis *et al.*, 1989). A bactéria é capaz de crescer em pH em torno de 3, tanto em condições de diazotrofia quanto na presença de amônio, mas o ótimo para crescimento, segundo os primeiros trabalhos de caracterização da bactéria, é 5,5 (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Gillis *et al.*, 1989; Stephan *et al.*, 1991). Luna e Boiardi (2008) verificaram, em ensaios em sistema de fermentação contínua e condições de fixação biológica de nitrogênio (FBN), que a faixa ótima de pH para o crescimento foi 5,5 a 6,0, enquanto nas faixas 2,5 a 4 ou 7 a 7,5 ocorreu diminuição significativa do rendimento em células. Valores de pH acima de 7,5 inibiram o crescimento. Em sistema descontínuo, sob FBN e pH 3,5, o rendimento em biomassa foi a metade daquele obtido com pH 5,5.

O sequenciamento do genoma de *G. diazotrophicus* PAL5, feito por um consórcio de pesquisadores brasileiros (Bertalan *et al.*, 2009), mostrou a existência de um cromossomo circular de 3.944.163 pares de bases (pb), conteúdo de C+G de 66,19% e dois plasmídeos, com 16.610 pb e 38.818 pb, respectivamente. Foram anotadas 3.938 sequências codificantes, sendo 2.861 com provável função conhecida e 1.077 que codificam proteínas hipotéticas. As sequências confirmaram várias características relacionadas às características endofíticas da bactéria, como a capacidade de realizar a fixação biológica de nitrogênio, promoção do crescimento vegetal, metabolismo de carboidratos, sistemas de transporte, síntese de auxinas e de bacteriocinas. O maior plasmídeo (pGD01) apresenta 53 prováveis regiões codificantes, a maioria (70%) codifica proteínas hipotéticas, 5% codificam proteínas relacionadas às funções plasmidiais e o restante corresponde, provavelmente, aos componentes do sistema de secreção tipo IV (T4SS). O plasmídeo menor (pGD02) apresenta 21 prováveis regiões codificantes, e cerca de 50% codificam a síntese de proteínas hipotéticas. Conjuntos de genes relacionados a biossíntese de polissacarídeos, flagelos, *quorum sensing*, modulação do crescimento vegetal, pela síntese de ácido indol-acético, e mecanismos que envolvem a tolerância a condições

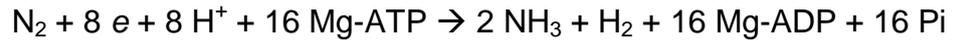
ácidas, foram identificados. Um componente acessório de pelo menos 851 genes distribuídos em ilhas genômicas foi identificado, o qual pode estar relacionado à adaptação do simbionte no interior do vegetal.

A fixação biológica de nitrogênio (FBN) é um processo complexo e que requer a expressão de um conjunto de genes denominados genes *nif* (*nitrogen fixation*). Os genes *nifHDK* codificam proteínas estruturais do complexo enzimático denominado nitrogenase (Baldani *et al.*, 2002).

*G. diazotrophicus* apresenta baixa diversidade genética. Estudos revelaram que a diversidade genética média por *locus* enzimático foi de 0,064, e que a estrutura genética da bactéria é clonal, com um clone predominante. Este clone está distribuído por várias espécies de hospedeiros, tais como cana-de-açúcar, batata doce, café e abacaxi (Caballero-Mellado e Martinez-Romero, 1994). A detecção de um genótipo predominante de *G. diazotrophicus* não está taxonomicamente relacionada aos tipos de plantas hospedeiras, e a predominância desse genótipo bacteriano em algumas dessas espécies, assim como a baixa diversidade genética entre as populações sugerem duas possibilidades: 1) somente alguns grupos geneticamente relacionados nessa espécie ou seu ancestral comum adquiriram a aptidão de colonizar plantas, por si mesmos ou com suporte de vetores como insetos e fungos; ou 2) *G. diazotrophicus* está associada a algum grupo vegetal particular, mas alguns genótipos selecionados adquiriram a habilidade de estender sua distribuição para vegetais de outros grupos taxonômicos (Pedraza, 2008).

### 1.1.2 - Caracterização metabólica

A maquinaria utilizada por *G. diazotrophicus* para a fixação de nitrogênio atmosférico é a mesma encontrada em outros micro-organismos e está baseada na presença da enzima nitrogenase, uma metaloproteinase. A redução do substrato ( $N_2$ ) pela enzima envolve três etapas de transferência de elétrons: 1) redução da Fe-proteína, ou dinitrogenase redutase, por carreadores de elétrons, 2) transferência de um elétron a partir da Fe-proteína para a MoFe-proteína (dinitrogenase, com centro molibdato-férrico) em reação dependente de Mg-ATP, e 3) transferência do elétron para o substrato ligado ao sítio ativo da MoFe-proteína (Baldani *et al.*, 2002). A estequiometria da reação é descrita, conforme proposto por Simpson e Burris (1984) da seguinte forma:



Além de catalisar a redução de  $\text{N}_2$  à amônia, a enzima nitrogenase reduz prótons a hidrogênio e pequenas moléculas insaturadas como acetileno, azida e cianeto. A reação de redução de acetileno a etileno é utilizada para a medida indireta da fixação de nitrogênio (Burris *et al.*, 1972), sendo considerada uma técnica rápida, econômica e acurada (Baldani *et al.*, 2002), e que foi empregada em diversos trabalhos sobre o processo de fixação de nitrogênio em *G. diazotrophicus* (Cavalcane e Döbereiner; Stephan *et al.*, 1991; Flores-Encarnación *et al.*, 1999).

A nitrogenase é sensível ao oxigênio, mas Stephan *et al.* (1991) verificaram que em *G. diazotrophicus* a atividade da enzima é mais tolerante ao  $\text{O}_2$  que em outros diazotróficos. Os autores também verificaram elevada atividade da enzima em meios com pH ácido (< 3,0), em concordância com os dados obtidos por Cavalcante e Döbereiner (1988), e destacaram que a capacidade de fixar nitrogênio nestas condições consistia uma característica única, e poderia indicar a existência de um mecanismo efetivo para proteção do complexo da nitrogenase. Neste trabalho, demonstrou-se também a relativa tolerância da nitrogenase ao  $\text{NH}_4^+$  e a vários aminoácidos. Em cultivos em frascos agitados, em meios com concentrações de crescentes de sulfato de amônio, as mais altas atividades da enzima foram verificadas com 0,8 mM, enquanto concentrações acima de 5 mM permitiu o crescimento mais rápido da bactéria, mas inibiu a expressão da enzima nitrogenase.

Cavalcante e Döbereiner (1988) constataram que tanto o crescimento dependente de  $\text{N}_2$  quanto a atividade de nitrogenase de *G. diazotrophicus* ocorreram na presença de 10 a 300 g/L de sacarose, com ótimo entre 10 e 15%. Quando glicose foi o substrato, a concentração ótima ficou na faixa de 50 a 100 g/L. Os ensaios foram feitos em frascos de 10 mL contendo 5 mL de meio semi-sólido e o crescimento bacteriano foi estimado apenas visualmente, não quantificado analiticamente. Gillis *et al.* (1989) atestaram o crescimento da bactéria na presença de 300 g/L de glicose, característica que a diferenciou de outras bactérias acéticas avaliadas no trabalho.

Stephan *et al.* (1991) estudaram várias características fisiológicas da bactéria em ensaios realizados em frascos agitados e em meio contendo glicose (LGIM), mas sem fonte de nitrogênio, para mimetizar condições de FBN. O perfil cinético obtido mostrou forte metabolismo aeróbico nas primeiras 13 horas de cultivo, com elevadas velocidades de consumo de açúcar, com formação de ácido glicônico, e

concomitante redução do pH do meio, a partir do momento em que grande parcela de glicose já havia sido consumida. Neste período houve exaustão dos íons amônio no meio e aumento expressivo da atividade de nitrogenase, indicando que a obtenção de nitrogênio passou a ser feita pela FBN. O crescimento foi lento no primeiro intervalo, mas foi intensificado durante a formação de ácido e atingiu densidade ótica máxima com 24 h. Os autores cogitaram que a possível realização da reação de oxidação da glicose no espaço periplasmático, a exemplo de outras bactérias Gram-negativas, poderia constituir o mecanismo de proteção da nitrogenase, tanto da condição ácida do meio quanto do efeito deletério do oxigênio.

As vias de metabolismo de glicose foram estudadas por Attwood *et al.* (1991), que concluíram que a oxidação do carboidrato, após sua fosforilação, ocorreria exclusivamente pela via das Hexose Monofosfato (HMP), ou via das Pentoses Fosfato, estando ausentes as vias Embden-Meyerhof e Entner-Doudoroff. A rota principal, no entanto, seria mediada por uma enzima glicose desidrogenase dependente do cofator PQQ (pirrolo-quinolino-quinona). Além desta, a bactéria contaria também com uma glicose desidrogenase dependente de NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo), cuja atividade foi muito inferior à da primeira. Foi encontrada também atividade de hexoquinase, indicando que a rota fosforilativa também estava presente.

O trabalho de Galar e Boiardi (1995) confirmou que a oxidação de glicose a ácido glicônico foi majoritariamente feita por uma enzima PQQ-GDH ligada à membrana. Os autores verificaram, também, que a atividade da enzima foi muito superior em células cultivadas em condição de fixação de nitrogênio que em células cultivadas com excesso de sulfato de amônio, o que os levou a propor que PQQ-GDH desempenha um papel importante na geração extra de energia para o processo FBN, que é altamente dependente de ATP.

A caracterização metabólica de *G. diazotrophicus* foi mais extensivamente explorada por Alvarez e Martinez-Drets (1995), que avaliaram a expressão de diferentes enzimas em extratos livres de células, suspensões celulares e sobrenadantes de cultivos da bactéria em meio com diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Os dados sugeriram que a principal via ativada no catabolismo de glicose fosforilada é, de fato, a HMP, estando adicionalmente presente a enzima chave da via gliconeogênica, frutose 1,6 difosfatase, e outras enzimas relacionadas, o que permitiu o crescimento da bactéria em glicerol e outros substratos de dois e três

carbonos. Foi também confirmado que a oxidação direta de glicose é feita por PQQ-GDH ligada à membrana e por uma NAD-GDH solúvel ligada à cadeia respiratória. Gliconato pode ser oxidado a 6-fosfogliconato, por gliconoquinase, e entrar diretamente na via HMP, ou ainda ser oxidado a ácido 2-cetoglicônico ou 5-cetoglicônico por uma gliconato desidrogenase dependente de NAD. O passo final de oxidação é a formação de ácido 2,5-dicetoglicônico, que é mediada por 2-cetoglicônico desidrogenase. Constatou-se também que a bactéria possui o ciclo de Krebs completo, o que explicaria sua habilidade de oxidar completamente o etanol. Os autores avaliaram, ainda, as velocidades de respiração da bactéria cultivada em glicose e sacarose, verificando-se altos níveis de consumo de oxigênio com ambos os substratos, mas a dependência de glicose pelo  $O_2$  foi superior. Diante destes resultados, reinteraram a hipótese feita por Stephan *et al.* (1991) de que a oxidação direta de glicose a gliconato, com alto consumo de oxigênio, desempenhava um papel fundamental na proteção da nitrogenase.

Luna *et al.* (2006) realizaram uma série de ensaios de fermentação em sistemas contínuo e descontínuo para avaliar a influencia de diferentes condições de cultivo sobre a regulação da expressão das vias fosforilativa e oxidativa (periplasmática e intracelular), no metabolismo de glicose por *G. diazotrophicus*. A atividade de hexoquinase foi muito baixa, tanto sob limitação quanto com excesso de carbono ou FBN, indicando que a via fosforilativa, embora presente, seria de menor importância na bactéria. Em contraste, PQQ-GDH estava presente em todas as culturas, independentemente da fonte de carbono (glicose ou gliconato) e de nitrogênio ( $N_2$  ou  $NH_3$ ), sugerindo que a enzima é sintetizada constitutivamente. No entanto, o conteúdo celular da enzima foi duas vezes maior em cultivos feitos em condições de fixação de nitrogênio do que naqueles realizados com meios suplementados com sulfato de amônio. Com excesso de carbono (20-50 g/L de glicose), a síntese da enzima aumentou com a concentração de glicose no meio. NAD-GDH citoplasmática também parece ser constitutiva, mas sua síntese foi dependente da condição de cultivo. Em sistema descontínuo, em que há excesso de carbono desde o início, foi verificada baixa atividade da enzima. Em sistema contínuo, porém, a enzima foi sintetizada em todas as condições testadas, embora a atividade enzimática tenha sido afetada pela concentração de glicose no meio: quanto maior a concentração do carboidrato, maior a atividade da enzima. Em resumo, os autores concluíram que a oxidação periplasmática de glicose, via PQQ-

GDH, constitui a principal rota metabólica para a degradação de glicose nesta bactéria, particularmente sob FBN e/ou limitação de carbono. No entanto, com excesso de glicose, NAD-GDH citoplasmática é simultaneamente expressa e participa da oxidação do açúcar. A elevada atividade de enzimas da via HMP também comprovou que após a conversão da glicose a gliconato, o fluxo metabólico ocorre principalmente por esta rota.

Na Figura 2 é apresentado, de forma esquemática, um resumo das rotas de metabolismo de glicose por *G. diazotrophicus*, tomando como base os dados publicados nos trabalhos de Attwood *et al.* (1991), Alvarez e Martínez-Drets (1995) e Luna *et al.* (2006).

Embora o habitat natural de *G. diazotrophicus* sejam plantas ricas em sacarose, a bactéria não é capaz de transportar ou utilizar este carboidrato na respiração (Alvarez e Martínez-Drets, 1995). Na presença do dissacarídeo, a enzima levanasucrase (LsdA), que é expressa constitutivamente, é secretada para o meio externo e promove sua hidrólise em frutose e glicose (Hernández *et al.*, 1995; Arrieta *et al.*, 1996). Estudos de imunomarcagem e microscopia eletrônica de transmissão revelaram que LsdA se acumula no periplasma antes da secreção para o meio externo (Hernández *et al.*, 1999). A enzima é constituída por um único polipeptídio de 58 kDa e a máxima atividade ocorre em pH 5,0 (Hernández *et al.*, 1995).

Em amplo estudo sobre a proteômica de *G. diazotrophicus* cultivada em meio LGI (0,2 g/L de  $K_2HPO_4$ ; 0,6 g/L de  $KH_2PO_4$ ; 0,2 g/L de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ; 0,02 g/L de  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ; 0,002 g/L de  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ ; 0,01 g/L de  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ; 5 mL/L de azul de bromotimol 0,5% em KOH 0,2M; 10 g/L de glicose) contendo 1,32 g/L de sulfato de amônio e pH 5,5, em biorreator de bancada, Lery *et al.* (2008) identificaram 583 proteínas, as quais foram classificadas em categorias funcionais e utilizadas para descrever vias metabólicas potenciais para nucleotídeos, aminoácidos, carboidratos, lipídios, cofatores e produção de energia. Todas as enzimas envolvidas na oxidação direta de glicose e na via das pentoses fosfato foram identificadas no trabalho, corroborando os trabalhos dos autores citados anteriormente. Foram identificadas 20 proteínas para metabolismo de purinas e 17 para pirimidinas. Outras duas para biossíntese de cofatores, duas para metabolismo de lipídeos, uma para a biossíntese de metabólitos secundários, uma para o processamento da informação genética e outra para processamento de informação

ambiental. O metabolismo de aminoácidos foi representado por 12 vias, incluindo a de metabolismo de glutamato, do ciclo da ureia e de aminogrupos.

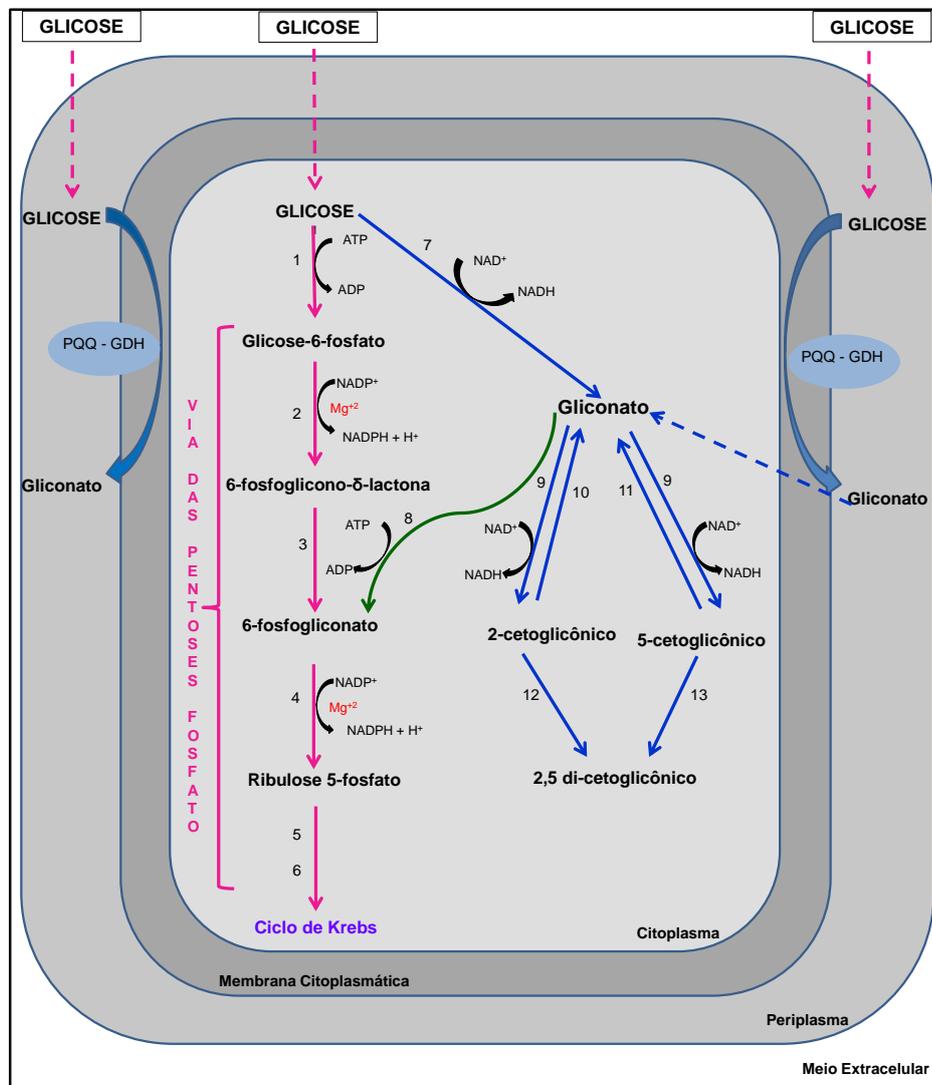


Figura 2 – Esquema simplificado do metabolismo de glicose em *G. diazotrophicus*. Enzimas: 1) glicoquinase, 2) glicose 6-fosfato desidrogenase, 3) lactonase, 4) 6-fosfogliconato desidrogenase, 5) transcetolase, 6) transaldolase, 7) NAD- glicose desidrogenase, 8) gliconoquinase, 9) NAD-gliconato desidrogenase, 10) 2-cetogliconato redutase, 11) 5-cetogliconato redutase, 12) 2-cetogliconato desidrogenase, 13) 5-cetogliconato desidrogenase, PQQ-GDH: Pirrolo-quinolino-quinona ligada a glicose desidrogenase. Adaptado de Alvarez e Martinez-Drets, 1995; Luna *et al.*, 2000.

Em células cultivadas com excesso de  $\text{NH}_4^+$ , a assimilação de amônio ocorre principalmente com a participação da enzima glutamato desidrogenase, mas sob

FBN é utilizado o sistema glutamina sintetase e glutamato sintetase (Alvarez e Martínez-Drets, 1995).

A oxidação de etanol a ácido acético é catalisada por dois complexos enzimáticos ligados à membrana: álcool desidrogenase (ADH) e aldeído desidrogenase (ALDH). Essas enzimas são usualmente conhecidas como quinhemoproteínas, pois possuem PQQ e citocromos c como grupos prostéticos. *G. diazotrophicus* possui um complexo enzimático, expresso constitutivamente, localizado no periplasma, responsável por oxidar o etanol a ácido acético. Este sistema é mais utilizado durante o crescimento dependente de N<sub>2</sub>. A enzima PQQ-ADH oxida preferencialmente alcoóis de cadeia aberta. Aldeídos também constituem substratos metabolizáveis (Gomez-Manzo *et al.*, 2008).

### 1.1.3 - A associação com plantas e os benefícios da atividade diazotrófica

*G. diazotrophicus* é considerada uma bactéria endofítica de várias espécies vegetais, pois possui baixa sobrevivência no solo (Baldani *et al.*, 1997). Os micro-organismos endofíticos são definidos como aqueles que colonizam o interior de tecidos de plantas, sem causar nenhum dano aparente ao hospedeiro (Azevedo *et al.*, 2002; Baldani e Baldani, 2005). Em ambientes naturais, a primeira etapa para a colonização consiste no contato físico entre a bactéria e a planta hospedeira, após movimento dos micro-organismos em direção às raízes, atraídos por exudatos radiculares, ou pelo transporte passivo na solução do solo (Benizri *et al.*, 2001). Após adesão à superfície vegetal, a bactéria penetra nos tecidos e se multiplica no seu interior. O processo de entrada é geralmente passivo, ocorrendo através de aberturas naturais ou por aquelas provocadas por injúrias (Reis e Olivares, 2006). Apesar de a raiz ser geralmente a porta de entrada, o processo também pode ocorrer em outras partes da planta, com caules, flores e frutos (Magnani, 2005). Outros autores sustentam a possibilidade de a introdução destas bactérias na planta ser feita por meio de esporos de fungos micorrízicos arbusculares presentes no solo (Paula *et al.*, 1993) ou ainda no momento de sucção da seiva do floema por cochonilhas, que contém a bactéria na linfa, e que vivem em contato com plantas de cana-de-açúcar (Asbolt e Inkerman, 1990). James *et al.* (1994; 2001) demonstraram que *G. diazotrophicus* foi capaz de colonizar os espaços intercelulares de raízes e colmos, vasos do xilema e a região de junção das raízes secundárias de cana-de-açúcar. Utilizando técnicas de microscopia eletrônica, Dong *et al.* (1994; 1997)

evidenciaram a colonização do apoplasto de colmos da planta. Segundo Caballero-Mellado (1994), a dispersão da bactéria pode ser feita por cochonilhas que vivem na superfície do vegetal. Baldani *et al.* (1997) descrevem que, além de ser carreadas por insetos, a disseminação de bactérias endofíticas pode ser feita através das sementes, propagação vegetativa e partes mortas da planta.

Após seu isolamento inicial no Brasil (Cavalcante e Döbereiner, 1988), *G. diazotrophicus* foi também isolada de cana-de-açúcar em Cuba (Dong *et al.*, 1994, 1995), México (Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993), Índia (Muthukumarasamy *et al.*, 1999) e Austrália (Li e MacRae, 1991). Foi também isolada de outras espécies de interesse agrícola, como capim elefante (Döbereiner *et al.*, 1993), café (Jiménez-Salgado *et al.*, 1997), abacaxi (Tapia-Hernández *et al.*, 1990), arroz (Caballero-Mellado, 2005; Alquéres *et al.*, 2013), batata-doce e banana (Muthukumarasamy *et al.*, 2002) e tomate (Luna *et al.*, 2011). Experimentos de inoculação de trigo e sorgo com a bactéria mostraram que esta é capaz de colonizar eficientemente essas espécies vegetais (Luna *et al.*, 2010).

Ao contrário do tipo de simbiose estabelecido entre micro-organismos diazotróficos em leguminosas, na associação de *G. diazotrophicus* e gramíneas não é verificada a formação de nódulos nas raízes da planta (Reis *et al.*, 1999; Boddey *et al.*, 2003). Segundo Baldani *et al.* (1997), como a bactéria está limitada exclusivamente ao interior da planta, e tem baixa sobrevivência no solo, a associação pode ser chamada de “endofítica obrigatória”. O processo de colonização e o tamanho da população bacteriana no interior do vegetal são influenciados por fatores como a variedade do hospedeiro e seu estágio nutricional (Reis Jr. *et al.*, 2000). Populações relativamente elevadas da bactéria são encontradas nos tecidos do colmo, sugerindo que estes são os maiores sítios de fixação de nitrogênio (James *et al.*, 1994).

A associação entre bactérias endofíticas e plantas pode trazer inúmeros benefícios ao vegetal, culminando com um processo geral de promoção de seu crescimento (Azevedo *et al.*, 2002; Baldani *et al.*, 2002), o qual, de acordo com Olivares (2007), pode ser subdividido em três tipos de atividades principais: a bioestimulação, o biocontrole e a biofertilização. A bioestimulação está principalmente relacionada à produção de fitormônios como auxinas, citocininas (ácido indolacético), giberelinas e etileno, e já foram relatadas em espécies de *Gluconacetobacter*, *Azospirillum*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pantoea* e *Pseudomonas*

(Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993; Bastian *et al.*, 1998; Strzelczyk *et al.*, 1994; Baldani e Baldani, 2005, Saravanan *et al.*, 2008). Estes compostos estimulam a produção de metabólitos que são utilizados pela planta para seu próprio crescimento, além de acarretar modificações na morfologia das raízes que melhoram a absorção de água e nutrientes (Oliveira *et al.*, 2003). O controle biológico de pragas e doenças de plantas consiste em utilizar micro-organismos como antagonistas aos fitopatógenos, já que ambos compartilham nichos ecológicos semelhantes. O controle pode se dar por competição por nutrientes, pela produção de substâncias nocivas ou pela indução de resistência a doenças (Bettiol, 1997; Azevedo *et al.*, 2002; Mariano *et al.*, 2004). Dentre os compostos produzidos por espécies bacterianas endofíticas contra fitopatógenos estão sideróforos, antibióticos, compostos antifúngicos e enzimas (Oliveira *et al.*, 2003). A biofertilização compreende os efeitos nutricionais positivos advindos da interação da bactéria com a planta, e inclui a fixação de nitrogênio (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Cojho *et al.*, 1993) e a solubilização de compostos insolúveis presentes no solo (Olivares, 2007; Araújo e Santos Jr, 2009; Intorne *et al.*, 2009).

O ambiente no interior das plantas é propício para o processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN), já que tem baixa pressão parcial de oxigênio e concentrações relativamente elevadas de açúcar (James e Olivares, 1998; James, 2000). Desta forma, bactérias diazotróficas endofíticas podem liberar o nitrogênio fixado diretamente para a planta hospedeira (Döbereiner, 1993), contribuindo com parte de seus requerimentos nitrogenados (Boddey *et al.*, 1995). Esta habilidade é particularmente observada em *G. diazotrophicus* (Cojho *et al.*, 1993). Ao crescer no interior da planta, a bactéria tem, por um lado, menor competição pelos nutrientes, em comparação com a rizosfera, e, por outro, a disponibilidade de grande quantidade de fontes de carbono para a realização da fixação de nitrogênio, mesmo que os cultivos tenham sido fertilizados com adubos nitrogenados. O nitrogênio, produto da fixação biológica, é excretado diretamente no interior dos tecidos vegetais, que o utiliza para prover, pelo menos parcialmente, as necessidades para a síntese de macromoléculas essenciais (Muñoz-Rojas e Caballero-Mellado, 2001).

Segundo Alquères *et al.* (2010), espécies reativas de oxigênio (ROS) podem intensificar o problema de toxicidade do oxigênio para diazotróficos. Os autores observaram que os níveis de ROS são diminuídos nas células durante o processo devido ao aumento da regulação de níveis de transcrição de seis genes ROS-

desintoxicantes. *G. diazotrophicus* altera seu metabolismo redox durante FBN pelo aumento dos níveis de transcritos antioxidantes, resultando em uma menor geração de ROS.

As plantas hospedeiras de *G. diazotrophicus* apresentam elevado nível de asparagina, aminoácido que promove o crescimento microbiano e inibe a atividade da nitrogenase. A regulação das concentrações intracelulares deste aminoácido é essencial para o crescimento e fixação biológica de nitrogênio (FBN) neste diazotrófico. Os níveis intracelulares de asparagina regulam a expressão do gene *nifD* da nitrogenase (GDI0437), sugerindo que a presença de uma rota alternativa para a produção do aminoácido poderia conferir a *G. diazotrophicus* um controle mais rígido sobre o crescimento celular e sobre a FBN, e pode ser de importância na regulação da interação entre plantas e bactérias endofíticas (Alquéres *et al.*, 2012).

Além da FBN, os efeitos nutricionais positivos advindos da interação bactéria-planta são decorrentes da solubilização de compostos insolúveis presentes no solo, como fosfatos (Rodriguez *et al.*, 2004; Intorne *et al.*, 2009) e zinco (Intorne *et al.*, 2009), em decorrência da ação dos ácidos orgânicos produzidos pela bactéria (Araújo e Santos Jr, 2009).

#### **1.1.4 - Potencial agrobiotecnológico**

O crescimento vegetal é diretamente influenciado pela disponibilidade de nitrogênio no ambiente, macronutriente que faz parte da composição química de aminoácidos e ácidos nucléicos (Rees *et al.*, 2005). Entretanto, na natureza este elemento encontra-se em uma forma quimicamente estável ( $N_2$ ) e sua assimilação pela maioria dos seres vivos requer sua transformação para uma forma combinada e de fácil absorção (Marin *et al.*, 1999). A inviabilidade de fixação de nitrogênio atmosférico é, portanto, um dos fatores limitantes nos sistemas de produção agrícola. Além disso, a utilização dos processos de fertilização artificial do solo, para corrigir deficiências naturais ou repor nutrientes removidos nas colheitas, apresenta desvantagens como o alto custo e os problemas ambientais relacionados ao processo (Muthukumarasamy *et al.*, 2002; Nunes *et al.*, 2003). Neste contexto, a fixação biológica de  $N_2$  representa uma alternativa mais econômica e mais eficiente para substituição parcial dos insumos agrícolas que visam o fornecimento de compostos nitrogenados, além de não agredir o meio ambiente, como os fertilizantes

químicos (Muthukumarasamy *et al.*, 2002; Reinhold-Hurek e Hurek, 2011; Carvalho *et al.*, 2014).

O potencial agrobiotecnológico de *G. diazotrophicus* baseia-se nas características de seu habitat endófito e na habilidade de fixar nitrogênio atmosférico na presença de nitrato, bem como sua capacidade de crescer *in vitro* em condições similares às encontradas em cana-de-açúcar (Cavalcante e Döbereiner, 1988; Boddey *et al.*, 1991). O potencial da bactéria aumentou quando se demonstrou sua efetiva capacidade de excretar, para a planta, 50% do nitrogênio fixado (Cojho *et al.*, 1993), assim como produzir diversas auxinas, especialmente ácido indol acético (Bastian *et al.*, 1998; Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993) e citocininas (Jiménez-Salgado *et al.*, 1994), as quais podem exercer efeitos diretos sobre a fisiologia da planta e influenciar positivamente o seu crescimento.

Uma forma de introduzir *G. diazotrophicus* em plantas consiste em inocular uma suspensão celular durante o processo de micropropagação vegetal, desde que este seja naturalmente colonizado pela bactéria (Oliveira *et al.*, 2009). Este método pode incrementar a população de *G. diazotrophicus* na planta, e, assim, favorecer os potenciais benefícios do metabolismo bacteriano para o crescimento do hospedeiro. Desta forma, suspensões concentradas de biomassa bacteriana podem ser produzidas e formuladas na forma de um inoculante, o que é previsto na legislação brasileira. De acordo com a Lei nº 6894, de 16 de novembro de 1980, regulamentada pelo Decreto nº 4954, de janeiro de 2004, bioinoculante é definido como o produto que contém micro-organismos com ação favorável ao crescimento de plantas (Bucher e Reis, 2008). Portanto, o termo biofertilizante é utilizado de forma generalizada para os produtos formulados com micro-organismos capazes de influenciar, de forma positiva o desenvolvimento das plantas, incluindo, desta forma, os inoculantes produzidos com bactérias diazotróficas (Reis, 2006).

Em experimentos em laboratório com plantas de cana-de-açúcar micropropagadas inoculadas com células de *G. diazotrophicus* PAL5 e de um mutante defeutivo para a síntese da enzima nitrogenase (*nif*), Sevilla *et al.* (2001) observaram que, em meio contendo nitrogênio, houve crescimento vegetal em ambos com ambas estirpes. Na ausência deste elemento, no entanto, as plântulas inoculadas com a cepa silvestre cresceram significativamente mais que aquelas inoculadas com a cepa *nif* e que o controle (não inoculada), demonstrando a ocorrência de FBN. Outros estudos mostraram efeitos positivos da inoculação de

cana-de-açúcar com *G. diazotrophicus* PAL5. Olivares *et al.* (2002) mostraram um aumento de 28% do peso fresco da parte aérea, além do aumento do número de sítios de mitose nas raízes laterais e do sistema radicular global. O aumento do peso fresco da parte aérea de plantas cana-de-açúcar micropropagadas com a bactéria é, no entanto, dependente da variedade da planta, da cepa inoculada e do tempo decorrido após a inoculação (Muñoz-Rojas e Caballero-Mellado, 2003). Outro efeito da inoculação de *G. diazotrophicus* pode ser a produção de fitormônios, que atuam na formação inicial de raízes. Diferentes cepas da bactéria isoladas de diversos genótipos de cana-de-açúcar demonstraram a capacidade de produção de ácido indol acético (AIA) e giberelinas *in vitro* (Saravanan *et al.*, 2008), o que, adicionalmente à solubilização de nutrientes minerais como zinco e fósforo, decorrente da produção do ácido glicônico (Saravanan *et al.*, 2007), pode contribuir para a promoção do crescimento vegetal de forma a complementar a FBN.

Em 2008, a Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuária – EMBRAPA, mais especificamente a Embrapa Agrobiologia, anunciou o lançamento do primeiro inoculante microbiano para cana-de-açúcar desenvolvido no Brasil. O produto é composto por cinco estirpes: *Herbaspirillum seropedicae* (BR1335), *Herbaspirillum rubrisubalbicans* (BR11504), *Gluconacetobacter diazotrophicus* (BR11281T), *Burkholderia tropica* (BR11366T) e *Azospirillum amazonense* (BR11145) (Reis *et al.*, 2009; da Silva *et al.*, 2012). A máxima eficiência dos bioinoculantes depende da estirpe utilizada, que deve ser competitiva, do número de células aplicado (Deaker *et al.*, 2004) e de sua composição (Bucher e Reis, 2008). Da Silva *et al.* (2012) demonstram que o uso de transportadores na formulação de inoculantes, tais como polímeros de carboximetilcelulose e amido de milho, aumentam o tempo de sobrevivência das estirpes promotoras do crescimento.

Diante das previsões de crescimento populacional mundial, que deve atingir nove bilhões de habitantes em 2050, é preciso criar métodos avançados e eficientes para aumentar a produção de alimentos e energia renovável sem esgotar os recursos naturais (Ash *et al.*, 2010). Neste cenário, o uso de inoculantes bacterianos pode se tornar uma alternativa atraente para o setor agrícola. No Brasil, o crescimento do setor deve chegar a 40% até o ano de 2019 (FAO, 2010). Especificamente em relação à cana-de-açúcar, que pode ser colonizada por *G. diazotrophicus*, o país destaca-se como o maior produtor mundial. Apesar de ser cultivada em mais de 100 países, Brasil e a Índia respondem, em conjunto, por

pouco mais da metade da cana produzida mundialmente (NOVACANA, 2015). As estimativas para a produção brasileira de açúcar indicaram uma taxa média anual de crescimento de 3,53% no período 2009/2010 a 2019/2020, o que deve acarretar numa produção de 46,70 milhões de toneladas do produto em 2019/2020. As projeções referentes à produção, consumo e exportação de etanol refletem também grande dinamismo, especialmente o crescimento do consumo interno. A produção projetada para 2019/2020 deste biocombustível é de 62,91 bilhões de litros (MAPA, 2010). Além da produção de açúcar e etanol, cana-de-açúcar gera bagaço para cogeração de energia. Pelo seu alto valor agregado, movimenta indústrias cada vez mais eficientes no uso de energia e tecnologias, além de gerar subprodutos que podem ser utilizados na fertilização de áreas agrícolas (Reis *et al.*, 2009).

#### **1.1.5 - Outras características de interesse industrial**

Além da capacidade de fixar nitrogênio atmosférico, outras características metabólicas de *G. diazotrophicus* ajudam a aumentar seu potencial biotecnológico. Os ácidos provenientes de seu metabolismo, como glicônico e acético, além de aplicações industriais comprovadas (Ramachandran *et al.*, 2006; Segun e Karabiyikli, 2011), podem solubilizar compostos insolúveis de fósforo e zinco no solo, contribuindo para a nutrição vegetal (Muthukumarasamy *et al.*, 2002; Saravanan *et al.*, 2007; Intorne *et al.*, 2009). A bactéria é capaz, ainda, de produzir outros metabólitos de interesse, como enzimas, frutoligossacarídeos (Toledo *et al.*, 2004), bacteriocinas (Blanco *et al.*, 2005) e compostos antifúngicos (Mehnaz e Lazarovits, 2006). Alguns destes aspectos são discutidos mais detalhadamente a seguir.

##### **1.1.5.1 - Produção de ácido glicônico e ceto-derivados**

Os ácidos orgânicos representam a terceira maior categoria do mercado global de produtos obtidos por fermentação, estando atrás apenas dos antibióticos e aminoácidos. O ácido cítrico domina o mercado, mas a produção de ácido glicônico, embora comparativamente menor, destaca-se pelas suas inúmeras aplicações (Ramachandran *et al.*, 2006). Em função de suas características fisiológicas e químicas, o próprio ácido glicônico, a forma  $\delta$ -gluconolactona e seus sais têm encontrado utilizações consideravelmente versáteis na indústria (Ramachandran *et*

*al.*, 2006; Segun e Karabiyikli, 2011). Sua toxicidade é extremamente baixa, assim como a corrosividade, propriedades que são também de alto interesse da indústria (Purane *et al.*, 2011).

O ácido glicônico, seus derivados e seus sais são amplamente utilizados na indústria farmacêutica, de alimentos, ração animal, detergente, têxtil, couro, fotográfico e indústrias de concreto (Singh *et al.*, 2003; Anastassiadis *et al.*, 2003; Ramachandran *et al.*, 2006). Na indústria farmacêutica, o ácido 2-cetoglicônico é empregado como precursor no processo de produção de ácido ascórbico (Demain e Adrio, 2008), enquanto ácido glicônico é usado como agente antimicrobiano. Gliconato de cálcio, que apresenta excelente propriedade para quelar cálcio e outros íons metálicos di e trivalentes, é utilizado como fonte de cálcio para tratamento de deficiência de cálcio e na nutrição animal, enquanto gliconato de ferro e fosfogliconato de ferro são utilizados em terapia de ferro, e gliconato de zinco como ingrediente para o tratamento de resfriado comum, feridas e várias doenças causadas por deficiências de zinco (Ramachandran *et al.*, 2006). O ácido 5-cetoglicônico é usado como precursor para produção de ácido tartárico (Matzerath *et al.*, 1995), que apresenta aplicações como antioxidante na indústria de alimentos, reagente quiral em síntese orgânica, agente redutor na indústria têxtil, além de ser uma alternativa para o ácido cítrico como acidulante em aditivos alimentares (Herrmann *et al.*, 2004). O ácido glicônico também é utilizado em processos de síntese orgânica e de fabricação de diversos produtos biodegradáveis, atendendo a grande demanda de uso de recursos renováveis em benefício do meio ambiente (Roukas, 2005; Ramachandran *et al.*, 2006; Singh e Kumar, 2007; Purane *et al.*, 2012). Além disso, pode ser utilizado na constituição de produtos de limpeza para a indústria de laticínios, bem como para a extração de traços de cálcio, cobre e ferro. O ácido glicônico pode ter, ainda, aplicações na solubilização de fosfato (Rodriguez e Fraga, 1999; Rodriguez *et al.*, 2004) e como aditivo para cimento na indústria da construção, uma vez que aumenta a resistência e a estabilidade de cimento sob condições climáticas extremas, como frio e muita umidade (Singh e Kumar, 2007).

Nieto-Peñalver (2014) evidenciaram que ácido glicônico é também responsável pela atividade antimicrobiana de *G. diazotrophicus* PAL5, tendo sido demonstrado espectro antagônico contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Outros autores indicam que a bactéria também pode ser empregada em processos de fitorremediação e que este potencial está relacionado à produção de ácido glicônico

devido à sua propriedade de melhorar a biodisponibilidade dos metais pesados, solubilizar íons tóxicos, aumentar a mobilidade dos íons para a absorção pelas plantas, e, conseqüentemente, promover o aumento da biomassa do vegetal (Saravanan *et al.*, 2007; Rajkumar *et al.*, 2012).

A demanda por ácido glicônico é de cerca de 50.000-60.000 toneladas por ano e está crescendo ano após ano (Ramachandran *et al.*, 2006). A produção pode ser realizada por um processo de oxidação simples utilizando diferentes abordagens, incluindo catálise química, eletroquímica e enzimática. Porém, esses processos apresentam limitações importantes, como o alto custo e o baixo rendimento (Singh e Kumar, 2007; Purane *et al.*, 2012). Assim, a produção comercial do ácido é tradicionalmente feita por via microbiana, principalmente por fermentação submersa, usando glicose como substrato. O processo fermentativo tem se mostrado viável e mais eficiente para a produção industrial (Ramachandran *et al.*, 2006; Purane *et al.*, 2012).

O processo biotecnológico mais estudado e mais amplamente utilizado envolve o fungo *Aspergillus niger* (Ramachandran *et al.*, 2006; Singh *et al.*; 2005; Singh e Singh, 2006; Ikeda *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2008; Purane *et al.*, 2011, 2012), mas a bactéria *Gluconobacter oxydans* apresenta grande potencial para uso industrial (Gupta *et al.*, 2001; Deppenmeier *et al.*, 2002; Silberbach *et al.*, 2003; Elfari *et al.*, 2005; Melfort *et al.*, 2006; Krajewski *et al.*, 2010). Outra espécie bacteriana, *Zymomonas mobilis*, tem demonstrado grande potencial para produção do composto (Silveira *et al.*, 1999; Erzinger *et al.*, 2003; Malvessi *et al.*, 2010).

A capacidade de *G. diazotrophicus* para sintetizar ácido glicônico e seus derivados 2-cetoglicônico, 5-cetoglicônico e 2,5-cetoglicônico (Attwood *et al.*, 1991; Stephan *et al.*, 1991; Alvarez e Martinez-Drets, 1995) a tornam um potencial microrganismo para o processo. Em comparação com *G. oxydans*, que exige várias vitaminas e aminoácidos para crescimento ótimo e é inibida em pH abaixo de 3,5 (Attwood *et al.*, 1991), a bactéria é menos exigente em termos nutricionais e tolera condições extremamente ácidas de crescimento (Cavalcante e Döbereiner, 1988). Attwood *et al.* (1991) verificaram que a bactéria não foi inibida por concentrações de ácido glicônico da ordem de 140 g/L, em sistema descontínuo de fermentação, com produtividade volumétrica em produto de cerca de 8,0 g/L.h.

De acordo com Purane *et al.* (2011), o rendimento em ácido glicônico no processo industrial com *A. niger* é extremamente elevado (98%). No entanto, o

preço do produto no mercado é muito elevado (US\$1,20-8,50/kg), o que constitui uma desvantagem. Além disso, o microrganismo é inibido por altas concentrações do produto (Liu *et al.*, 2003).

#### 1.1.5.2 - Produção de frutanos

Além de catalisar a hidrólise de sacarose, a enzima levansucrase (LsdA), constitutivamente expressa em *G. diazotrophicus* (Alvarez e Martinez-Drets, 1995; Velazquez-Hernández *et al.*, 2011), catalisa outras três reações de transfrutossilacção da sacarose para os seguintes aceptores: 1) água, levando a hidrólise de sacarose; 2) sacarose, produzindo frutooligosacarídeos (FOS), pela transferência de um resíduo fructosil de um doador para a molécula aceptora; 3) frutanas, reação de polimerização, em que os resíduos fructosil estão unidos por ligações  $\beta$ -2,6; 4) glicose, formando sacarose, por reação de troca, em que o resíduo fructosil é transferido para uma molécula de glicose (Hernández *et al.*, 1995; Trujillo-Toledo *et al.*, 2004).

De acordo com Mussatto e Mancilha (2007), frutanos são todos os polímeros de frutose de origem microbiana compostos com ligações  $\beta$ -(2,6)-fructosyl-frutose ligada moléculas e cadeias laterais. Estes podem ser classificados de acordo com seu grau de polimerização em oligossacarídeos (FOS) ou polissacarídeos. FOS contém de 3 a 10 unidades de monossacarídeo, constituindo, portanto, moléculas de baixa massa molecular, e considerados digeríveis. Os polissacarídeos, chamados levanas, contêm mais de 11 unidades de monossacarídeo, sendo carboidratos de elevada massa molecular e classificados como não digestível.

Levana é um exopolissacarídeo produzido por fermentação em meio rico em sacarose, mas não em frutose, glicose ou mistura de ambas. Pesquisas sobre bactérias produtoras de levana vêm sendo estimuladas, uma vez que o polímero é uma fonte alternativa de frutose, além de apresentar características funcionais no organismo humano, como agente hipocolesterolêmico e anticarcinogênico (Ernandes e Garcia-Cruz, 2005). Pode ser empregada na indústria de alimentos, como fixador de cores e sabores, espessante e estabilizante (Maiorano *et al.*, 2008; Singh e Singh, 2010). Diversas outras funções deste polímero são citadas na literatura, como a participação na aderência e colonização de superfícies inertes (Danese *et al.*, 2000), formação de biofilme (Laue *et al.*, 2006), proteção contra fatores abióticos (Lerner *et al.*, 2009), resistência a temperaturas extremas e

condições osmóticas (Dunne, 2002) e proteção contra o estresse gerado por alta osmolaridade e dessecação (Velázquez-Hernández *et al.*, 2010).

Fruto-oligossacarídeos (FOS) são considerados ingredientes alimentares funcionais, uma vez que afetam processos fisiológicos e bioquímicos em seres humanos, e, além disso, promovem a saúde e reduzem o risco de muitas doenças por estimular o crescimento de bifidobactérias no trato intestinal (Yun, 1996; Mussatto e Mancilha, 2007). Apresentam alto poder adoçante, podendo ser usados como edulcorantes de baixa caloria e como fibras dietéticas. Os tipos de FOS comercializados consistem basicamente em 1-cestose, nistose e fructofuranosil nistose, nos quais uma das três unidades fructosil está ligada na posição  $\beta$ -2,1 à sacarose. A produção microbiana de FOS a partir da sacarose tem sido exclusivamente realizada por  $\beta$ -fructofuranosidases e frucosiltransferases fúngicas. Entretanto, LsdA de *G. diazotrophicus* é comercialmente atrativa para a produção de FOS a partir da sacarose, principalmente 1-cestose (Támbara *et al.*, 1999).

## 1.2 - Processo fermentativo com *Gluconacetobacter diazotrophicus*

Apesar do grande potencial biotecnológico de *G. diazotrophicus*, poucos trabalhos foram direcionados para os aspectos do cultivo visando uma aplicação industrial do processo fermentativo com a bactéria. Destacam-se os trabalhos de Nunes *et al.* (2010) e de Molinari e Boiardi (2013), voltados para a maximização da produção de células e de levana, respectivamente, em sistema descontínuo. No primeiro caso, foram estabelecidas condições de cultivo que permitiram obter concentração celular máxima de 6,0 g/L, o que representou a maior concentração de biomassa desta bactéria até então descrita na literatura. No trabalho de Molinari e Boiardi (2013) foram obtidas concentrações celulares da mesma ordem, mas as produtividades foram incomparavelmente mais baixas que aquelas verificadas no trabalho de Nunes *et al.* (2010).

Outros autores utilizaram processos fermentativos para estudar diferentes aspectos do crescimento, do metabolismo de carboidratos e dos mecanismos de fixação de nitrogênio por *G. diazotrophicus* (Galar e Boiardi, 1995; Reis e Döbereiner 1998; Flores-Encarnación *et al.*, 1999; Luna *et al.*, 2000; Luna *et al.*, 2006; Luna e Boiardi, 2008; Boniolo *et al.*, 2009), revelando aspectos relativos a diferentes parâmetros de processo que são importantes para as pesquisas de otimização do

sistema de cultivo com a bactéria. Variáveis de processo como a concentração de substrato, as fontes de carbono e nitrogênio, a transferência de oxigênio e o sistema de fermentação influenciam os resultados obtidos.

Galar e Boiardi (1995) avaliaram a produção de ácido glicônico pela bactéria em cultivo em frascos, simulando condições de fixação e não-fixação de nitrogênio e mostraram que 90% da glicose foi consumida nas primeiras 10 h, com queda brusca do pH (5,75 para 2,5), mas sem aumento significativo da concentração de biomassa. As velocidades de crescimento aumentaram somente quando cerca de 60% da glicose haviam sido convertidas em ácido glicônico. Os dados revelaram também que a atividade de PQQ-GDH foi cerca de três vezes maior nas células que cresceram em condições de fixação de nitrogênio. Em cultivos em meio LGI com 10 g/L de glicose e pH controlado em 6,0, Luna e Boiardi (2008) verificaram que a atividade de NAD-GDH foi mais de quatro vezes maior que a de PQQ-GDH.

A transferência de oxigênio exerce efeito decisivo sobre o metabolismo de carboidratos por *G. diazotrophicus* (Gillis *et al.*, 1989; Alvarez e Martínez-Dretz, 1995; Tejera *et al.*, 2004) e os resultados de ensaios em frascos agitados são influenciados pela baixa aeração do sistema. Em fermentação descontínua em biorreator de bancada com diferentes condições de aeração do meio e concentração inicial fixa de sacarose (100 g/L), Flores-Encarnación *et al.* (1999) verificaram que, em meios de cultivo sem fonte de nitrogênio inorgânico, não ocorreu crescimento de *G. diazotrophicus* PAL5. Quando o meio foi suplementado com  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , o emprego de valores crescentes de  $k_{\text{L}}a$  (coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio) exerceu um forte efeito positivo sobre o crescimento celular, sendo verificadas maiores velocidades de crescimento e maiores concentrações finais de biomassa. Os resultados relativos ao crescimento celular foram expressos em termos de densidade ótica, não sendo possível o cálculo dos rendimentos em célula neste trabalho. Outros autores verificaram altos níveis de consumo de oxigênio durante seu cultivo da bactéria em glicose ou gliconato, sob condições aeróbicas (Alvarez e Martínez-Dretz, 1995; Tejera *et al.*, 2004; Nunes *et al.*, 2010).

Embora possa crescer em meios com baixos valores de pH, tanto em sistema contínuo quanto em descontínuo (Burris *et al.*, 1994; Stephan *et al.*, 1991, Galar e Boiardi, 1995), Luna e Boiardi (2008) verificaram que esta variável influencia os rendimentos em biomassa por *G. diazotrophicus*, conforme ressaltado anteriormente. Em sistema contínuo, com glicose e  $\text{N}_2$ , os maiores rendimentos em

células foram observados em valores de pH entre 5 e 6,5, embora não tenham sido seriamente afetados em meios ácidos (2,5-4,5) ou moderadamente alcalinos (7,5). Acima deste valor, não ocorre o crescimento da bactéria. Os máximos rendimentos em biomassa coincidiram com a atividade ótima da enzima PQQ-GDH.

De acordo com os dados obtidos por Luna *et al.* (2000), o rendimento em biomassa é similar em meios com glicose ou gliconato, como fonte de carbono, ou quando a fonte de nitrogênio é FBN ou sulfato de amônio, em fermentação contínua. A atividade de PQQ-GDH é, da mesma forma, verificada em ambas as condições, mas é estimulada nas condições de alta demanda energética (fixação de N<sub>2</sub>) e/ou em limitação de carbono. Com excesso de carbono, a síntese aumenta com o aumento da concentração de glicose no meio. Em fermentação em sistema descontínuo, PQQ-GDH foi ativamente expressa nos estágios iniciais com maior atividade sob condições de fixação de nitrogênio (Luna *et al.*, 2006).

Tejera *et al.* (2004) avaliaram a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio sobre o crescimento da bactéria e sobre a atividade da nitrogenase, verificando que a formação de células é favorecida por asparagina, ácido aspártico e ácido glutâmico, enquanto a atividade da enzima é prejudicada. As enzimas responsáveis pela oxidação direta de glicose e de gliconato estiveram especialmente ativas quando as células foram cultivadas com sacarose ou gliconato como fonte de carbono. A atividade da enzima gliconato desidrogenase foi alta com a maioria das fontes de carbono testadas, exceto etanol e oxalacetato.

No trabalho de Cavalcante e Döbereiner (1988) foi demonstrado que concentrações de sacarose de até 30% são toleradas pela bactéria, mas no referido trabalho não foram quantificados parâmetros de fermentação. Luna *et al.* (2006) constataram que quanto maior a concentração de glicose, na faixa entre 20 e 50 g/L, maior é a síntese e a atividade de NAD-GDH, em cultivo em sistema contínuo sob FBN. Em sistema descontínuo com emprego de 150 g/L de glicose, e utilizando células pré-adaptadas em cultivo contínuo, Atwood *et al.* (1991) verificaram aumento da concentração celular e elevado rendimento em ácido glicônico, sem qualquer sinal de inibição do cultivo na cinética apresentada no trabalho, que foi expressa como a densidade ótica em função do tempo. Com sacarose como substrato, Molinari e Boiardi (2013) verificaram máxima produção de levana em meios com 100 g/L do substrato e nitrogênio obtido por FBN, com rendimento similar ao reportado para outros micro-organismos. A maior produção de biomassa (6,0 g/L) foi

também obtida nesta condição, o que representou, portanto, um rendimento de apenas 0,06 g/g. Porém, no cultivo em meio com 20 g/L de sacarose suplementada com sulfato de amônio e fontes orgânicas de nitrogênio, houve aumento expressivo do rendimento em biomassa (0,22 g/g).

Os resultados de Boniolo *et al.* (2009) mostraram que concentrações elevadas de NaCl no meio de cultivo influenciam o cultivo de *G. diazotrophicus* em meios com 10 g/L de sacarose. Concentrações do sal entre 50 e 300 mM acarretaram diminuição da concentração celular de (2,2 para 0,44 g/L), em comparação com o controle (2,5 g/L). Da mesma forma, as máximas velocidades específicas de crescimento e a produtividade em células, que foram de 0,24 h<sup>-1</sup> e 0,12 g/L.h. no controle, respectivamente, foram afetadas com concentração de NaCl acima de 100 mM (0,20 h<sup>-1</sup> e 0,077 g/L.h, respectivamente). A inibição ocorreu principalmente nos meios com 200 e 300 mM, nos quais nem a adição de um osmoprotetor (glicina betaína) ao meio foi suficiente para neutralizar o efeito inibitório ocasionado pelo sal.

Nunes (2010) estudou a cinética da fermentação descontínua de *G. diazotrophicus* PAL5 em meios semi-definidos, com diferentes fontes de carbono, com e sem o controle do pH. A produção final de biomassa foi positivamente favorecida em meio formulado com 10 g/L de glicose e pH controlado em 6, obtendo-se rendimento de 97,8% em ácido glicônico, 3,5 g/L de células, um fator de conversão de glicose em células igual a 0,42 g/g e produtividade em células de 0,34 g/L.h. Com 23 g/L de glicose, sem concomitante aumento das concentrações iniciais das fontes de nitrogênio, apenas metade do açúcar foi metabolizado, levando à redução da concentração celular (2,7 g/L), da conversão em células (0,26 g/g) e da produtividade em células (0,26 g/L.h). Porém, com aumento da concentração inicial de nitrogênio, glicose foi totalmente consumida, sendo obtidas concentrações celulares e produtividade em células significativamente maiores (5,0 g/L e 0,41 g/L.h, respectivamente). Em cultivos com pH livre, ambos os parâmetros de fermentação foram prejudicados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo Geral

O estudo tem como objetivo geral avaliar diferentes condições operacionais para cultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* visando a obtenção de altas densidades celulares da bactéria com vistas à sua aplicação na formulação de inoculantes agrícolas.

### 2.2 - Objetivos específicos

- I. Avaliar a influência de concentrações iniciais crescentes de glicose sobre o crescimento, em ensaios em biorreator sem controle de oxigênio dissolvido e pH mantido em 6,0;
- II. Avaliar a influência de concentrações iniciais crescentes de glicose sobre o crescimento, em ensaios em biorreator com controle de oxigênio dissolvido em 20% da saturação e pH em 6,0;
- III. Avaliar a influência da alteração das concentrações de glicose e de extrato de levedura no meio de cultivo sobre o crescimento, pela realização de pulso de solução concentrada dos nutrientes ao longo do processo fermentativo, realizado com controle de oxigênio dissolvido em 20% da saturação e pH em 6,0;
- IV. Avaliar a influência do emprego de meios com concentrações iniciais variáveis de glicose e de extrato de levedura sobre o crescimento, em ensaios realizados com oxigênio dissolvido controlado em 20% da saturação e pH em 6,0;
- V. Avaliar a produção de ácido glicônico nas mesmas condições de processo avaliadas na etapa anterior.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Micro-organismo

A bactéria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 foi utilizada nos ensaios deste trabalho. A cepa foi cedida pelo Professor Fábio Lopes Olivares, do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT/CBB/UENF).

#### 3.2 - Meios de Cultivo

O Meio DYGS<sub>m</sub> sólido foi empregado para manutenção da cultura em Placa de Petri. Para o preparo das culturas estoque e de inóculos foi empregado o meio GDS. Os componentes do meio foram dissolvidos em água destilada e esterilizados a 121 °C por 20 min. Glicose e os sais de fosfato foram preparados separadamente em solução concentrada, autoclavados e adicionados aos meios no momento do ensaio, em volume adequado à obtenção das concentrações desejadas. A composição dos meios é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Composição dos meios de cultivo DYGS<sub>m</sub> e GDS.

Componente	Meio de Cultivo	
	DYGS <sub>m</sub>	GDS
	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )	
Extrato de levedura	2,0	3,0
Peptona bacteriológica	1,5	2,0
Glicose	2,0	10,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	3,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	3,0
Ácido Glutâmico	1,5	1,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	1,32
Ágar	15	-

Como referência para o estudo cinético da fermentação e avaliação das diferentes condições de fermentação, foi empregado o meio GDS<sub>2N</sub> (Tabela 2). A formulação do meio GDS<sub>4N</sub> resultou da suplementação do meio GDS<sub>2N</sub> com o dobro da concentração inicial de extrato de levedura (12,0 g.L<sup>-1</sup>), e o meio GDS<sub>6N</sub> com o triplo da concentração inicial de extrato de levedura (18,0 g.L<sup>-1</sup>).

Tabela 2: Composição dos meios de cultivo GDS<sub>2N</sub>, GDS<sub>4N</sub> e GDS<sub>6N</sub>.

Componente	Meio de Cultivo		
	GDS <sub>2N</sub>	GDS <sub>4N</sub>	GDS <sub>6N</sub>
	Concentração (g.L <sup>-1</sup> )		
Extrato de levedura	6,0	12,0	18,0
Peptona bacteriológica	4,0	4,0	4,0
Glicose	20,0	20,0	20,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5	1,5	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,0	3,0	3,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0	3,0	3,0
Ácido Glutâmico	1,5	1,5	1,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2,64	2,64	2,64

### 3.3 - Condições de cultivo

#### 3.3.1 - Preparo das culturas estoque

Uma alíquota da cultura de *G. diazotrophicus* PAL5 foi repicada em placa de Petri com meio DYGS<sub>m</sub> e incubada por três dias em estufa a 30 °C e estocada *overnight* em refrigerador a 4 °C. Frascos *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 25 mL de Meio GDS, cobertos com uma fina manta de algodão e gaze, foram inoculados com uma alçada dessa cultura. Os frascos foram incubados em incubadora-agitadora de movimento recíproco a 30 °C e 110 min<sup>-1</sup> por 15 h, de modo a atingir concentração celular de aproximadamente 1 g/L. Em frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 100 mL de Meio GDS foram inoculados 5% (v/v) do meio fermentado. Os frascos

foram incubados na mesma condição por 19 h, tempo necessário para atingir concentração celular de 1,5 g/L.

Alíquotas de 6 mL da cultura foram distribuídas em tubos tipo *Falcon* de 15 mL, aos quais foram adicionados 6 mL de solução de glicerol para armazenamento de bactérias (65% de glicerol; 0,01 M de  $\text{MgSO}_4$ ; Tris – HCl pH 8 0,000625M), resultando numa suspensão com concentração celular de 0,8 g/L. Os tubos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados em *freezer* a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$ .

### 3.3.2 - Preparo de inóculo

Três dias antes do início do ensaio de fermentação, uma alíquota da cultura estoque era repicada em meio DYGSm em placa de Petri, a qual é incubada em estufa a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  e estocada *overnight* em refrigerador a  $4\text{ }^\circ\text{C}$ . Uma alçada desta cultura era transferida para um frasco *Erlenmeyer* de 125 mL, coberto com fina manta de algodão e gaze, contendo 25 mL de meio GDS. O frasco era incubado em incubadora-agitadora de movimento recíproco a  $30\text{ }^\circ\text{C}$  e a  $110\text{ min}^{-1}$  por 15 h. Uma alíquota (5% v/v) desta pré-cultura era transferida para frascos *Erlenmeyer* de 500 mL contendo 100 mL de meio GDS, que eram incubados por 18 h nas mesmas condições. A cultura assim obtida constitui a cultura de inóculo para o fermentador.

### 3.3.3 - Ensaio de fermentação

Os ensaios de fermentação foram realizados em biorreator New Brunswick modelo BioFlo/CelliGen 115, com cuba de vidro com volume útil de 3 L e com controle automático de todas as variáveis de processo. O sistema foi operado em sistema descontínuo, utilizando-se volume inicial de meio de 1,9 L, e temperatura de  $30\text{ }^\circ\text{C}$ .

Nos ensaios iniciais, as condições de aeração e agitação foram ajustadas para se obter um valor inicial de  $k_La$  de  $140\text{ h}^{-1}$  (Flores-Encarnación *et al.*, 1999), o que representa, para a configuração empregada, agitação de  $600\text{ min}^{-1}$  e aeração de 1 vvm. Nos ensaios em que são empregadas diferentes concentrações de oxigênio dissolvido (OD), os valores desejados são mantidos constantes pela variação da agitação e da vazão de ar no reator. O pH era corrigido para 6 no início da fermentação e controlado durante o processo, utilizando-se NaOH (hidróxido de

sódio) 4 M e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (ácido sulfúrico) 2 M. Nos casos em que foi feita a suplementação do meio de fermentação com nutrientes durante o processo, foi empregada uma bomba peristáltica independente (Wattson-Marlow modelo SCI 400).

A cuba do fermentador, contendo o meio de fermentação, e já instalados o eletrodo de pH (METTLER TOLEDO), o eletrodo de oxigênio dissolvido (METTLER TOLEDO InPro 6000) o condensador, os filtros de ar, as sondas para controle no nível de espuma e para controle da temperatura e as tubulações utilizadas para a retirada de amostras e adições de meio, antiespumante e base, foi esterilizada a 121 °C por 20 min. O eletrodo de pH foi calibrado antes da esterilização, e o eletrodo de oxigênio dissolvido foi calibrado momentos antes da inoculação.

Em todos os casos, foram determinadas as concentrações de células, glicose e ácido glicônico, de modo a avaliar os perfis cinéticos de crescimento, de consumo de substratos e de formação de produtos. Foi feita também uma avaliação gráfica das respectivas velocidades instantâneas e específicas, além do cálculo dos fatores de conversão de substrato em células e de substrato em produtos e produtividades.

Para atender aos objetivos específicos, a sequência experimental consistiu em três grupos de ensaios (Grupos I, II e III). Os ensaios do **Grupo I** tiveram como finalidade conhecer a cinética de crescimento e de consumo de substrato em meio  $\text{GDS}_{2\text{N}}$  com três concentrações iniciais de carboidrato ( $S_0$ ) [20, 40, 60 g/L], mantendo-se fixas as concentrações dos demais nutrientes do meio. Neste caso, buscava-se evidenciar os perfis cinéticos de crescimento, consumo de substrato e formação de produto. Nestes ensaios o pH foi controlado em 6,0 e o  $k_{\text{La}}$  inicial foi de  $140 \text{ h}^{-1}$ .

Em função dos resultados obtidos nos Ensaios do Grupo I, os ensaios do **Grupo II** tiveram como objetivo avaliar o efeito da transferência de oxigênio sobre a cinética global do cultivo, em meio  $\text{GDS}_{2\text{N}}$  com concentrações de glicose de 40, 60, 80 e 120 g/L.

Na primeira etapa do **Grupo III**, a concentração inicial de glicose foi fixada em 40 g/L, mas ao longo do processo foi realizado um ou mais pulsos de nutrientes (glicose ou glicose mais extrato de levedura) para o meio de fermentação  $\text{GDS}_{2\text{N}}$ . Nestes ensaios a concentração de oxigênio dissolvido foi controlada em 20%, a partir do momento em que essa condição foi atingida. Em um ensaio adicional, o valor de  $S_0$  foi de 120 g/L e a solução de alimentação foi composta apenas com

extrato de levedura (6 g/L). A cinética de fermentação obtida nos ensaios do Grupo II orientou o momento adequado para a alimentação. Os minerais e as fontes de nitrogênio, bem como suas concentrações, foram aquelas empregadas da formulação original do meio GDS<sub>2N</sub>. Na segunda etapa do **Grupo III** a concentração inicial de extrato de levedura (fonte de nitrogênio orgânico) no meio foi aumentada a fim de verificar a influência de uma menor relação carbono:nitrogênio sobre o crescimento microbiano. Foram testados meios com S<sub>0</sub> de 70 g/L contendo o dobro da concentração original de extrato de levedura (meio GDS<sub>4N</sub>) e S<sub>0</sub> de 90 g/L contendo o triplo da concentração original de extrato de levedura (meio GDS<sub>6N</sub>). Os ensaios foram feitos com controle da concentração de oxigênio dissolvido em 20% da saturação.

### **3.4 - Métodos Analíticos**

#### **3.4.1 - Morfologia celular**

A morfologia celular foi acompanhada ao longo da fermentação pela observação de preparações a fresco do meio fermentado, em microscópio de contraste de fase (JENA modelo Jenamed 2) com aumento de 400x.

#### **3.4.2 - Concentração celular**

A concentração celular foi quantificada indiretamente pela medida da absorbância de suspensões diluídas do meio fermentado, convertida em concentração (massa de matéria seca por unidade de volume) por uma equação que descreve o trecho linear de uma curva de calibração. A medida de crescimento microbiano através da técnica de turbidimetria pressupõe que a quantidade de luz que chega ao detector (transmitância) é inversamente proporcional ao número de células na amostra. Assim, quanto maior o número de bactérias na amostra, menor é a quantidade de luz transmitida.

Para a construção da curva foi utilizada uma suspensão de células de *G. diazotrophicus* PAL5 cultivada em meio GD<sub>Glic</sub> (Nunes, 2010), nas mesmas condições adotadas para os ensaios de fermentação em frascos agitados, conforme o seguinte procedimento:

- 30 mL do meio fermentado foram centrifugados a 4.500 g por 20 minutos a 25 °C (Centrífuga Eppendorf modelo 5804R), descartando-se o sobrenadante;
- O *pellet* foi homogeneizado em água destilada e centrifugado nas mesmas condições, sendo esta operação repetida duas vezes;
- As células foram transferidas para cadinhos de porcelana, previamente secos e pesados, os quais foram colocados em estufa a 85 °C por 24 h;
- Após resfriamento por 20 min em dessecador, os cadinhos foram pesados e a concentração celular calculada dividindo-se a massa seca de células pelo volume inicial de meio fermentado;
- Paralelamente às operações de determinação da massa seca de células, a absorbância das amostras, convenientemente diluídas, foi medida em espectrofotômetro (SHIMADZU UV1800) a 600 nm;

A absorbância de cada uma das suspensões de células foi correlacionada com a concentração e, com os pontos do trecho linear da reta obtida, foi definida a equação, por regressão linear, utilizada no cálculo da concentração celular das amostras de fermentação durante os diferentes ensaios. A seguinte equação foi obtida:  $Abs_{600nm} = 2,072.X - 0,009$ , em que X representa a concentração celular, em  $g.L^{-1}$ . Na Figura 3 é apresentada a curva obtida com a respectiva equação de reta.

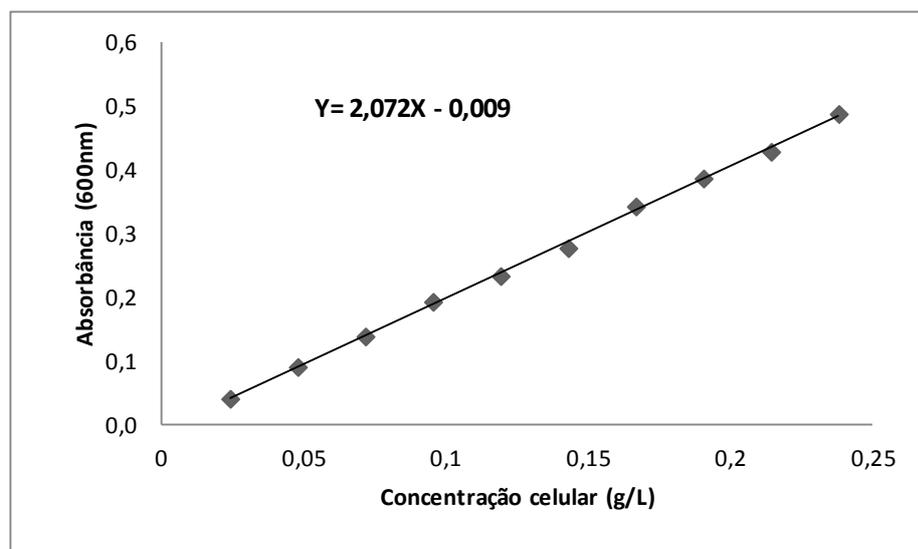


Figura 3: Curva de calibração para determinação da concentração celular por turbidimetria.

### 3.5 - Concentração de glicose

A concentração de glicose foi determinada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC Shimadzu modelo LC10A VP) usando um detector de espalhamento de luz (ELSD-LT II). Foi usada coluna Prevail Carbohydrate ES 5  $\mu\text{m}$  (250 x 4,6 mm) (Prevail) e temperatura de 25  $^{\circ}\text{C}$ . Os solventes utilizados foram Água miliQ (solvente A) e acetonitrila 100% (solvente B). A corrida foi realizada em gradiente isocrático ajustado para 80% de solvente B durante 40 min, com fluxo de 1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . O detector foi ajustado para a temperatura de 40  $^{\circ}\text{C}$  e pressão de 350 KPa. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro de 0,20  $\mu\text{m}$ . As áreas e tempos de retenção dos diferentes compostos foram avaliados por comparação com padrão em diferentes concentrações.

### 3.6 - Quantificação de ácido glicônico e seus cetos-derivados

A quantificação de ácido glicônico foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC Shimadzu modelo LC10A VP). As seguintes condições foram empregadas: coluna Biorad Aminex HPX-87H (300 x 7,8mm), temperatura da coluna de 30  $^{\circ}\text{C}$ , fluxo do eluente 0,6  $\text{mL}/\text{min}$ , volume da amostra injetada de 20  $\mu\text{L}$ . A fase móvel consistiu de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,004M. Foi empregado detector UV, operando com um comprimento de onda de 210 nm. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtro de 0,20  $\mu\text{m}$ . As áreas e tempos de retenção dos diferentes compostos foram avaliados por comparação com padrão em diferentes concentrações.

### 3.7 - Cálculos de parâmetros de fermentação

O cálculo da produtividade em células ( $Q_x$ ) foi feito utilizando-se a equação 1, na qual  $X_m$  é concentração celular máxima,  $X_0$  a concentração celular inicial e  $t_{x_m}$  o tempo necessário para obtenção da máxima concentração celular.

$$Q_x = (X_m - X_0) / t_{x_m} \quad (1)$$

A produtividade volumétrica em produtos ( $Q_p$ ) foi feita empregando-se a equação 2, em que  $P_0$  e  $P_m$  representam as concentrações iniciais e máximas de

ácido glicônico, respectivamente, e  $t_{Pm}$  o tempo necessário para obtenção da máxima formação de produto.

$$Q_p = (P_m - P_0) / t_{Pm} \quad (2)$$

O fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) foi calculado utilizando-se a equação 3, em que  $S_{Xm}$  é concentração de substrato em  $t_{Xm}$  e  $S_0$  a concentração inicial de substrato.

$$Y_{X/S} = (X_m - X_0) / (S_0 - S_{Xm}) \quad (3)$$

O fator de conversão de substrato em produtos ( $Y_{P/S}$ ) foi calculado utilizando-se a equação 4, em que  $P_m$  é concentração de produto no tempo necessário para atingir a máxima concentração de produtos e  $P_0$  a concentração inicial de produto.

$$Y_{P/S} = (P_m - P_0) / (S_0 - S_{Xm}) \quad (4)$$

O rendimento em ácido glicônico ( $R$ ) foi calculado dividindo-se o valor calculado de  $Y_{P/S}$  pelo valor máximo teórico (0,918 g/g) (Equação 5).

$$R = (Y_{P/S} / 0,918) \times 100 \quad (5)$$

Para o cálculo das velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ), foi realizado um ajuste sigmoidal, com pontos experimentais relacionando concentrações celulares com o tempo, utilizando-se o programa computacional Microcal Origin 8.0 (Microcal Software Inc, EUA). A curva ajustada foi convertida em tabela (100 pontos), derivando-se os novos valores. Para cálculo das velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ), os valores de  $dX/dt$  foram divididos pela concentração celular no mesmo tempo. As máximas velocidades específicas de crescimento ( $\mu_m$ ) foram determinadas por regressão linear do trecho linear da curva que correlaciona o logaritmo natural da concentração celular em função do tempo, que corresponde à fase exponencial de crescimento. O coeficiente angular da equação de reta representa o próprio valor de  $\mu_m$ .

As velocidades instantâneas de consumo de substrato ( $dS/dt$ ) e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) foram também determinadas pelo ajuste gráfico dos pontos experimentais relacionando-se as concentrações de glicose e do produto com o tempo, respectivamente, utilizando-se o mesmo programa computacional, e

derivando-se os novos valores. As velocidades específicas de consumo de substrato ( $\mu_S$ ) e de formação de produtos ( $\mu_P$ ) foram calculados dividindo-se as velocidades instantâneas pelas respectivas concentrações celulares no mesmo instante.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Fermentação em meios com concentrações iniciais crescentes de glicose

Com o objetivo de conhecer o efeito da concentração inicial de glicose ( $S_0$ ) sobre o cultivo bacteriano, foi realizado um primeiro grupo de ensaios (Grupo I) empregando-se o meio GDS<sub>2N</sub> com  $S_0$  de, aproximadamente, 20, 40 e 60 g/L (Ensaio G20, G40 e G60, respectivamente). As condições operacionais de transferência de oxigênio (agitação e aeração de 600 min<sup>-1</sup> e 1 vvm, respectivamente) foram mantidas constantes, a fim de não acrescentar outras variáveis ao estudo.

Uma análise preliminar dos perfis cinéticos obtidos (Figuras 4 a 6) permitiu fazer uma caracterização geral do comportamento microbiano nas diferentes condições testadas. Verificou-se que, independentemente da concentração de glicose empregada, as curvas de crescimento mostraram uma curta fase *lag*, seguida de fase exponencial, na qual foram medidas máximas velocidades específicas de crescimento ( $\mu_m$ ) análogas. Após este período, o cultivo apresentou uma fase linear, seguida das fases estacionária e de declínio. O consumo de oxigênio dissolvido foi intensificado durante a fase exponencial de crescimento e, após atingir concentrações muito próximas ou iguais a zero, permaneceu nesta condição por período de tempo variável, em função de  $S_0$ , voltando a subir e atingir valores próximos a 100% ao final do processo. Em todos os casos, glicose foi completamente consumida, o que ocorreu em momento anterior ao da obtenção da máxima concentração celular. A formação de ácido glicônico foi verificada já na primeira hora de cultivo, coincidindo com o início do metabolismo de glicose e, à exceção do ensaio G60, atingiu a máxima concentração pouco antes do esgotamento deste substrato no meio. Porém, em todos os casos, o ácido formado foi totalmente metabolizado, verificando-se aumento da concentração celular.

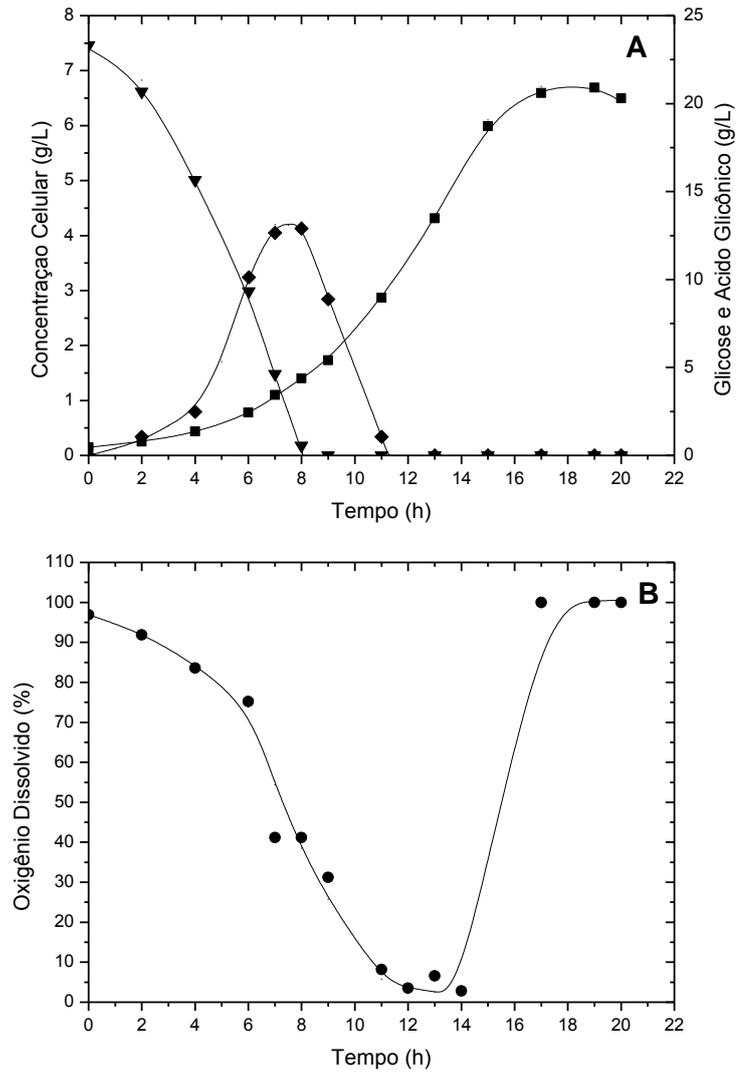


Figura 4 – Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G20.

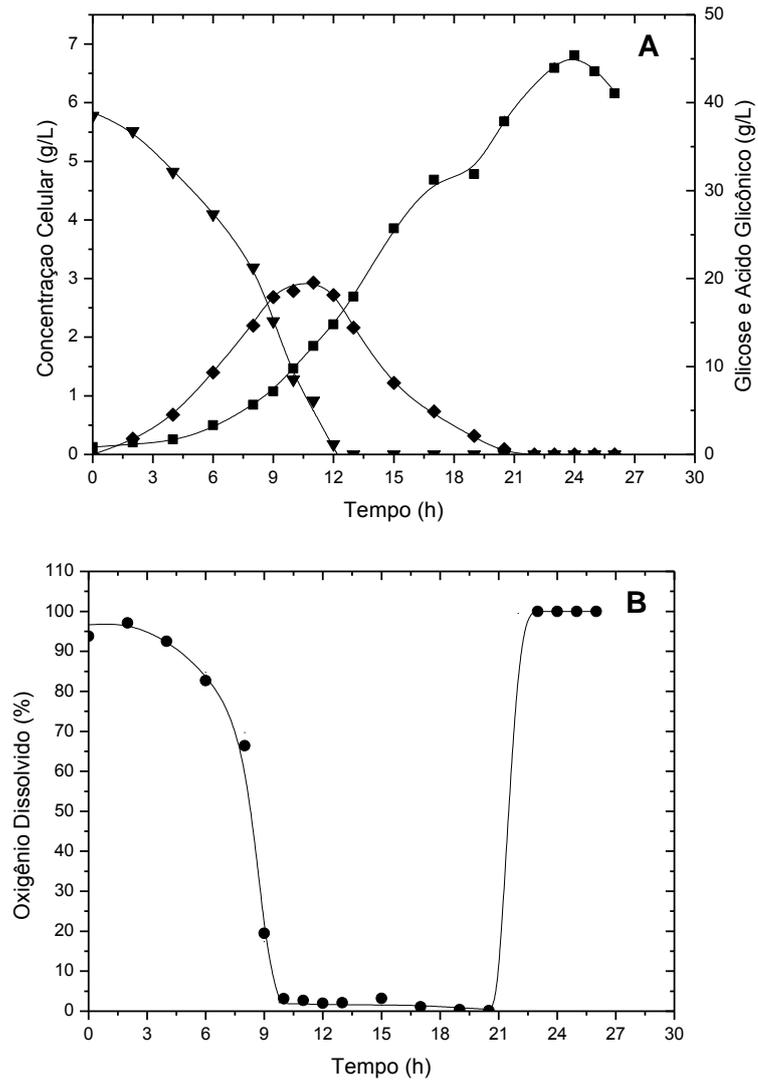


Figura 5 – Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G40.

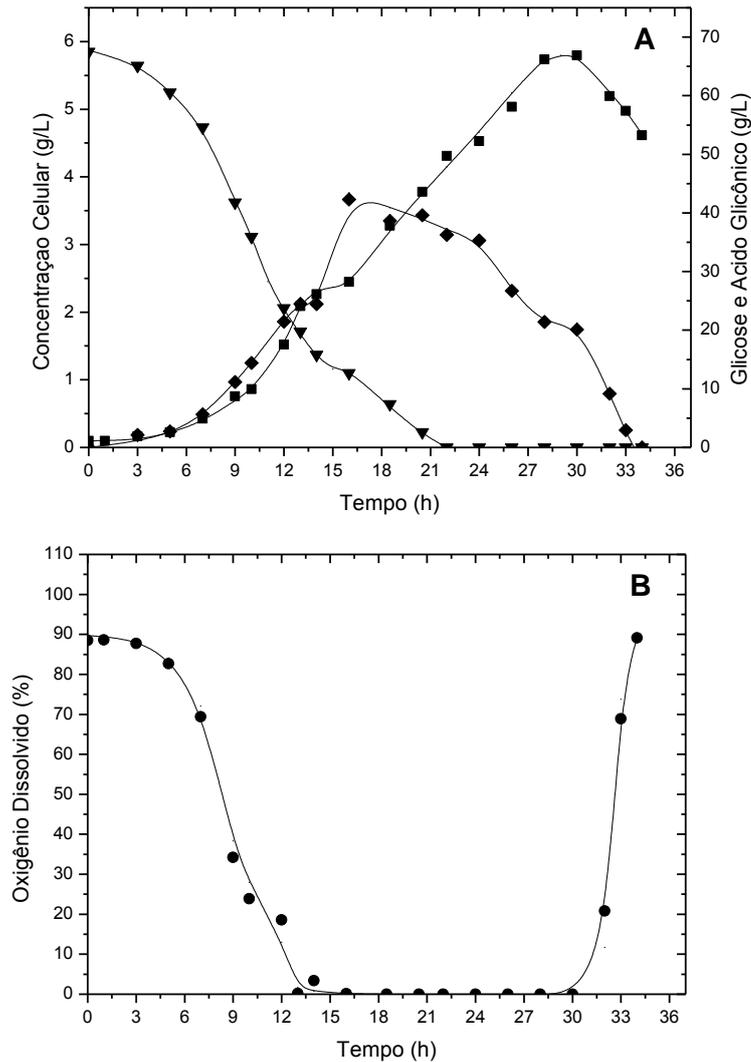


Figura 6 – Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G60.

Uma avaliação mais detalhada dos resultados obtidos mostra, no entanto, que apesar das características gerais em comum, verificaram-se algumas variações no comportamento cinético da fermentação nas diferentes condições testadas, evidenciadas por diferenças nas velocidades de metabolismo, e em alguns parâmetros de processo, com o aumento de  $S_0$ .

Em G20, a curva de consumo de glicose apresentou um perfil decrescente e praticamente linear do início até o seu esgotamento no meio, enquanto a curva referente à produção de ácido exibiu menores velocidades nas primeiras 2-3 horas, seguida de aumento expressivo a partir deste ponto (Figuras 4A e 7A). A máxima concentração do produto foi alcançada pouco antes da exaustão de glicose no meio,

verificada com 8,1 h de processo, mas após um curto período em que as concentrações permaneceram aproximadamente constantes, a curva  $P=f(t)$  assumiu um perfil decrescente, com completa degradação do ácido nas 3 horas seguintes (Figura 4A). Nenhum destes eventos implicou em qualquer inflexão na curva de crescimento, que após a fase exponencial manteve um perfil linear por cerca de 5 horas, atingindo a fase estacionária com 17 horas de fermentação. As curvas que mostram a variação, com o tempo, das velocidades instantâneas de consumo de glicose ( $dS/dt$ ), de crescimento ( $dX/dt$ ), de síntese de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (Figura 7A) evidenciam que os máximos valores de  $dS/dt$  (4,33 g/L.h) foram medidos um pouco depois da obtenção de máximos  $dP/dt$  (4,5 g/L.h) e que os máximos valores de  $dS_P/dt$  (4,47 g/L.h) foram análogos a estes últimos. Por outro lado, as máximas velocidades instantâneas de crescimento foram verificadas em momento posterior (10,5 a 14 h) a todas as demais e atingiu um valor médio de 0,71 g/L.h. Ressalta-se que os valores indicados para as máximas velocidades representam um valor médio, calculado para o intervalo de tempo em que a diferença entre o valor mínimo e máximo não ultrapassava 10%.

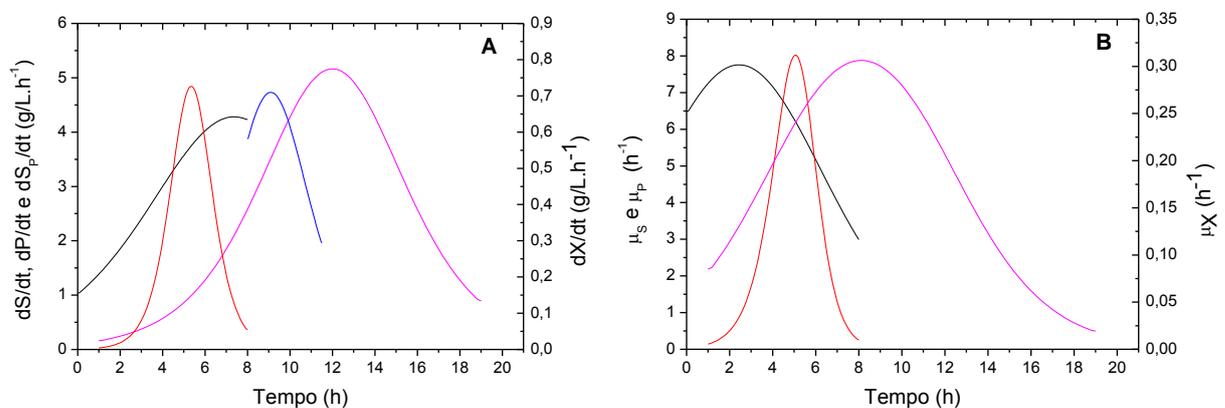


Figura 7 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; e velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G20.

O comportamento cinético descrito resultou numa defasagem, em relação ao tempo, do intervalo para obtenção das máximas velocidades específicas ( $\mu_S$ ,  $\mu_P$  e  $\mu_X$ ) em G20 (Figura 7B). Este comportamento não corresponde a nenhuma das

classificações cinéticas propostas por Gaden (1955). A evolução de  $\mu_X$  não acompanhou propriamente o andamento de  $\mu_S$  e  $\mu_P$ , não caracterizando cinética de formação de produto associada ao crescimento. A cinética semi-associada também não ficou caracterizada, pois no intervalo de máximos  $\mu_P$  e  $\mu_X$  a curva de  $\mu_S$  era decrescente. Não foi certamente também o caso de cinética não associada, uma vez que os máximos  $\mu_P$  foram obtidos com valores relativamente altos de  $\mu_X$  e  $\mu_S$ . Conforme ponderado por Hiss (2001), a classificação de Gaden não enquadra, de modo irrestrito, qualquer processo fermentativo.

Em G40, as máximas velocidades de consumo de glicose ( $dS/dt=5,86$  g/L.h) foram superiores às verificadas em G20, ao contrário das máximas velocidades de síntese de ácido ( $dP/dt=2,96$  g.L.h<sup>-1</sup>), que foram 52% menores (Figura 8A). Também de modo diverso, os máximos valores de  $dP/dt$  foram muito inferiores (duas vezes) aos máximos valores de  $dS/dt$  e o consumo do produto formado também ocorreu de forma mais lenta ( $dS_P/dt=3,33$  g/L.h) que em G20, o que afetou, aparentemente, as máximas velocidades de crescimento, que foram muito menores (65%) ( $dX/dt=0,43$  g/L.h). A curva de crescimento, cuja fase linear foi mais longa, apresentou uma ligeira inflexão nos instantes finais do consumo do ácido, com retomada do crescimento, em menores velocidades, por cerca de mais três horas.

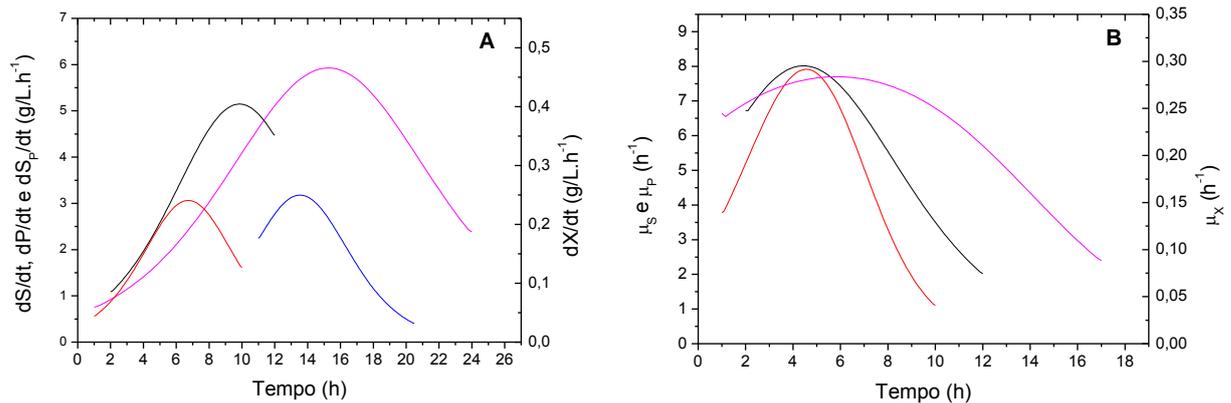


Figura 8 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; e velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G40.

Os perfis de variação das velocidades específicas em relação ao tempo mostraram, no entanto, que não houve uma defasagem expressiva entre os intervalos de medida dos máximos valores de  $\mu_S$ ,  $\mu_P$  e  $\mu_X$  (Figura 8B), que foram coincidentes por cerca de 3 h. Isto sugere que, neste caso, a cinética poderia ser classificada, em princípio, como parcialmente associada ao crescimento (Gaden, 1955). Porém, os valores de  $\mu_X$  mantiveram-se elevados no período de queda de  $\mu_S$  e  $\mu_P$ , comportamento que não se encaixa nesta classificação.

Em G60, as velocidades de consumo atingiram um máximo de 5,87 g/L.h entre 8 e 11,5 h. Porém, diferentemente dos demais ensaios, verificou-se uma redução acentuada de  $dS/dt$  a partir deste instante, mesmo ainda havendo um residual significativo de açúcar em solução (20 g/L). Foi observado um discreto patamar na curva  $S=f(t)$  entre os tempos de 13 e 15,5 h e o esgotamento deste substrato foi verificado em momento superior ao dos demais ensaios, em  $t=22$  h (Figura 6A e 9A). Esse comportamento refletiu-se no perfil de produção de ácido glicônico, que foi distinto ao de G20 e G40. Verificou-se um pequeno patamar na curva de formação do produto, correspondente ao intervalo de diminuição das velocidades de consumo de glicose, com máximas velocidades de produção de ácido de aproximadamente 3,5 g/L.h. Mas, a sua síntese foi reiniciada e o perfil ascendente retomado, com maior  $dP/dt$ . As máximas concentrações de ácido foram obtidas poucas horas depois, e se mantiveram praticamente constantes enquanto havia glicose em solução. O perfil de variação da velocidade de consumo do ácido produzido também apresentou diferenças, sendo observados valores médios de 2,5 g/L.h até 27 h, quando o cultivo alcançou a máxima concentração celular, seguido de aumento para cerca de 3,5 g/L.h entre este momento e o final do processo (33,4 h), quando a curva  $X=f(t)$  era decrescente. Portanto, de forma distinta, neste ensaio a máxima concentração celular foi alcançada antes do consumo total do ácido sintetizado e a fase de declínio coincidiu com o período de maiores  $dS_P/dt$ . A curva de crescimento também apresentou um patamar no intervalo de 14 a 16 h, mas exibiu depois disso um longo trecho linear, embora os máximos valores de  $dX/dt$  (0,27 g/L.h, em média) (Figura 9A) tenham sido 1,6 e 2,6 vezes menores, respectivamente, que os medidos em G20 e G40. Os perfis de variação das velocidades específicas (Figura 9B) apresentou, por sua vez, um comportamento similar ao verificado em G40.

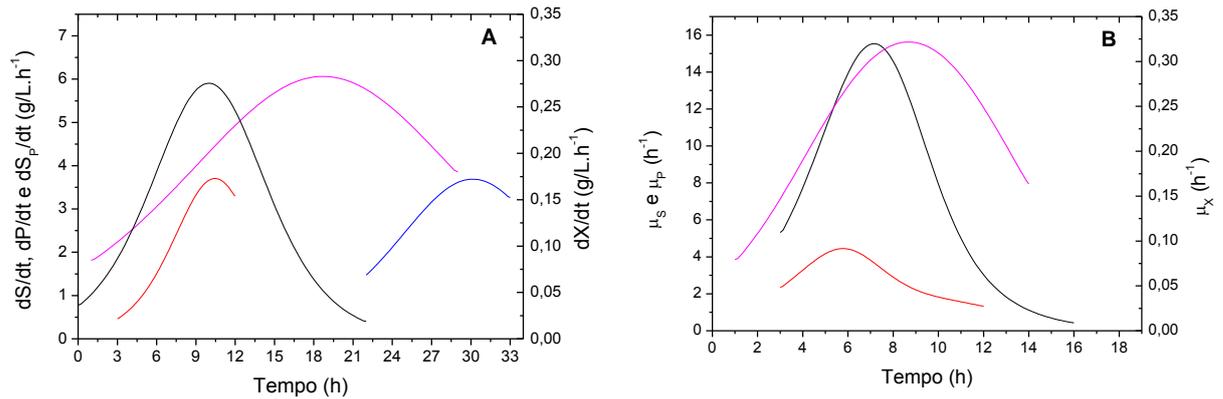


Figura 9 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; e velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G60.

A Figura 10, que reúne os perfis cinéticos obtidos nos três ensaios permite uma melhor visualização das diferenças de comportamento do cultivo com o aumento da concentração inicial de glicose e facilita a comparação entre os resultados.

O efeito das diferentes concentrações de glicose sobre o desempenho do cultivo pode ser também avaliado quantitativamente com base em diferentes parâmetros de fermentação, resumidos na Tabela 3. Constatou-se que o aumento de  $S_0$  implicou em aumento do tempo necessário para a obtenção da máxima concentração celular ( $t_{Xm}$ ) e do tempo total de fermentação ( $t_f$ ). Com maior  $S_0$  (G60),  $t_{Xm}$  foi de 29 h, valor 31% maior que o verificado em G40 e 62% maior que o de G20. A produção de biomassa foi análoga em G20 e G40 (6,6 g/L), mas 20% menor em G60 (5,7 g/L). Nestas condições, os valores de produtividade em células ( $Q_X$ ) foram decrescentes, com maior impacto no caso do ensaio G60, no qual o valor de  $Q_X$  (0,20 g/L.h) foi 85% menor que o calculado em G20 (0,28 g/L.h). Por outro lado, como não houve diferença nos valores de  $\mu_m$  obtidos nos três ensaios, ficou evidenciada a ausência de inibição do cultivo pelas concentrações de glicose empregadas.

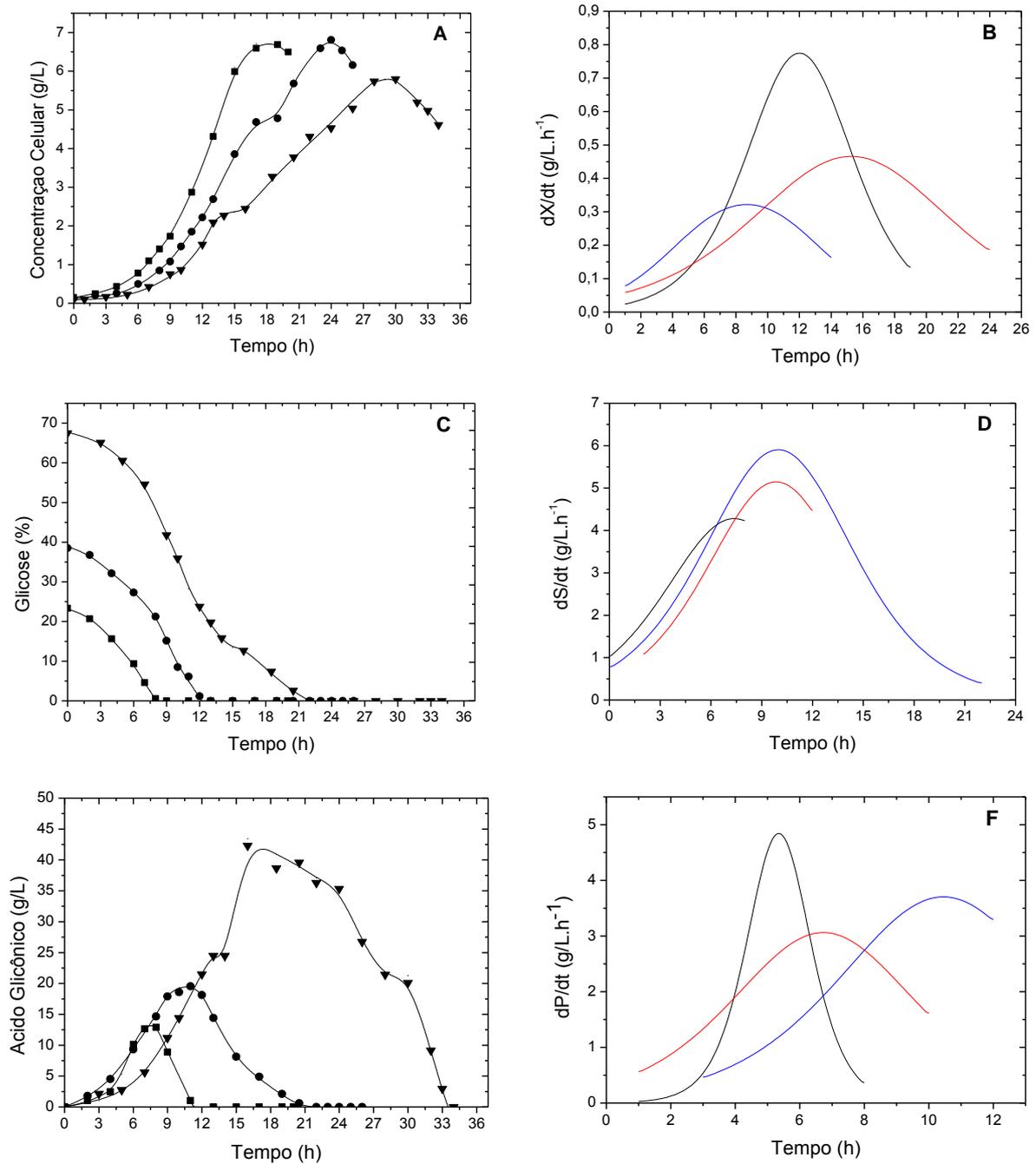


Figura 10 – Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E], e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) [D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo nos Ensaio G20 (■ —); G40 (• —) e G60 (▼ —).

Tabela 3 - Parâmetros gerais do cultivo de *G. diazotrophicus* PAL5 em meio GDS<sub>2N</sub> com concentrações iniciais crescentes de glicose, em ensaios realizados em fermentador de bancada sem controle da concentração de oxigênio dissolvido (Ensaio G20, G40 e G60).

Parâmetro	Ensaio		
	G20	G40	G60
$t_f$ (h)	21	26	34
$t_{x_m}$ (h)	17,7	23,7	29
$t_{P_m}$ (h)	7,4	10,4	17
$X_m$ (g/L)	6,6	6,6	5,7
$S_0$ (g/L)	23	39	67,3
$\Delta S$ (g/L)	23	39	67,3
$P_m$ (g/L)	13,1	19,4	41,6
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,28	0,17	0,085
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,57	0,50	0,62
R (%)	62	54	67,5
$Q_x$ (g/L.h)	0,37	0,28	0,20
$Q_P$ (g/L.h)	1,77	1,87	2,45
$\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )	0,31	0,31	0,30

$t_f$  - Tempo total de fermentação;  $t_{x_m}$  - tempo para obtenção da máxima concentração celular;  $t_{P_m}$  - tempo para obtenção da máxima concentração de ácido glicônico;  $X_m$  - diferença entre a concentração celular em  $t_{x_m}$  e no início do cultivo;  $S_0$  - concentração inicial de glicose;  $\Delta S$  = total de glicose consumida;  $P_m$  - máxima concentração de produto;  $Y_{X/S}$  - fator de conversão de substrato em células;  $Y_{P/S}$  - fator de conversão de glicose em ácido glicônico; R - rendimento em ácido glicônico;  $Q_x$  - produtividade em células;  $Q_P$  - produtividade em produto;  $\mu_m$  - máxima velocidade específica de crescimento.

Com relação à formação de ácido glicônico, observou-se aumento progressivo da máxima concentração do produto ( $P_m$ ) com o aumento de  $S_0$ , tendo sido alcançadas 41,6 g/L em G60, que é o dobro daquela verificada em G40 e o triplo da obtida em G20. O fator de conversão de substrato em produto ( $Y_{P/S}$ ) calculado para G60 foi 0,62 g/g, o que corresponde a um rendimento (R) de 67,5% em relação ao máximo teórico. A diferença entre este valor e aquele alcançado em G40 é de 25%, mas de apenas 9% quando comparado com o obtido em G20. O tempo necessário para atingir  $P_m$  ( $t_{P_m}$ ) foi de 7,4 e 10,4 h em G20 e G40, respectivamente, resultando em valores de produtividade em produto ( $Q_P$ ) de 1,77 e 1,87 g/L.h. Em G60, apesar de  $t_{P_m}$  ter sido muito maior (17 h), a obtenção de uma maior concentração de ácido

glicônico resultou em um valor de  $Q_P$  (2,66 g/L.h) expressivamente maior (50% e 42%, respectivamente) que G20 e G40.

Uma vez que todo o ácido glicônico excretado no meio foi produzido a partir de glicose e considerando que a energia proveniente do catabolismo do produto foi direcionada para a formação de células (Figuras 4A, 5A e 6A), convencionou-se, no presente trabalho, que o cálculo do fator de conversão de substrato em células ( $Y_{X/S}$ ) seria feito com base, apenas, no total do carboidrato consumido no processo. Assim, conforme mostra a Tabela 3, valores decrescentes de  $Y_{X/S}$  foram obtidos com o incremento da concentração inicial de glicose no meio. Em G40, em que a concentração celular foi idêntica à obtida em G20, mas com consumo duas vezes maior de glicose, o valor de  $Y_{X/S}$  (0,17 g/g) foi sensivelmente menor (65%) que o obtido neste último ensaio. Em G60, como toda glicose foi também consumida, mas a produção de células foi quase 20% menor que nas demais condições, o valor de  $Y_{X/S}$  (0,085 g/g) foi mais de três vezes menor que o obtido em G20.

Um exame dos perfis de variação das concentrações de oxigênio dissolvido (OD) com o tempo indicou que as condições de transferência de oxigênio exerceram um efeito decisivo sobre o metabolismo celular, determinando claramente as diferenças nos resultados encontrados. Independentemente de  $S_0$ , os valores de OD encontravam-se acima de 20% da saturação nas primeiras 9 horas de fermentação (Figuras 4B, 5B e 6B), não havendo, portanto, limitação de oxigênio para o cultivo no intervalo de tempo em que foram calculadas as máximas velocidades específicas de crescimento ( $\mu_m$ ), que foram idênticas nos três ensaios, conforme anteriormente ressaltado. No entanto, foram observadas diferenças nos perfis de consumo de oxigênio após a fase exponencial de crescimento, evidenciadas pelo tempo necessário para que a concentração de oxigênio dissolvido atingisse valores muito próximos ou iguais a zero, bem como pelo intervalo de tempo em que o cultivo permaneceu nesta condição (Figura 11).

Em G20, os valores de OD caíram para cerca de 5% por volta de 12 h, permanecendo assim por, aproximadamente, três horas, quando voltaram rapidamente aos valores iniciais (Figura 4B). Portanto, o consumo completo de glicose, bem como a síntese de ácido e seu subsequente metabolismo, ocorreram em momento anterior ao da medida das menores concentrações de oxigênio no meio de cultivo. As velocidades de formação do produto ( $dP/dt$ ) atingiram valores máximos por volta de 5 h, diminuindo rapidamente nas duas horas seguintes, em

oposição às velocidades de consumo de glicose, que mantiveram-se elevadas neste período. A variação das velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) mostrou perfil ascendente durante o intervalo de maiores  $dP/dt$  e  $dS/dt$ , entre 5 e 8 h, atingindo valores máximos, e aproximadamente constantes, quando já não havia ácido glicônico em solução. Desta forma, como as concentrações de oxigênio dissolvido não eram limitantes e a demanda de oxigênio era constante, pode-se inferir que a energia proveniente do metabolismo respiratório estava associada à utilização de nutrientes complexos do meio de cultivo, direcionados para a formação de novas células. Após 15 h, os valores de  $dX/dt$  diminuíram progressivamente e o cultivo entrou na fase estacionária. Como os valores de OD voltaram rapidamente ao valor inicial (100%), mostrando que a oferta de oxigênio era maior que sua demanda pelo cultivo, especula-se que a entrada na fase estacionária ocorreu em função da escassez de energia para metabolizar as fontes orgânicas no meio. Conforme mostra a Figura 10, as máximas velocidades específicas de formação de produto ( $\mu_{Pm} \approx 8 \text{ h}^{-1}$ ) coincidem com o início da fase de máximas velocidades específicas de crescimento ( $\mu_m$ ), a qual se estendeu por um período maior.

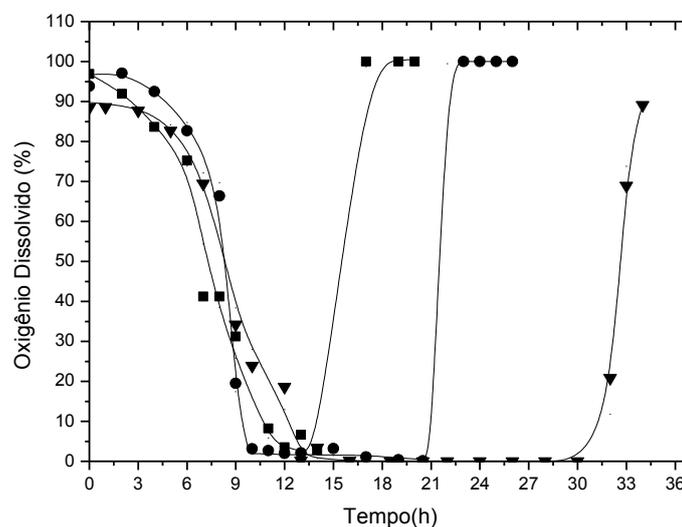


Figura 11 – Oxigênio dissolvido em função do tempo nos ensaios G20 (■), G40 (●) e G60 (▼).

Em G40, a concentração de oxigênio dissolvido caiu para cerca de 3% com aproximadamente 10 h de processo (Figura 5B), momento em que, ao contrário do ocorrido em G20, ainda havia glicose (8,5 g/L) no meio de cultivo (Figura 5A). Os

valores de OD permaneceram muito próximos ou iguais a zero por um longo período (10 horas), englobando, portanto, todo o tempo necessário para consumir o restante da glicose e todo o ácido formado. A fase exponencial de crescimento coincidiu com o intervalo de maiores  $dP/dt$  e  $dS/dt$ , entre 4 e 9 h (Figura 9B), no qual as concentrações de oxigênio dissolvido ainda estavam acima de 10%. Logo depois, porém, os valores de OD caíram para cerca de 3%, o que impactou as velocidades de consumo do ácido, que tiveram valores máximos (medidos entre 12 e 16 h) inferiores aos medidos em G20. A curva de crescimento assumiu perfil linear, mas as velocidades de crescimento foram negativamente afetadas. Com a progressiva diminuição de OD, que chegou a valores nulos por volta de 18 h, houve contínua queda dos valores de  $dS_p/dt$ , acompanhada por redução de  $dX/dt$ , resultando em um patamar na curva  $X=f(t)$ . A partir de 21 h, quando todo o ácido havia sido consumido, as concentrações de oxigênio dissolvido voltaram a subir e atingiram os valores iniciais. Ainda que em menores velocidades, o cultivo retomou o crescimento e só entrou na fase estacionária três horas depois. Desta forma, a exemplo do ocorrido em G20, é provável que ainda houvesse compostos de carbono e nitrogênio no meio, oriundos do extrato de levedura e/ou da peptona, os quais foram utilizados para geração de biomassa neste intervalo da fermentação.

Em G60, os valores de OD caíram para zero por volta das 13 h de processo e permaneceram nulos até o tempo de 30 h (Figura 6B), afetando fortemente os perfis cinéticos do processo. A limitação de oxigênio implicou em redução significativa das velocidades de consumo do açúcar e, conseqüentemente, das velocidades de síntese de ácido glicônico (Figura 9A), prolongando o tempo necessário para esgotamento do açúcar e obtenção das máximas concentrações do produto (Figura 6A), conforme descrito anteriormente. Da mesma forma, a oferta insuficiente de oxigênio influenciou negativamente as velocidades de consumo do composto, que foram inferiores às medidas em G20 e G40, e mesmo havendo um residual elevado do produto no meio, o consumo foi paralisado e o cultivo entrou na fase estacionária. As concentrações de oxigênio voltaram ao patamar inicial e o ácido residual degradado, com concomitante diminuição da concentração celular. Deste modo, pode-se inferir que o composto não foi utilizado para a geração de energia e formação de células.

A Tabela 4 resume os máximos valores das velocidades instantâneas obtidos nos três ensaios, indicando se o cultivo estava limitado (L) ou não (NL) em oxigênio no intervalo em que foram medidas.

Tabela 4 – Máximas velocidades instantâneas de consumo de substrato ( $dS/dt$ ), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ), de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) e de crescimento ( $dX/dt$ ) nos ensaios G20, G40 e G60, com indicação dos níveis de concentrações de oxigênio dissolvido no intervalo em que foram observadas.

	G20		G40		G60	
	OD		OD		OD	
$(dS/dt)_m$ (g/L.h)	4,33	NL	5,04	NL	5,87	NL
$(dP/dt)_m$ (g/L.h)	4,50	NL	3,00	NL	3,50	NL
$(dS_P/dt)_m$ (g/L.h)	4,47	NL	3,33	NL	2,50 (22-27 h)	L
					3,51 (27-31 h)	NL
$(dX/dt)_m$ (g/L.h)	0,71	NL	0,43	NL	0,27	L

L: oxigênio limitado; NL: oxigênio não limitado

São relativamente escassos na literatura os trabalhos que mostram a cinética de fermentação de carboidratos com *G. diazotrophicus*. Da mesma forma, não foram identificadas propostas que visassem o desenvolvimento de processos biotecnológicos destinados à produção de biomassa ou ácido glicônico com a bactéria. Ainda assim, foi possível confrontar alguns aspectos dos perfis cinéticos obtidos nos ensaios G20, G40 e G60 com aqueles mostrados em alguns desses estudos. Stephan *et al.* (1991) cultivou *G. diazotrophicus* PAL 3 em meio mineral com 5 g/L de glicose (meio LGIM), suplementado com 0,132 g/L de  $(NH_2)SO_4$ , a fim de estimular a fixação de nitrogênio (FBN). O pH não foi controlado durante o ensaio e a aeração foi mantida em aproximadamente 0,4 vvm até o tempo de 13 h, sendo drasticamente reduzida (0,01 atm; oxigênio dissolvido = 0%) entre este ponto e o final do processo (34 h), de modo a garantir as condições FBN. Os perfis cinéticos obtidos mostraram que glicose foi consumida em altas velocidades a partir da segunda hora, mas a presença de ácido glicônico no meio apenas começou a ser detectada quando a concentração do açúcar atingiu 1,26 g/L, em 10 h. Neste intervalo, foram verificadas baixas velocidades de crescimento e queda da concentração de oxigênio dissolvido para cerca de 10% da saturação. O aumento na

concentração de ácido foi acompanhado por aumento expressivo das velocidades de crescimento e a curva  $X=f(t)$  assumiu um perfil linear, mantido durante todo o período de formação do produto, a qual atingiu um máximo em 12 h, e de seu consumo (16 h). A cinética de consumo de íons  $\text{NH}_4^+$  evidenciou consumo total desta fonte de nitrogênio até 13 h, indicando que a partir deste momento a única fonte de nitrogênio utilizada pelo cultivo para a geração de novas células foi o nitrogênio atmosférico ( $\text{N}_2$ ). O pH, que caiu de 5,5 para 2,5 nas primeiras 13 horas, manteve-se neste valor até o fim do processo, mas os autores ressaltam que obtiveram perfis cinéticos similares em processo fermentativo realizado com pH controlado em 6,0. Embora não seja adequada uma comparação direta entre os resultados obtidos no presente trabalho com os de Stephan *et al.* (1991), em virtude das diferenças na composição do meio de cultivo e nas condições operacionais empregadas, destaca-se o resultado diverso em relação à cinética de formação de ácido glicônico e de crescimento. Diferentemente dos autores, que verificaram o acúmulo deste produto somente após ter havido consumo de 75% da glicose inicial, os dados obtidos em G20, G40 e G60 mostram que a síntese do composto ocorreu simultaneamente ao metabolismo da glicose, desde as primeiras horas de fermentação. Além disso, a fase linear de crescimento (com máximos  $dX/dt$ ) foi iniciada apenas após a obtenção da máxima concentração de ácido, ficando claramente evidenciada no período correspondente ao do consumo do produto formado. Em G20, no momento em que as velocidades de produção de ácido foram intensificadas ( $t \cong 4$  h), apenas 30% da glicose inicial havia sido consumida, e em G40 e G60, esse percentual foi ainda menor ( $\cong 15\%$ ).

O perfil cinético obtido por Attwood *et al.* (1991), em trabalho voltado aos aspectos do metabolismo de glicose por *G. diazotrophicus* PAL 5, apresenta maior similaridade com aqueles obtidos nos ensaios G20 e G40. Os autores empregaram um meio mineral distinto ao usado por Stephan *et al.* (1991), contendo apenas 2,6 g/L de glicose, mas com uma concentração de sulfato de amônio expressivamente maior (3,0 g/L). A fermentação foi realizada em sistema descontínuo, com variação livre do pH e com concentração de oxigênio dissolvido controlada para valores superiores a 75%. A curva de crescimento apresentou um perfil bifásico, segundo terminologia utilizada pelos autores, sendo a primeira delas correspondente a intensa produção de ácido glicônico, que atingiu o máximo quando aproximadamente 85% da glicose inicial havia sido consumida. Neste intervalo, o pH

caiu de 5,6 para aproximadamente 3,5 e o crescimento celular foi lento. A partir deste ponto, que marcou o início da segunda fase, a glicose residual continuou a ser consumida em menor velocidade, e quando estava praticamente esgotada, teve início o consumo de ácido glicônico produzido, com aumento visível das velocidades de crescimento e começo do perfil linear da curva  $X=f(t)$ . Desta forma, apesar também das diferenças entre as condições empregadas no trabalho e aquelas do atual estudo, verificou-se semelhança na cinética da fermentação. Houve uma primeira etapa de máximas velocidades de consumo de glicose e de formação de produto, com baixas velocidades de crescimento, seguida de uma segunda etapa em que o crescimento assumiu um perfil linear, simultaneamente ao período de consumo do ácido formado. Acredita-se que foram justamente as condições não limitantes de oxigênio, utilizadas pelos autores no trabalho, as que permitiram tal comportamento, a exemplo do que ocorreu em G20 e G40.

O mesmo perfil bifásico foi descrito por Galar e Boiardi (1995), que cultivaram a bactéria em meio idêntico ao empregado por Stephan *et al.* (1991). Cerca de 90% da glicose inicial (3,8 g/L) foram consumidos com 10 horas de cultivo, produzindo quantidade equivalente de ácido glicônico, mas sem aumento significativo de biomassa. Conforme mostra a cinética apresentada pelos autores, a fase linear de crescimento acompanhou todo o período relativo à utilização do ácido como substrato.

Os estudos citados acima, bem como diversos outros realizados com *G. diazotrophicus* a partir de sua descoberta, por Cavalcante e Dobereiner (1988), foram, em sua maioria, destinados à caracterização metabólica e fisiológica da bactéria, com ênfase no metabolismo de carbono e nitrogênio, sobretudo em condições de fixação de nitrogênio (Stephan *et al.*, 1991; Attwood *et al.*, 1991; Alvarez e Martínez-Drets, 1995; Galar e Boiardi, 1995; Flores-Encarnación, 1999; Luna *et al.*, 2002, 2002, 2006). Com o emprego de sistemas de fermentação com menores opções de controle (frascos agitados) ou com maior sofisticação operacional (biorreatores de bancada), os autores obtiveram respostas fundamentais em relação aos aspectos da fisiologia da bactéria, mimetizando ou não condições de diazotrofia durante o cultivo.

*G. diazotrophicus* oxida glicose a ácido glicônico por duas rotas distintas. A principal delas ocorre no espaço periplasmático, em reação catalisada por uma enzima PQQ-GDH ligada à membrana (Stephan *et al.*, 1991; Attwood *et al.*, 1991;

Galar e Boiardi, 1995; Alvarez e Martínez-Drets, 1995; Luna *et al.*, 2000, 2006; Lery *et al.*, 2008). A outra rota, mediada por NAD-GDH, ocorre no citoplasma bacteriano, onde a enzima se encontra solubilizada (Alvarez e Martínez-Drets, 1995; Luna *et al.*, 2000, 2006). Independentemente da via de oxidação, o ácido glicônico é majoritariamente catabolizado pela via das pentoses-fosfato (HMP) (Attwood *et al.*, 1991; Alvarez e Martínez-Drets, 1995) e, na sequência, no ciclo dos ácidos tricarbóxicos (Alvarez e Martínez-Drets, 1995; Luna *et al.*, 2000, 2006). Mas, pela ação de outras enzimas ligadas à cadeia respiratória, ácido glicônico pode ser reversivelmente oxidado aos ácidos 2 e 5-cetoglicônicos, que, por sua vez, podem ser irreversivelmente convertidos em ácido 2,5-dicetoglicônico (Stephan *et al.*, 1991; Alvarez e Martínez-Drets, 1995; Luna *et al.*, 2006; Molinari e Boiardi, 2013). Embora em menor intensidade, glicose pode ser previamente fosforilada pela enzima hexoquinase e entrar diretamente na via HMP para a geração de energia (Attwood *et al.*, 1991; Alvarez e Martínez-Drets, 1995; Lery *et al.*, 2008).

A respiração é uma importante característica da fisiologia de *G. diazotrophicus*, estando associada à formação de energia (ATP) pela fosforilação oxidativa de PQQH<sub>2</sub> e NADH, gerados nas reações de oxidação de gliconato, via PQQ-GDH e via HMP/Ciclo de Krebs, respectivamente (Stephan *et al.*, 1991; Attwood *et al.*, 1991; Luna *et al.*, 2000, 2002). De acordo com Flores-Encarnación *et al.* (1999), a bactéria possui uma das mais altas taxas de respiração conhecidas e tem provavelmente a habilidade de ajustar o consumo de oxigênio a uma ampla variação do suprimento de oxigênio para o meio. De fato, altos níveis de consumo de oxigênio foram verificados durante seu cultivo em glicose ou gliconato, sob condições aeróbicas (Alvarez e Martínez-Dretz, 1995; Tejera *et al.*, 2004; Flores-Encarnación *et al.*, 1999).

Conforme resumidamente apresentado na Tabela 4, o aumento de S<sub>0</sub> implicou no aumento das velocidades de consumo de glicose e diminuição das velocidades de formação de ácido glicônico. Como não havia limitação de oxigênio durante o intervalo de medida de (dS/dt)<sub>m</sub> e (dP/dt)<sub>m</sub>, o metabolismo respiratório estava plenamente ativo e a energia gerada foi direcionada para o crescimento, resultando em uma fase exponencial, no mesmo intervalo de tempo, com máximas velocidades específicas de crescimento análogas (Tabela 3). Não é possível afirmar se havia predominância da atividade de uma das enzimas responsáveis pela oxidação da glicose, PQQ-GDH ou NAD-GDH. No entanto, como não houve aumento

proporcional dos valores de  $Y_{P/S}$  (Tabela 3), indicando que em nenhum dos casos a glicose foi totalmente direcionada para a formação de ácido glicônico, é provável que, neste intervalo, uma parcela do carboidrato tenha sido metabolizada diretamente na via HMP, gerando parte da energia necessária para formação de biomassa. Ao estudar a regulação das duas enzimas envolvidas na oxidação da glicose, Luna *et al.* (2006) constataram que o metabolismo ocorre principalmente através da PQQ-GDH, particularmente sob condições de alta demanda energética, como diazotrofia e/ou limitação de carbono no meio, tanto em contínuo quanto em batelada. Entretanto, a atividade de NAD-GDH é dependente das condições de crescimento. Em cultivo contínuo, a enzima foi sintetizada independentemente da fonte de carbono (glicose e gliconato) e nitrogênio ( $N_2$  ou  $NH_3$ ) e quanto maior a concentração de glicose, maior a sua síntese. Em sistema descontínuo, ao contrário, foram observadas baixas atividades da enzima, tanto sob FBN quanto não-FBN. A atividade de PQQ-GDH, por outro lado, foi três vezes maior na fase *lag* que na fase linear de crescimento, em condições de não diazotrofia.

Flores-Encarnación *et al.* (1999) verificaram que no cultivo da bactéria em sistema descontínuo em meio mineral com glicose e sulfato de amônio, portanto sem FBN, o aumento da aeração resultou no aumento da demanda de oxigênio, da velocidade de crescimento e da biomassa. Quando o mesmo cultivo passou a utilizar nitrogênio atmosférico, pelo esgotamento de amônio no meio e limitação das concentrações de oxigênio dissolvido, que permaneceram em zero, houve aumento da acidificação do meio com o aumento da aeração. Segundo os autores, a intensa oxidação da glicose a ácido glicônico pela glicose desidrogenase forneceu condições metabólicas apropriadas para gerar suficiente ATP para o crescimento e remover continuamente o oxigênio do meio de forma a proteger a atividade da enzima nitrogenase.

Em G20 e G40, após a fase exponencial de crescimento, o ácido glicônico passou a ser o substrato, e o cultivo entrou na fase linear de crescimento, com máximos  $dX/dt$ . Mas, como em G40 o consumo do produto ocorreu em menor velocidade, infere-se que as baixas concentrações de oxigênio dissolvido verificadas durante este intervalo tenham comprometido as vias de obtenção de energia, reduzindo as velocidades de crescimento e a produção de biomassa. Mesmo que uma maior concentração de ácido tenha sido obtida, a energia gerada parece não ter sido suficiente para maior aproveitamento dos nutrientes complexos e formação

adicional de biomassa, cuja concentração final foi idêntica a de G20 (Tabela 3).

Em G60, diferentemente dos outros ensaios, parte da fase linear de crescimento ocorreu concomitantemente com o consumo de glicose e de formação de ácido glicônico, em período de evidente limitação de oxigênio dissolvido no meio (Figura 6A e 6B). Em consequência, houve queda acentuada de  $dS/dt$  e  $dP/dt$ , resultando no menor  $(dX/dt)_m$ . Como as concentrações de ácido permaneceram aproximadamente constantes neste intervalo, a energia para o crescimento foi gerada, aparentemente, pelas reações de oxidação de glicose e o rendimento energético foi suficiente para manter constante a velocidade de crescimento. Com o esgotamento da glicose e manutenção das condições limitantes de oxigênio, a oxidação do ácido ocorreu também em menor velocidade, mas a energia foi igualmente suficiente para manter a mesma velocidade de crescimento e prolongar a fase linear. No entanto, este perfil foi interrompido antes que todo o ácido tenha sido catabolizado, e a entrada na fase estacionária de crescimento foi acompanhada de aumento das concentrações de oxigênio dissolvido, indicando paralisação do metabolismo respiratório. Este resultado, sugere que o ácido glicônico metabolizado neste intervalo pode ter sido convertido em ácido 2 ou 5 cetoglicônico, e, na sequência, em 2,5-dicetoglicônico. Mesmo que o método utilizado para análise não tenha permitido a separação entre ácido glicônico e estes cetoácidos, o escurecimento do meio de fermentação, observado nas horas finais de cultivo, indica que havia a presença de ácido 2,5-dicetoglicônico. Attwood *et al.* (1991) descreveram o mesmo fenômeno em cultivo de *G. diazotrophicus* em que foram detectadas quantidades significativas de ácido 2-cetoglicônico no sobrenadante, atribuindo o aparecimento de coloração escura do meio à formação de ácido 2,5-dicetoglicônico. Alvarez e Martínez-Dretz (1995) também relataram que o aparecimento de um pigmento marrom é típico em culturas *G. diazotrophicus* e está associado à formação do ácido 2,5 dicetoglicônico.

Segundo Luna *et al.* (2006), os cetoácidos são produzidos no final da fase linear, apenas em condições de excesso de carbono. Molinari e Boiardi (2013) também observaram que o ácido glicônico foi oxidado a ácidos cetoglicônicos na fermentação de sacarose com a bactéria. A formação destes compostos ocorreu na fase estacionária do crescimento bacteriano, indicando, segundo os autores, que a oxidação do gliconato pela gliconato desidrogenase não está ligada a geração de energia disponível para o crescimento.

Conforme descrito anteriormente, o rendimento em biomassa ( $Y_{X/S}$ ) decresceu com o incremento da concentração inicial de glicose no meio (Tabela 3). O maior valor obtido (0,28 g/g), no ensaio G20, foi exatamente igual ao máximo encontrado por Attwood *et al.* (1991) no cultivo da mesma bactéria em fermentação contínua com diferentes vazões específicas de alimentação (D), pH 3,5 e concentração de oxigênio dissolvido acima de 75% da saturação. Os valores de  $Y_{X/S}$  decresceram com a diminuição dos valores de D. O meio empregado no referido trabalho não continha fontes complexas de nitrogênio, mas 3,0 g/L de sulfato de amônio. Os autores calcularam o coeficiente de manutenção ( $m_S$ ) para a bactéria, ressaltando que o mesmo ( $1,0 \text{ mM.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) é maior do que o de outras bactérias aeróbicas, o que justificava os baixos valores de  $Y_{X/S}$ .

Luna *et al.* (2000) obtiveram valores de  $Y_{X/S}$  na faixa de 0,13 a 0,23 g/g em fermentação contínua utilizando meio mineral (LGIM) com glicose ou gliconato como fonte de carbono. Nos ensaios realizados em condições não diazotróficas, sulfato de amônio foi adicionado como fonte de nitrogênio (2,5 g/L) e a concentração de oxigênio dissolvido foi mantida acima 20% da saturação. Neste caso, o rendimento em biomassa não foi significativamente afetado pela natureza da fonte de carbono, obtendo-se  $Y_{X/S}$  de 0,23 g/g (glicose) e 0,19 g/g (gliconato). Por outro lado, sob FBN os valores de  $Y_{X/S}$  foram inferiores, independentemente da fonte de carbono. Com glicose, os rendimentos foram muito menos afetados pela FBN, mas com gliconato o valor de  $Y_{X/S}$  foi mais de 30% menor do que o obtido com sulfato de amônio (não-FBN). Com FBN e gliconato, as velocidades específicas de respiração ( $Q_{O_2}$ ) foram mais elevadas que em todas as demais condições, ao contrário de culturas com glicose, em que valores similares de  $Q_{O_2}$  foram obtidos em FBN e não-FBN. De acordo com os autores, como a velocidade específica de respiração é uma medida da energia requerida para a síntese de biomassa, com glicose e sob FBN, o cultivo usou quantidades similares de energia para produzir biomassa e fixar nitrogênio, ao passo que, com culturas com glicose e não-FBN, a mesma quantidade de energia foi usada apenas para produzir biomassa.

Em cultivos em que glicose foi substituída por sacarose no meio LGIM, Molinari e Boiardi (2013) também verificaram decréscimo significativo dos rendimentos em biomassa quando o processo foi realizado em condições de fixação de nitrogênio. Com  $S_0$  de 20 g/L,  $Y_{X/S}$  foi de 0,079 g/g, enquanto sob condições não-FBN (meio com 3,0 g/L de sulfato de amônio e  $DO > 15\%$ ), esse valor subiu para 0,18 g/g.

O pH do meio é outra variável de processo que exerce forte influencia sobre a conversão de glicose em células. Em sistema contínuo e sob diazotrofia, usando meio LGIM, Luna e Boiardi (2008) obtiveram os maiores valores de  $Y_{X/S}$  ( $\cong 0,16$  g/g) em pH entre 5,0 e 6,5. Rendimentos menores foram verificados em pH na faixa 2,5-4,5 (0,10-0,11 g/g) e 7- 7,5 (0,12 g/g). Os máximos valores de  $Y_{X/S}$  coincidiram com a atividade ótima de PQQ-GDH. Em condições ácidas, embora presente em altas quantidades, a enzima não foi totalmente expressa, e com pH acima de 7,5 a enzima foi praticamente inativada. Os autores destacaram que, em cultivo em batelada, o rendimento em biomassa caiu pela metade em pH inicial de 3,5 e nenhum crescimento foi observado em pH inicial de 7,5.

O maior rendimento em ácido glicônico (67,5%), obtido com  $S_0$  de 60 g/L (Tabela 3), é apenas 10% menor que o encontrado por Attwood *et al.* (1991) em cultivo descontínuo de *G. diazotrophicus* em meio contendo 2,7 g/L de glicose. No entanto, a produtividade volumétrica em produto ( $Q_P$ ) obtida pelos autores (0,14 g/L.h) foi expressivamente menor que a alcançada em G60 (2,45 g/L.h). Utilizando concentração de glicose de 150 g/L, os autores obtiveram concentração de produto 140 g/L e um significativo ganho no valor de  $Q_P$  (8 g/L.h). Considerando que as condições operacionais comprometeram o desempenho do cultivo em G60, é possível que a conversão de glicose em ácido ainda possa ser melhorada com o emprego de concentração similar de glicose.

As máximas concentrações de células obtidas nos ensaios realizados (6,6 g/L) são expressivamente mais elevadas que as reportadas na literatura no cultivo de *G. diazotrophicus* em glicose. No entanto, na maioria destes estudos a fonte de nitrogênio empregada no meio, quando não o  $N_2$ , foi sulfato de amônio. A concentração deste sal influencia tanto a velocidade quanto a concentração de biomassa (Stephan *et al.*, 1991), desempenhando papel determinante na expressão dos componentes respiratórios da bactéria (Flores-Encarnación *et al.*, 1999). Porém, o emprego adicional de fontes orgânicas de nitrogênio, como extrato de levedura e peptona, tem se mostrado essencial para o incremento da formação de biomassa neste processo fermentativo (Tejera *et al.*, 2004; Boniolo *et al.*, 2009; Molinari e Boiardi, 2013), havendo evidência da incorporação de compostos de carbono, provenientes destes nutrientes para esta finalidade. Aminoácidos como asparagina, ácido aspártico, glutâmico, glutamina e triptofano afetaram positivamente o crescimento da bactéria, quando utilizados na formulação do meio de cultivo com

sulfato de amônio (Tejera *et al.*, 2004). A presença de 12 diferentes vias para o metabolismo de aminoácidos foi confirmada em amplo estudo de proteômica da bactéria (Lery *et al.*, 2008).

#### **4.2 - Fermentação em meios com concentrações iniciais crescentes de glicose e com controle da concentração de oxigênio dissolvido**

Os resultados obtidos nos ensaios do Grupo I mostraram que as condições de aeração utilizadas no processo influenciaram fortemente o desempenho do cultivo, sobretudo com o emprego de uma concentração inicial de glicose da ordem de 60 g/L, em que ficou evidente a ocorrência de limitação de oxigênio para a biomassa bacteriana. Dessa forma, em um segundo grupo de ensaios (Grupo II), as condições de aeração foram alteradas de modo a garantir que a concentração de oxigênio dissolvido (OD) no meio fosse mantida em cerca de 20% da saturação durante todo o processo, buscando garantir que os valores de OD ficassem acima da concentração crítica para a bactéria. Além de reavaliar a fermentação em meios com 40 e 60 g/L, dois valores mais elevados de  $S_0$  (80 e 120 g/L) foram também testados. Os ensaios realizados nestas condições operacionais foram denominados G40\*, G60\*, G80\* e G120\*, respectivamente.

Conforme mostram as Figuras 12 a 22, foram observadas todas as características cinéticas exibidas pelo cultivo nos ensaios do Grupo I. No entanto, a análise comparativa inicial entre os resultados dos ensaios G40\* e G60\* e aquele observado em G40 e G60, respectivamente, não só comprova a influência determinante do suprimento de oxigênio sobre o desenvolvimento da fermentação, como demonstra, pela primeira vez, seu efeito quantitativo sobre os principais parâmetros do processo. Em ambos os ensaios, a consequência imediata do controle de OD ficou evidenciada nos valores das máximas velocidades de consumo de substratos, de síntese de produto e de crescimento, todas superiores às obtidas nos casos de limitação de oxigênio (G40 e G60), impactando de forma clara, e positiva, os parâmetros de fermentação. Na Tabela 5 são resumidos os dados gerais obtidos nas quatro ensaios.

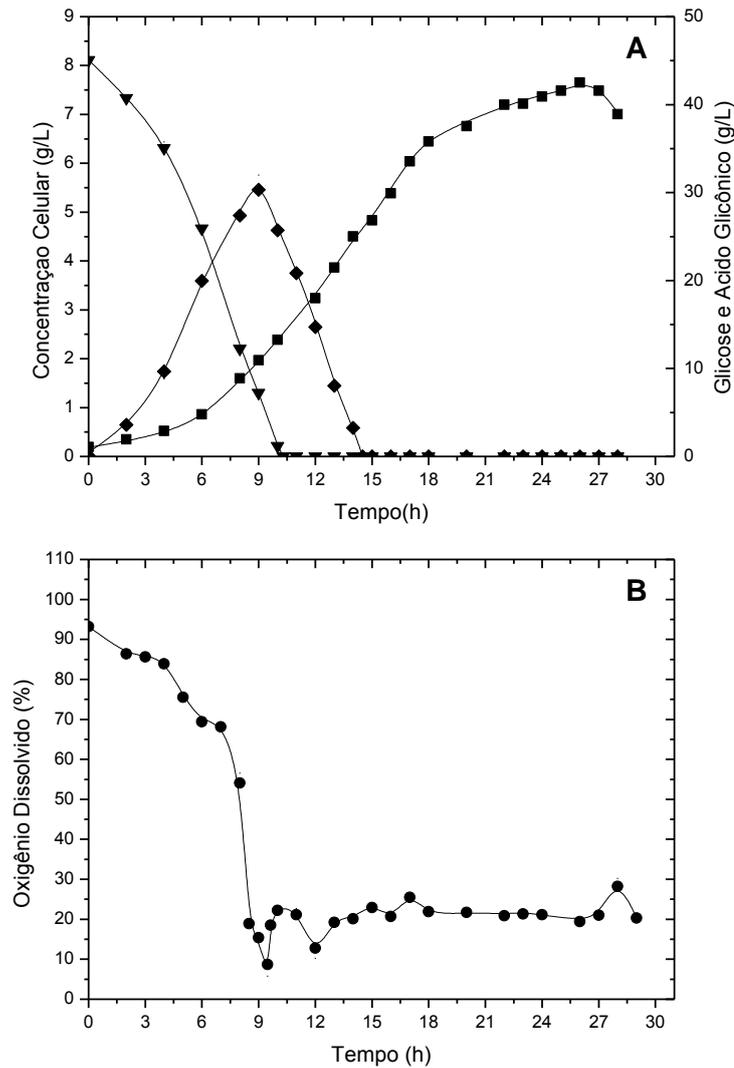


Figura 12 – Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G40\*.

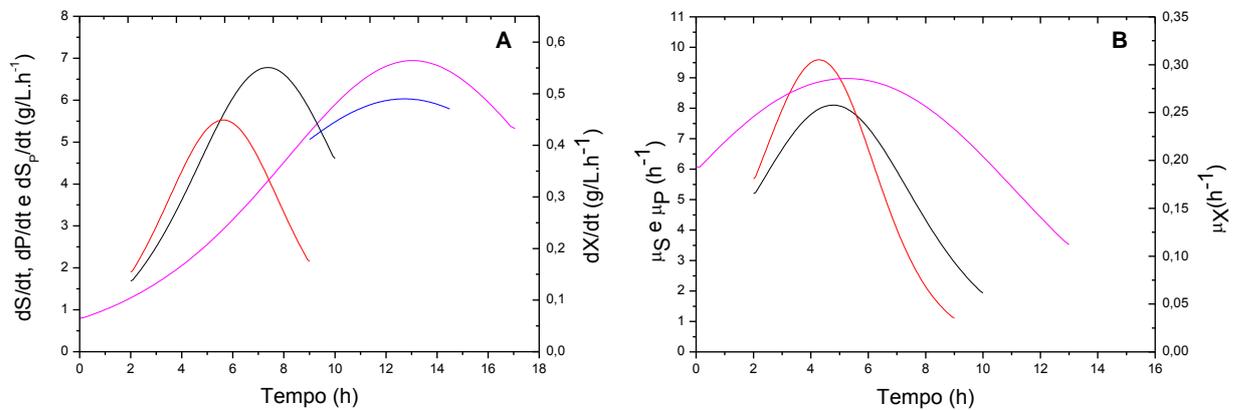


Figura 13 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_p/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G40\*.

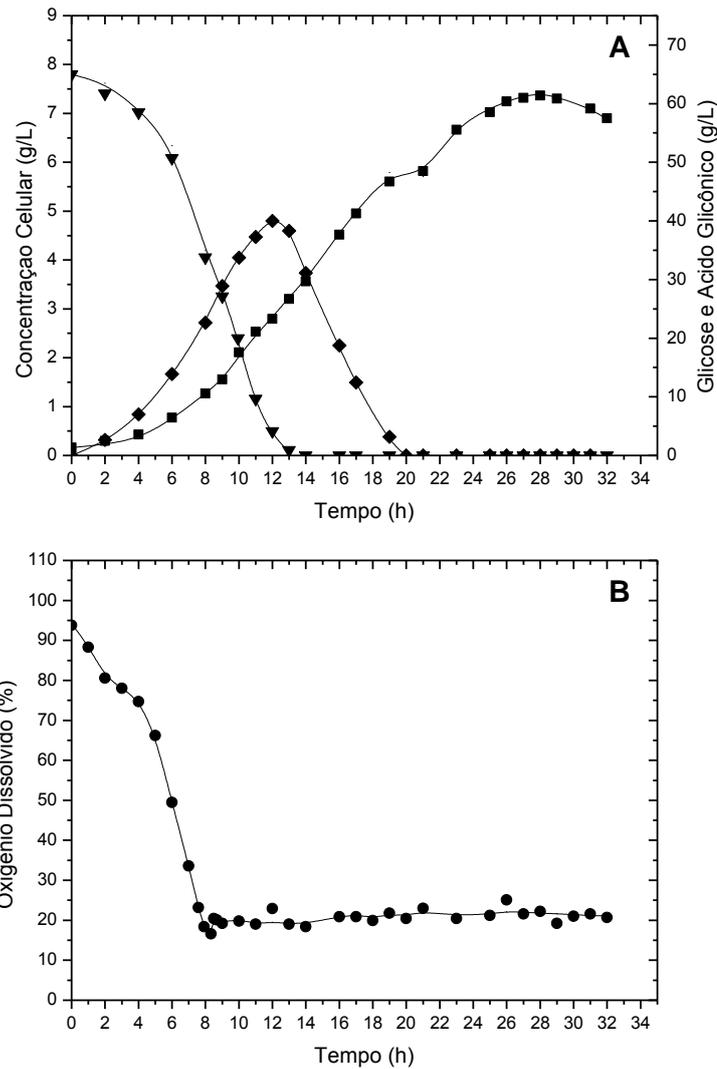


Figura 14 – Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G60\*.

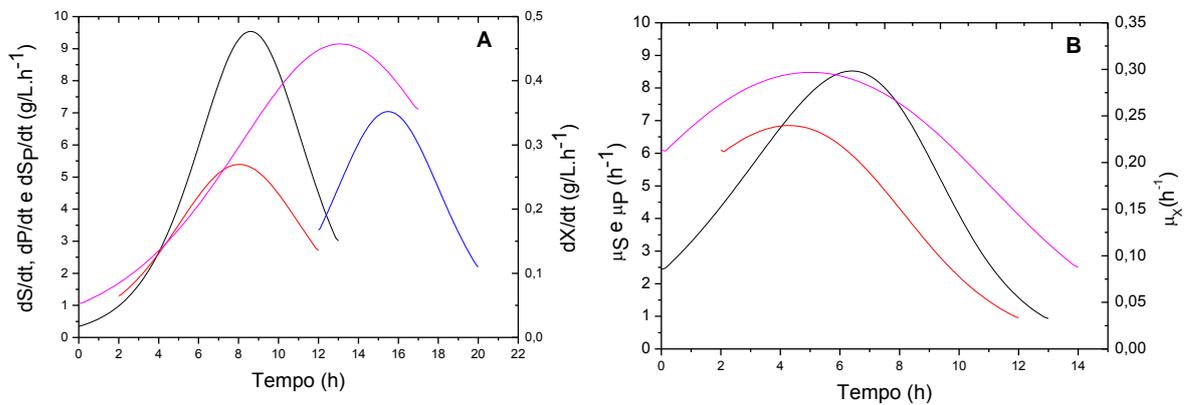


Figura 15 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G60\*.

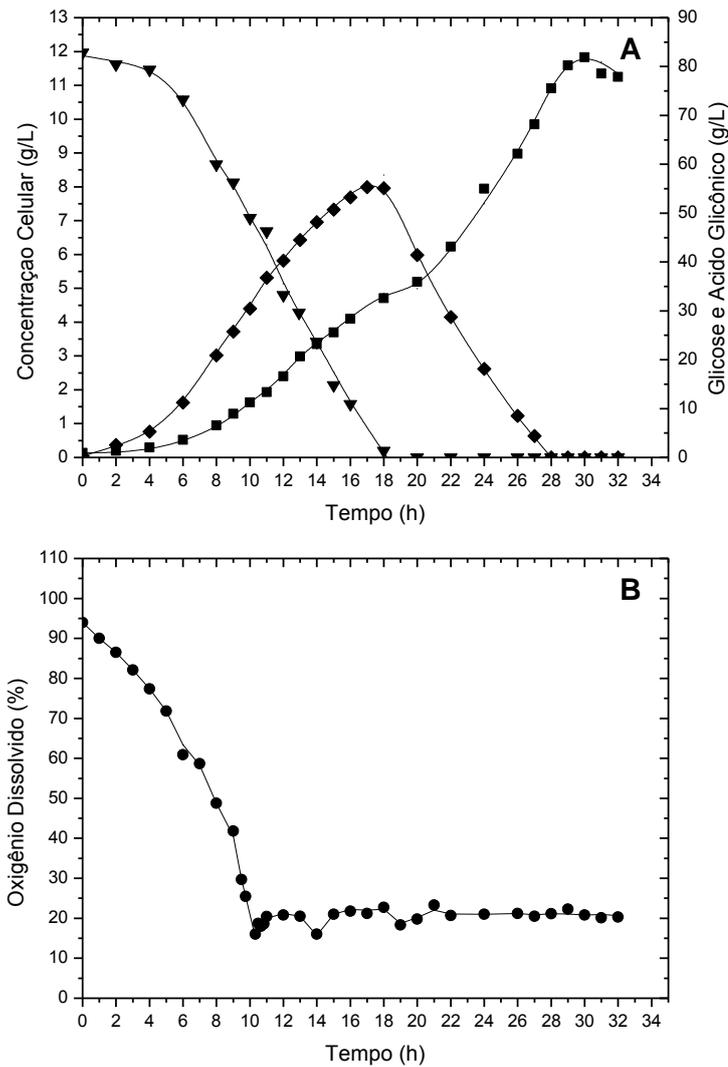


Figura 16 – Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (●) [B] em função do tempo no ensaio G80\*.

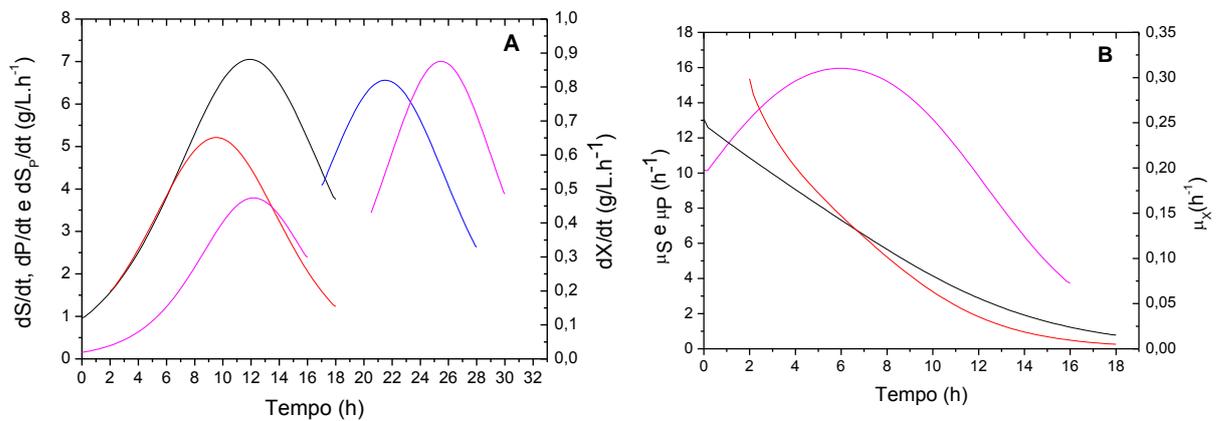


Figura 17 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G80\*.

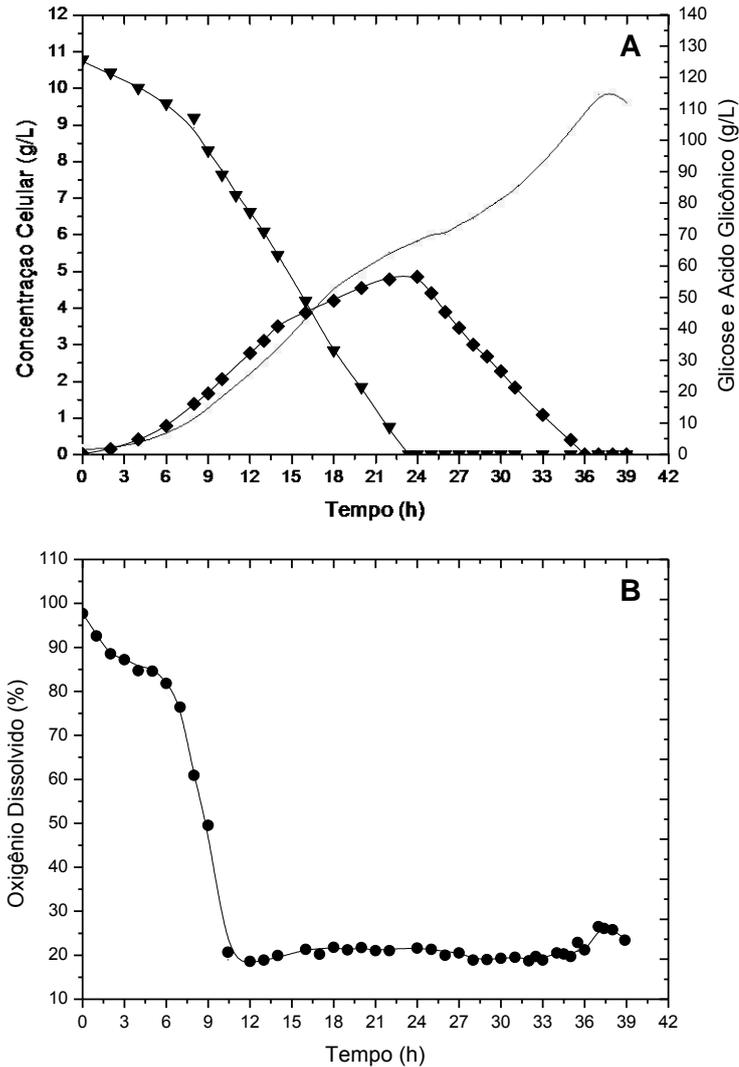


Figura 18 – Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G120\*.

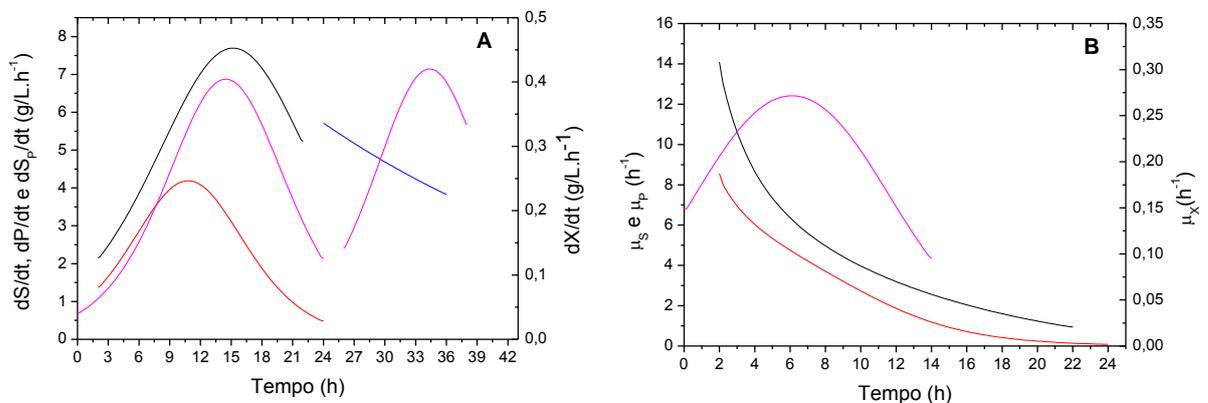


Figura 19 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G120\*.

Tabela 5 - Parâmetros gerais do cultivo de *G. diazotrophicus* PAL5 em meio GDS<sub>2N</sub> com concentrações iniciais crescentes de glicose de aproximadamente 40, 60, 80 e 120 g/L e concentração de oxigênio dissolvido controlada em 20% da saturação (Ensaio G40\*, G60\*, G80\* e G120\*, respectivamente).

Parâmetro	Ensaio			
	G40*	G60*	G80*	G120*
$t_f$ (h)	28	32	33	39
$t_{x_m}$ (h)	25,9	27,7	29,8	37,5
$t_{p_m}$ (h)	8,9	12	17	22,5
$X_m$ (g/L)	7,4	7,2	11,6	9,7
$S_0$ (g/L)	45	64,0	82,0	124,8
$\Delta S$ (g/L)	45	64,0	82,0	124,8
$P_m$ (g/L)	30,3	39,8	55,5	56,7
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,17	0,11	0,14	0,077
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,67	0,62	0,68	0,45
R (%)	73	67,5	74,1	49
$Q_x$ (g/L.h)	0,29	0,26	0,39	0,26
$Q_p$ (g/L.h)	3,4	3,32	3,26	2,52
$\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )	0,30	0,30	0,31	0,28

$t_f$  - Tempo total de fermentação;  $t_{x_m}$  - tempo para obtenção da máxima concentração celular;  $t_{p_m}$  - tempo para obtenção da máxima concentração de ácido glicônico;  $X_m$  - diferença entre a concentração celular em  $t_{x_m}$  e no início do cultivo;  $S_0$  - concentração inicial de glicose;  $\Delta S$  = total de glicose consumida;  $P_m$  - máxima concentração de produto;  $Y_{X/S}$  - fator de conversão de substrato em células;  $Y_{P/S}$  - fator de conversão de glicose em ácido glicônico; R - rendimento em ácido glicônico;  $Q_x$  - produtividade em células;  $Q_p$  - produtividade em produto;  $\mu_m$  - máxima velocidade específica de crescimento.

Na Figura 20, que mostra conjuntamente os resultados de G40\* e G40, é possível visualizar, de modo mais claro, as diferenças nos perfis cinéticos dos dois ensaios, e comprovar a alta sensibilidade da bactéria às concentrações de oxigênio dissolvido no meio. Em G40\* foram verificados valores máximos de  $dS/dt$  cerca de 11% maior (6,51 g/L.h) que em G40, enquanto os valores máximos de  $dP/dt$  (5,42 g/L.h) tiveram um incremento de 83%, resultando em concentração final de ácido glicônico de 30,3 g/L, o que corresponde a um aumento de 56% na produção e 35% no rendimento. As máximas velocidades de consumo do produto também aumentaram na mesma proporção ( $dS_p/dt=5,97$  g/L.h) e, neste contexto, houve

aumento de 23% nas máximas velocidades de crescimento ( $dX/dt=0,53$  g/L.h) e de 12% na concentração celular final (7,4 g/L) (Tabela 5). Como o tempo para atingir  $X_m$  foi um pouco maior (25,9 h), o valor de  $Q_x$  (0,29 g/L.h) foi similar ao de G40 (Tabela 3). Da mesma forma, como o total de glicose consumida foi ligeiramente maior, o aumento da concentração celular não implicou no aumento do fator de conversão de substrato em células, que foi idêntico ( $Y_{X/S}=0,17$  g/g). Com relação à formação de ácido glicônico, o aumento da concentração final do produto, com tempo expressivamente menor ( $t_{Pm}=8,9$  h), resultou no aumento significativo (82%) da produtividade em produto ( $Q_p=3,4$  g/L.h).

Embora na discussão dos dados obtidos em G40 (item 4.2.1) tenha-se admitido que valores de OD abaixo de 20% não eram limitantes para o cultivo, no intervalo de medida de máximos  $dS/dt$  e  $dP/dt$ , os perfis verificados em G40\* mostram o contrário. Neste ensaio, todo o processo relativo à síntese do produto foi francamente favorecido, verificando-se aumento de  $P_m$ , R e  $Q_p$ , o que só pode ser atribuído às altas concentrações de oxigênio, que também favoreceu as velocidades de consumo do produto formado, levando ao aumento da produção de células. Como, no entanto, esse incremento não foi proporcional ao aumento de  $P_m$ , e não houve melhora de  $Q_x$  e  $Y_{X/S}$ , é possível que parte da energia gerada na oxidação do ácido glicônico tenha sido direcionada para outras funções celulares, como manutenção, mobilidade e transporte (Pelczar *et al.*, 1996). A redução das velocidades de crescimento a partir de 16 h de processo (Figura 12A) também evidencia a provável escassez de energia neste intervalo do processo.

Comparando-se os resultados obtidos em G60\* com os de G60 (Figura 21), verificaram-se, em alguns casos, diferenças ainda mais acentuadas. Houve aumento de 41% em  $dS/dt$  (9,05 g/L.h), com impacto positivo sobre  $dP/dt$  (5,19 g/L.h), que teve aumento de 30%. A concentração máxima de ácido foi similar, resultando em rendimento idêntico, mas a grande diminuição (42%) do tempo de produção ( $t_{Pm}$ ) implicou em aumento de 35,5% na produtividade volumétrica em produto ( $Q_p=3,32$  g/L.h). O consumo do ácido formado ocorreu com velocidades máximas quase duas vezes maior ( $dS_p/dt=6,80$  g/L.h), reduzindo significativamente o tempo total para consumo do produto. Nestas condições, as máximas velocidades de formação de células foram significativamente aumentadas (63%), com incremento de 26% na concentração celular final e 29% no fator de conversão de substrato em

células ( $Y_{X/S}$ ). Como o tempo para obtenção de  $X_m$  foi similar, a produtividade em células também foi favorecida (30% maior).

As melhores condições de aeração em G60\* exerceram, portanto, uma influência ainda mais expressiva sobre o perfil cinético da fermentação, que foi totalmente distinto ao obtido em G60. Diferentemente ao verificado neste último ensaio, em G60\* a glicose foi integralmente consumida em condições não limitadas em oxigênio, o que permitiu uma melhora importante da produtividade volumétrica em produto. E embora tenha sido produzida uma concentração similar do composto, a sua oxidação ocorreu com o dobro da velocidade, gerando quantidade de energia suficiente para maior aproveitamento das fontes de carbono e nitrogênio e formação de biomassa, com incremento dos parâmetros  $Y_{X/S}$  e  $Q_x$ . Da mesma forma que em G60, a fase linear teve início durante o período de consumo de glicose para síntese de ácido glicônico. Porém, de forma distinta, esta fase terminou em momento posterior ao completo metabolismo do composto, confirmando que a energia gerada foi direcionada para a formação de células, não havendo, aparentemente, desvio deste substrato para a formação dos ácidos 2 ou 5-cetoglicônico, conforme verificado em G60.

Da mesma forma que nos ensaios do Grupo I, a cinética de crescimento encontrada nos ensaios G40\* e G60\* se assemelha àquela verificada por Attwood *et al.* (1991) no cultivo de *G. diazotrophicus* em glicose e sem limitação de oxigênio no meio, em que as máximas velocidades de crescimento foram verificadas no período de máximas velocidades de consumo do ácido formado.

A natureza oxidativa do metabolismo de glicose pela bactéria foi, conforme mencionado anteriormente, comprovada por diferentes autores (Stephan *et al.*, 1991; Alvarez e Martínez-Dretz, 1995; Flores-Encarnación *et al.* (1999); Luna *et al.*, 2000, 2002). Porém, como também indicado no início da apresentação dos resultados deste grupo de ensaios, não foram encontradas referências que mostrem dados quantitativos que permitam uma comparação com o presente trabalho. Flores-Encarnación *et al.* (1999) ilustraram o efeito positivo do aumento do  $k_L a$  sobre a cinética de crescimento, bem como sobre as velocidades de formação de ácido, medida indiretamente pela variação do pH ao longo da fermentação de glicose com a bactéria. No entanto, a evolução da concentração de células foi quantificada indiretamente, por turbidimetria, não tendo sido apresentado nenhum dado específico sobre qualquer parâmetro quantitativo do processo.

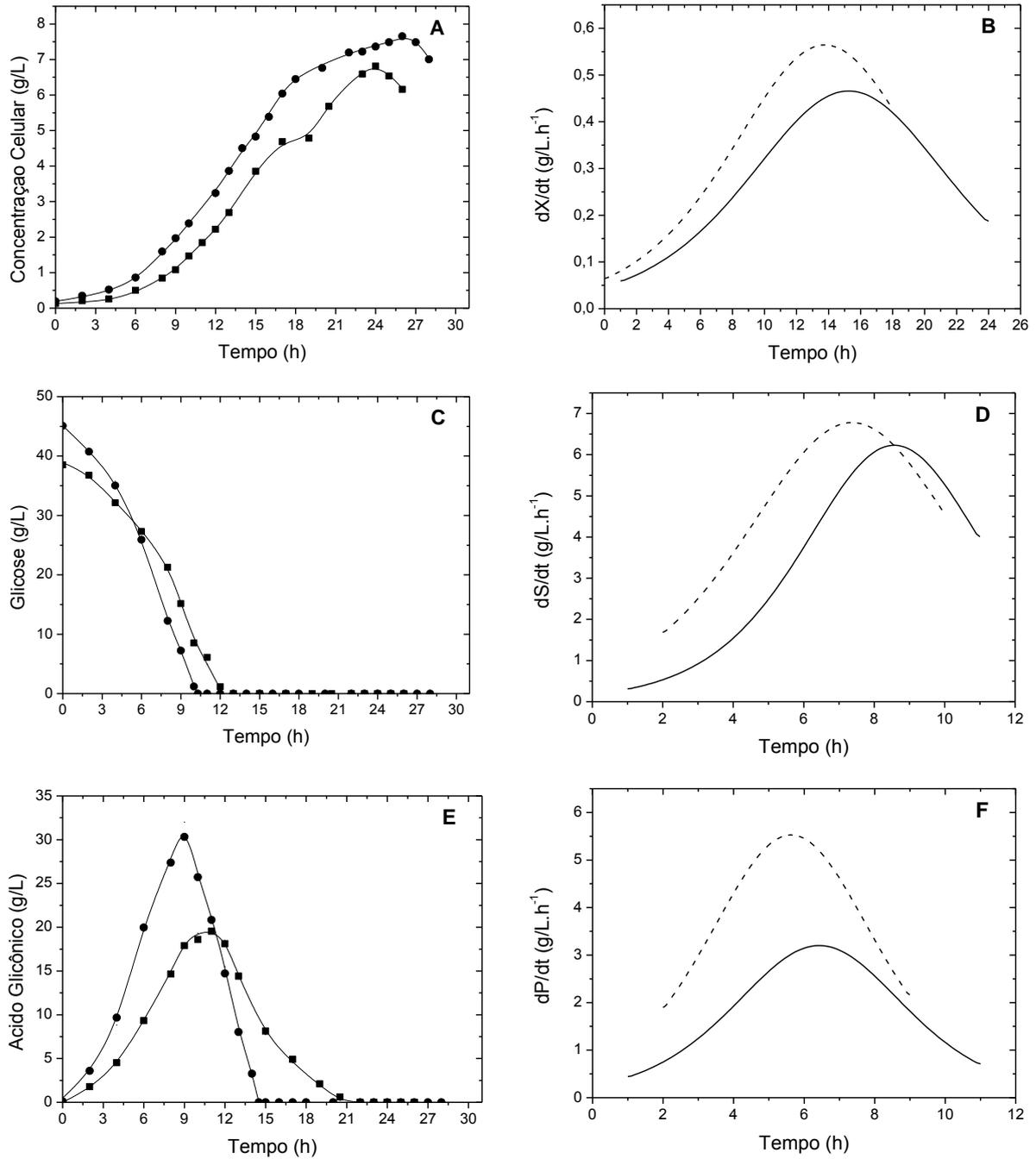


Figura 20 – Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E], e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) [D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo nos Ensaio G40 (■ —) e G40\*(• - - -).

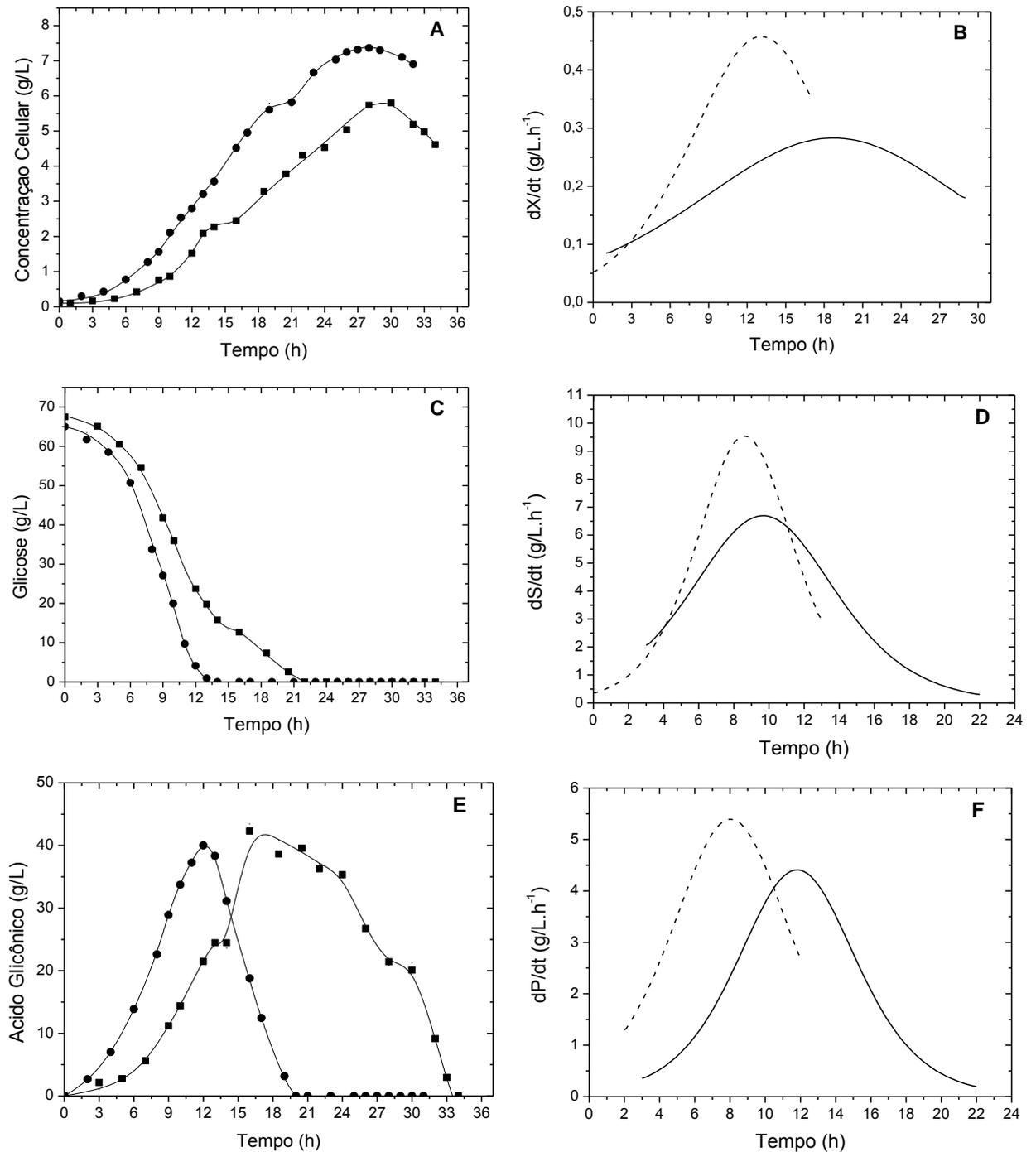


Figura 21 – Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E], e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) [D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo nos Ensaio G60 (■ —) e G60\*(• - - -).

Com o aumento da concentração de glicose para 80 g/L (G80\*), os perfis de variação das velocidades de metabolismo (Figura 17) foram sensivelmente diferentes dos verificados em G60\* (Figura 15), com impacto nos parâmetros de processo (Tabela 5). Houve uma redução de 35% nas máximas velocidades de consumo de glicose ( $dS/dt=6,69$  g/L.h), ampliando em 5 horas o tempo para exaustão deste substrato. As máximas velocidades de formação de ácido glicônico, verificadas entre 6 e 12 h, foram similares ( $dP/dt=5,02$  g/L.h), mas diminuíram progressivamente nas horas seguintes, mesmo havendo elevada concentração de glicose no meio. Ainda assim, houve aumento de 40% na concentração final do produto ( $P_m=55,5$  g/L), resultando em rendimento ligeiramente superior. Como o tempo para obtenção de  $P_m$  foi ampliado em 42% ( $t_{Pm}=17$  h), em virtude da redução de  $dP/dt$ , não houve melhora da produtividade em produto ( $Q_P=3,26$  g/L.h). Os valores das máximas velocidades de degradação do ácido foram análogos ( $dS_P/dt=6,31$  g/L.h), mas o tempo total para consumo foi aumentado em 11 horas em função da maior concentração do produto. A curva de crescimento apresentou uma inflexão entre 18 e 22 h, período coincidente com o final da produção e início do metabolismo do ácido, mas após o pequeno patamar, assumiu novamente o perfil linear enquanto havia produto em solução. No primeiro intervalo, as máximas velocidades instantâneas de crescimento foram similares ( $dX/dt=0,45$  g/L.h) às obtidas em G60\*, mas no período coincidente com a assimilação de ácido glicônico, os valores de  $dX/dt$  foram duas vezes maior (0,84 g/L.h). Nestas condições, verificou-se, em G80\*, aumento de 61% na concentração celular ( $X_m=11,6$  g/L). Como  $t_{Xm}$  foi muito semelhante, houve um ganho significativo (50%) na produtividade em células ( $Q_X=0,39$  g/L.h). O aumento expressivo da concentração de biomassa também teve impacto positivo em  $Y_{X/S}$  (0,14 g/g), que foi 27% maior.

A comparação das Figuras 15A e 17A evidenciam de forma mais clara as diferenças marcantes entre os perfis cinéticos de G60\* e G80\*, sobretudo em relação ao crescimento. Em G60\*,  $dX/dt$  aumentou com  $dS/dt$  e  $dP/dt$  nas primeiras 8 horas de cultivo, mas alcançou os máximos valores no intervalo em que estas velocidades eram decrescentes. Com isso, as máximas velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) ocorreram no mesmo intervalo de máximos  $\mu_S$  e  $\mu_P$ , indicando cinética associada. Em G80\*, por outro lado, em que ficou nitidamente evidenciada a existência de duas fases lineares de crescimento, o cultivo foi afetado de maneira diversa pelo ambiente metabólico gerado com o emprego de uma concentração

mais elevada de glicose. No período correspondente à primeira fase, as três velocidades ( $dS/dt$ ,  $dP/dt$  e  $dX/dt$ ) ficaram relativamente bem correlacionadas, obtendo-se máximos valores de  $\mu$  no intervalo de menores valores de  $\mu_S$  e  $\mu_P$  (cinética não-associada). Por outro lado, a fase final de produção de ácido foi acompanhada por diminuição das velocidades de crescimento, gerando o patamar na curva  $X=f(t)$ . Porém, mesmo que a concentração do produto fosse mais elevada que a de G60\*, a velocidade de metabolismo foi equivalente, e o cultivo retomou o crescimento a uma velocidade constante, gerando uma segunda fase linear, mas com maiores  $dX/dt$ . O comportamento descrito sugere duas hipóteses: a concentração de ácido presente no meio após a primeira fase linear ( $\cong 50$  g/L) começava a ser inibidora para o cultivo ou havia uma escassez de nutrientes no meio. No entanto, conforme verificado por Attwood *et al.* (1991), a bactéria não foi inibida por concentrações de até 140 g/L do produto formado. Como em G80\*, após um curto período de adaptação, o cultivo foi capaz de retomar o crescimento em velocidade elevada, acredita-se que as reações de oxidação do composto, gerou energia suficiente para garantir o expressivo aumento de  $X_m$ .

Analisando-se finalmente os resultados obtidos em G120\* (Figuras 16 a 19) e comparando-os com aqueles alcançados em G80\*, constatou-se que o processo foi ainda mais negativamente afetado com o emprego de uma concentração mais elevada de glicose. Embora as máximas velocidades de consumo do açúcar tenham sido ligeiramente superiores ( $dS/dt=7,6$  g/L.h), houve redução de 26% nas máximas velocidades de síntese de produto ( $dP/dt=4,0$  g/L.h), verificadas no intervalo entre 7 e 13 h. A partir daí, da mesma forma que em G80\*, estas velocidades diminuíram continuamente, embora, da mesma forma, ainda houvesse elevada concentração de glicose no meio. Deste modo, o impacto na cinética de formação de produto ficou ainda mais evidente. A concentração final não foi melhorada, havendo queda de mais de 50% no rendimento ( $R=49\%$ ). Além disso, com menores  $dP/dt$ , e aumento significativo de  $t_{pm}$ , a produtividade volumétrica em produto ( $Q_P=2,52$  g/L.h) também foi sensivelmente afetada. A curva de crescimento apresentou um período de máximas velocidades ( $dX/dt=0,4$  g/L.h) coincidente com o intervalo de máximos  $dS/dt$ , mas de maneira análoga ao ocorrido em G80\*, os valores de  $dX/dt$  diminuíram continuamente com a diminuição de  $dS/dt$  e  $dP/dt$ . As velocidades de consumo do ácido ( $dS_P/dt=5,4$  g/L.h) foram igualmente afetadas, mas neste intervalo o cultivo também retomou o crescimento. Embora a transição tenha sido mais lenta, uma

segunda fase linear foi verificada mais ao final do processo (31-35 h), com velocidades máximas equivalentes à da primeira, e, portanto, muito menores que as de G80\*. O perfil cinético descrito impactou negativamente todos os parâmetros relativos à produção de células em G120\*. Houve aumento de 26% em  $t_{x_m}$  (37,5 h) e diminuição de 20% na máxima concentração celular ( $X_m=9,7$  g/L), comprometendo a produtividade em células, que foi 50% menor. Com maior  $S_0$  e redução significativa de  $X_m$ , o valor de  $Y_{x/s}$  (0,077 g/g) foi 82% menor que o de G80\*.

Os resultados obtidos em G120\* reforçam, portanto, a hipótese de ter havido escassez de nutrientes para o cultivo. Nas Figuras 18A e 19A, é possível constatar que a diminuição das velocidades de formação de produto e de crescimento coincidiu com o momento em que concentração do produto no meio de cultivo ultrapassou 40 g/L. Como neste ensaio, havia mais ácido em solução, a o uso de nutrientes do meio também foi maior que em G80\*, no mesmo período. Por outro lado, constatou-se também, que a concentração inicial de glicose empregada (124,8 g/L) exerceu uma ligeira inibição da máxima velocidade específicas de crescimento ( $\mu$ ), que foi 10% menor (Tabela 5). Desta forma, os piores resultados obtidos neste ensaio parecem ser consequência do efeito conjunto da inibição pelo substrato e a falta de nutrientes. É possível inferir, ainda, que uma vez que em G120\* havia uma concentração muito superior de glicose que a de G80\* e a mesma quantidade de ácido foi produzida, acredita-se que grande parte do carboidrato tenha sido metabolizada diretamente na via HMP, rendendo menos energia para o crescimento. Não foram encontrados relatos que mostrem o efeito de concentrações de glicose tão elevadas sobre a atividade das principais enzimas envolvidas no metabolismo de glicose na bactéria. No trabalho de Luna *et al.* (2006) foi demonstrado que tanto a atividade de PQQ-GDH quanto a de NAD-GDH aumentou com o aumento da concentração de glicose na faixa de 20 a 50 g/L, em cultivo sob FBN.

Avaliando-se de maneira conjunta os parâmetros de fermentação obtidos nos quatros ensaios (Tabela 5 e Figura 22) constatou-se que o aumento de  $S_0$  implicou em aumento do tempo necessário para a obtenção da máxima concentração celular ( $t_{x_m}$ ) e do tempo total de fermentação ( $t_f$ ). Porém, como não houve diferença nos valores de  $\mu_m$  obtidos com  $S_0$  de 40, 60 e 80 g/L, ficou evidente a ausência de inibição do crescimento nestas condições. Com  $S_0$  de 120 g/L, ao contrário, a redução de cerca de 10% no valor de  $\mu_m$  indicou uma ligeira inibição do crescimento

bacteriano pela mais alta concentração de glicose. Neste ensaio, em parte do processo, as velocidades de consumo de glicose foram ligeiramente maiores que às medidas em G80\* (Figura 22D), mas as velocidades de formação de ácido glicônico foram inferiores a de todos os demais ensaios (Figura 22F). De forma distinta, a diminuição de  $dP/dt$  foi verificada quando ainda havia cerca de 30% de glicose no meio, não tendo sido verificado o aumento esperado na concentração final de produto, que havia mostrado incremento progressivo com  $S_0$  entre 40 e 80 g/L (32,3% e 38,7%, respectivamente). Neste contexto, as velocidades de crescimento foram prejudicadas (Figura 22B) e o tempo necessário para que o cultivo atingisse a maior concentração celular foi de 37,5 h (Tabela 5), valor muito superior aos verificados em G40\*, G60\* e G80\* (45%, 35% e 26%, respectivamente). A máxima concentração de células, que também havia aumentado com o aumento de  $S_0$  de 40 e 60 g/L para 80 g/L, não acompanhou esta tendência, atingindo um valor 20% menor ao deste último ensaio.

Cavalcante e Dobereiner (1988) demonstraram que *G. diazotrophicus* exibiu crescimento em cultivos realizados sob fixação de nitrogênio em meios com elevadas concentrações de glicose e sacarose (10 a 300 g/L). No entanto, os ensaios foram feitos em meio semisólido, usando frascos de 10 mL, não tendo sido quantificada as concentrações de células e produto. Em cultivo descontínuo, em que buscavam avaliar a produção de levana pela bactéria, Molinari e Boiardi (2013) verificaram valores decrescentes de  $Y_{XS}$  com aumento da concentração inicial de sacarose entre 10 e 150 g/L, em meio com 3,0 g/L de sulfato de amônio. A máxima concentração celular (6,0 g/L) foi obtida com  $S_0$  de 100 g/L, caindo pela metade com emprego de  $S_0$  de 150 g/L. A produção de ácido glicônico foi verificada em todas as condições, mas a maior concentração do produto (9 g/L) foi também quantificada com meio com  $S_0$  de 100 g/L. Tanto a produtividade em células quanto em produto foram, no entanto, extremamente baixas (0,06 e 0,07 g/L.h, respectivamente) e incomparavelmente menores que as obtidas no presente trabalho.

Como o interesse maior neste estudo é a produção de biomassa, os resultados deste grupo de ensaios mostraram que, com o meio utilizado e nas condições operacionais empregadas, a melhor concentração inicial de glicose foi a de 80 g/L (G80\*). Neste ensaio, foi obtida a maior concentração celular do Grupo II, a qual é 75,8% maior que o maior valor alcançado nos Ensaios do Grupo I. Este resultado foi decorrente do melhor desempenho do cultivo em relação à produção de ácido

glicônico, o que impactou positivamente outro importante parâmetro do processo, a produtividade em células ( $Q_X$ ), que foi também a maior do Grupo II e superior aos valores obtidos com os maiores  $S_0$  utilizados no Grupo I.

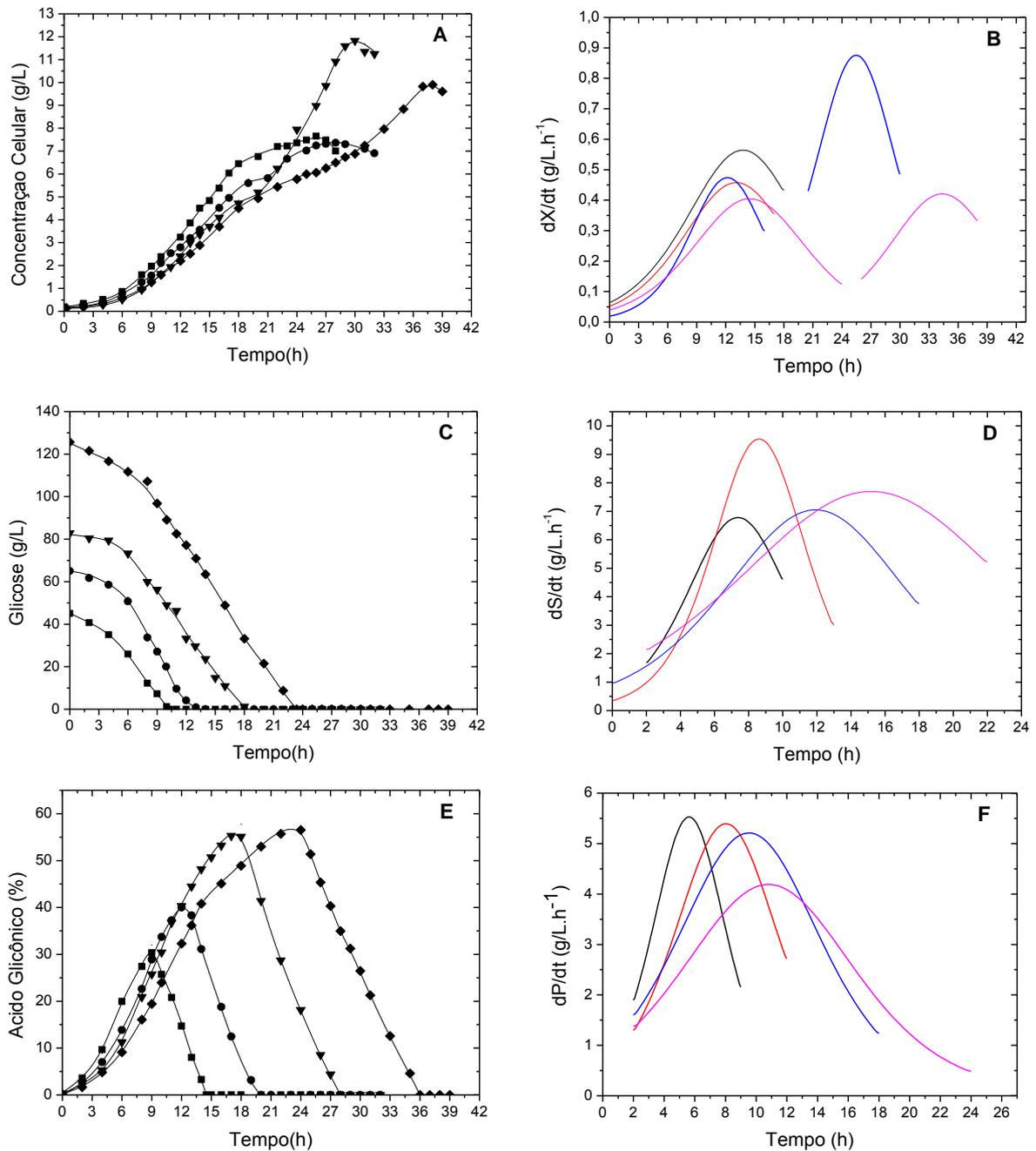


Figura 22 – Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E], e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) [D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo nos Ensaio G40\* (■ —); G60\* (• —); G80\* (▼ —) e G120\* (◆ —).

### **4.3 - Cinética da fermentação com variação das concentrações de glicose e extrato de levedura no meio**

#### **4.3.1 - Alimentação dos nutrientes no curso do processo**

Com base nos resultados obtidos no Grupo II, foram realizados novos ensaios (Grupo III) na busca de identificar estratégias para incrementar a eficiência do desenvolvimento bacteriano e o aumento da concentração celular. Optou-se por empregar uma concentração inicial de glicose de cerca de 40 g/L, realizando-se, ao longo do processo, a alimentação do meio com uma solução concentrada de glicose ou de glicose com extrato de levedura. O objetivo foi verificar de que forma o fornecimento parcelado destes nutrientes afetaria a cinética da fermentação e o metabolismo global voltado à geração de energia para a síntese de biomassa. Em um ensaio adicional, o meio foi preparado com uma concentração inicial mais alta de glicose, realizando-se um pulso da fonte complexa de nitrogênio durante a fermentação. Em todos os casos, a concentração de oxigênio dissolvido foi controlada em cerca de 20% da saturação, a partir do momento em que essa condição foi alcançada, visando evitar sua limitação para o cultivo.

Na sequência de ensaios, o meio foi primeiramente suplementado apenas com glicose, em um único pulso (ensaio G40\*-PG), seguindo-se uma fermentação em que a solução de alimentação era composta com glicose e extrato de levedura, mas também adicionada de uma única vez ao biorreator (ensaio G40\*-PGYE). No terceiro ensaio, esta mesma solução foi adicionada ao meio em dois pulsos independentes (ensaio G40\*-2PGYE). A cinética de fermentação obtida nos ensaios do Grupo II orientou o momento adequado para realizar a primeira alimentação. No quarto ensaio (G140\*-PYE), o valor de  $S_0$  foi elevado para 140 g/L e a solução de alimentação foi composta apenas com extrato de levedura, adicionada de uma única vez ao biorreator.

Nos três primeiros ensaios, o processo poderia ser considerado, até o momento da alimentação do meio, uma repetição de G40\*, uma vez que concentrações equivalentes de glicose foram fornecidas ao cultivo no início do processo. Porém, com a realização de um ou mais pulsos do substrato no reator, a quantidade total fornecida ao cultivo ficou similar a algumas daquelas empregadas nos ensaios dos Grupos I e II. Os pulsos foram realizados em momento próximo à exaustão da glicose inicial e visavam elevar sua concentração no meio para cerca

de 15 g/L. O fornecimento de quantidade adicional da fonte orgânica de nutrientes também alterou, por outro lado, a proporção entre as concentrações totais de carbono e nitrogênio disponibilizada ao cultivo nos ensaios G40\*-PG, G40\*-PGYE e G40\*-2PGYE, o que poderia evidenciar a eventual escassez deste último componente em algumas das condições testadas anteriormente. No caso de G140\*-PYE, a relação C:N foi modificada desde o início do cultivo, visando, da mesma forma, a dar subsídios para a interpretação dos resultados. A Tabela 6 mostra os principais resultados obtidos nos quatro ensaios.

Tabela 6 - Parâmetros gerais do cultivo de *G. diazotrophicus* PAL5 em meio GDS<sub>2N</sub> com concentração inicial de glicose de 40 g/L e alimentação com glicose em um único pulso (G40\*-PG), com glicose e extrato de levedura em um ou dois pulsos (G40\*-PGYE e G40\*-2PGYE, respectivamente) e com concentração inicial de glicose de 140 g/L e alimentação única com extrato de levedura (Ensaio G140\*-PYE).

Parâmetro	Meio de cultivo			
	G40*- PG	G40*- PGYE	G40*- 2PGYE	G140*- PYE
$t_f$ (h)	31	30	28	40
$t_{x_m}$ (h)	28,7	26,5	25,6	38
$t_{p_m}$ (h)	13,5	13	17	22
$X_m$ (g/L)	7,3	10,8	14,6	12,6
$S_0$ (g/L)	46	46	49	140,0
$\Delta S$ (g/L)	55	51	90,7	140,0
$P_m$ (g.L)	35,8	35,6	42	61,5
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,13	0,21	0,16	0,09
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,65	0,70	0,46	0,44
R (%)	71	76	45,8	47,9
$Q_x$ (g/L.h)	0,25	0,41	0,57	0,34
$Q_p$ (g/L.h)	2,65	2,74	2,47	2,80
$\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )	0,30	0,32	0,28	0,24

$t_f$  - Tempo total de fermentação;  $t_{x_m}$  - tempo para obtenção da máxima concentração celular;  $X_m$  - diferença entre a concentração celular em  $t_{x_m}$  e no início do cultivo;  $S_0$  - concentração inicial de glicose;  $\Delta S$  = total de glicose consumida;  $P_m$  - máxima concentração de produto;  $Y_{X/S}$  - fator de conversão de glicose em células;  $Y_{P/S}$  - fator de conversão de glicose em ácido glicônico; R - rendimento em ácido glicônico;  $Q_x$  - produtividade em células;  $Q_p$  - produtividade em ácido glicônico;  $\mu_m$  - máxima velocidade específica de crescimento.

No ensaio G40\*-PG, que foi iniciado exatamente nas mesmas condições de G40\*, a solução concentrada de glicose foi introduzida no reator por volta de 10 h de processo. Conforme demonstrado por análises feitas posteriormente, ainda havia um residual do carboidrato no momento do pulso, o que levou à quantificação de concentração ligeiramente maior que a esperada na amostra de meio retirada imediatamente após a alimentação (Figura 23A). Os perfis cinéticos obtidos evidenciaram o consumo completo de açúcar, com concomitante síntese de ácido glicônico e células, seguido de catabolismo de todo o produto formado e produção adicional de biomassa, conforme comportamento característico verificado nos ensaios anteriores. No entanto, no intervalo que antecedeu o pulso de glicose, em G40\*-PG, as velocidades de consumo de glicose e de crescimento foram menores que as verificadas em G40\* no mesmo período de tempo, o que pode ter sido consequência de um inoculo menos ativo e/ou de uma menor concentração inicial de células. De qualquer forma, a intervenção no processo acarretou em diferenças na cinética de crescimento, como pode ser melhor observado na Figura 25, que compara os resultados dos dois ensaios.

Verificou-se que a maior disponibilidade de glicose ( $\cong 20\%$ ) em G40\*-PG permitiu o aumento proporcional da máxima concentração do produto ( $P_m=35,9$  g/L) e rendimento equivalente ( $R=71\%$ ) ao de G40\*. No entanto, houve uma discreta diminuição das máximas velocidades de produção do composto ( $dP/dt=4,21$  g/L.h) (Figura 24A), em consequência da diminuição de  $dS/dt$ , resultando em aumento significativo de  $t_{Pm}$  e queda de 28% em  $Q_P$  (2,65 g/L.h). Essas diferenças implicaram em uma pequena redução da máxima velocidade de crescimento nesse intervalo ( $dX/dt=0,45$  g/L.h). Porém, após o início do consumo de ácido, que ocorreu também em velocidade ligeiramente menor ( $dS_P/dt=5,09$  g/L.h), houve sensível redução de  $dX/dt$ , que assumiu um ritmo constante de 0,28 g/L.h, em média, até a entrada na fase estacionária. Este comportamento resultou na ocorrência de dois períodos de perfil linear na curva  $X=f(t)$ , diferenciando, portanto, a cinética de G40\*-PG daquela verificada em G40\* (Figura 12). Assim, apesar da maior concentração de glicose fornecida ao cultivo, a concentração final de biomassa ( $X_m=7,3$  g/L) foi análoga à de G40\*, e como  $t_{Xm}$  também foi maior, houve diminuição de 16% na produtividade em células ( $Q_X=0,25$  g/L.h).

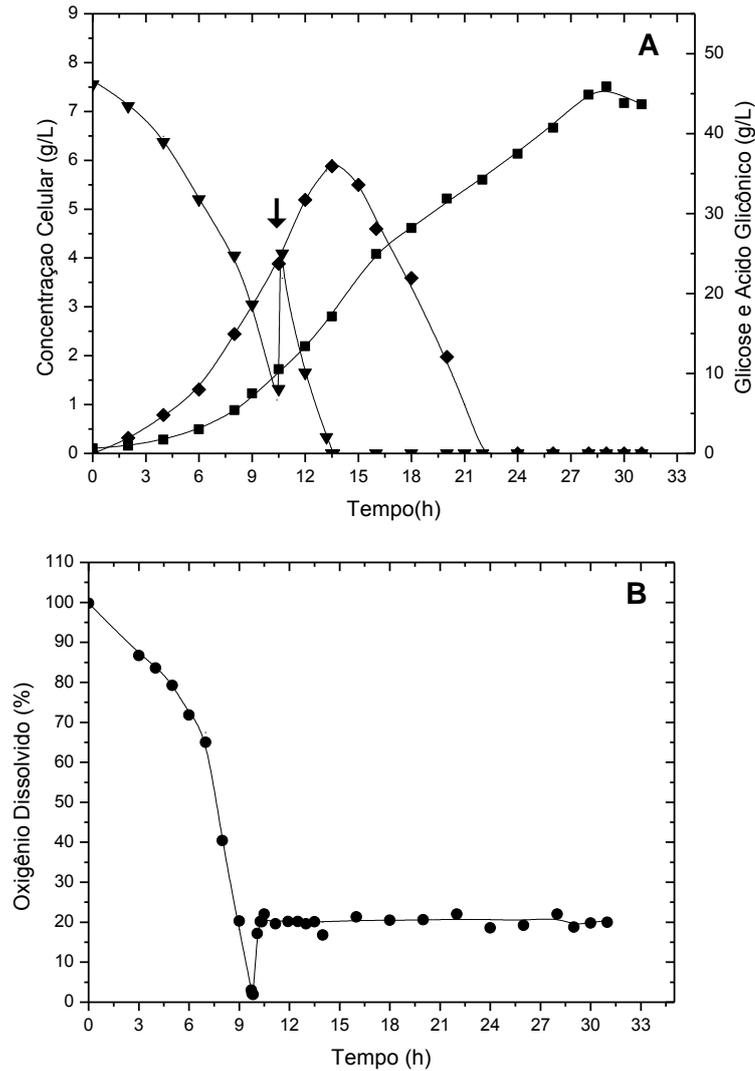


Figura 23 – Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (●) [B] em função do tempo no ensaio G40\*-PG. A seta indica o momento da suplementação do meio com glicose.

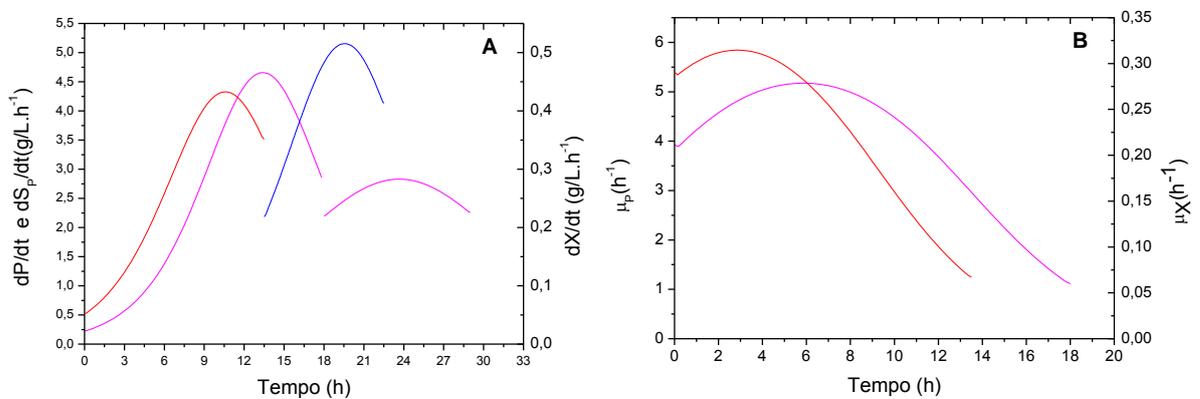


Figura 24 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—) e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A] e velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—) e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B], em função do tempo, no ensaio G40\*-PG.

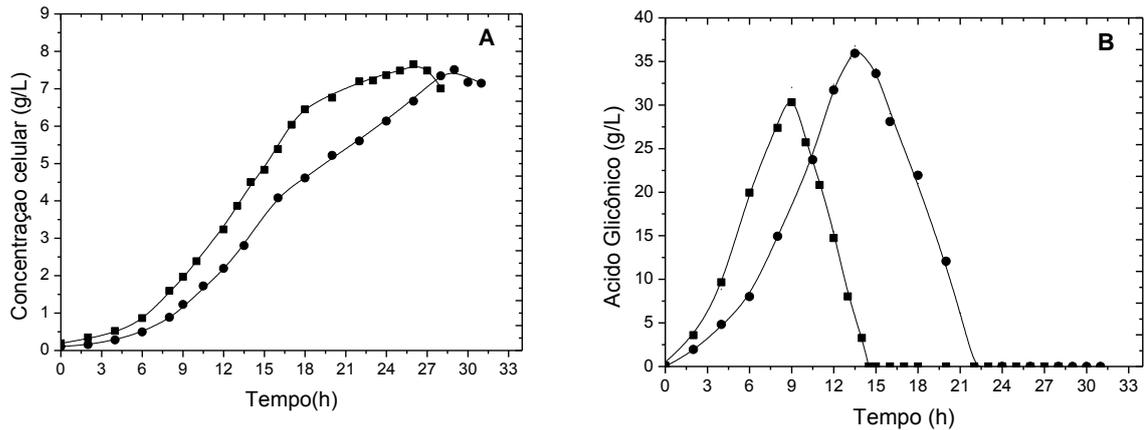


Figura 25 – Concentração de células [A] e de ácido glicônico [B] em função do tempo nos ensaios G40\* (■) e G40\*-PG (●).

Numa tentativa de explicar as diferenças encontradas, foram calculados, para ambos os ensaios, os valores de  $Y_{P/S}$  e  $Y_{X/S}$  nas primeiras 9 horas do processo, período que antecedeu o pulso de glicose em G40\*-PG. Neste ensaio, a conversão do substrato em células foi cerca de 0,075 g/g, enquanto a conversão em produto alcançou um valor próximo a 0,70 g/g. Em G40\*, o rendimento em produto foi maior ( $Y_{P/S}=0,82$  g/g), mas a conversão em biomassa menor ( $Y_{X/S}=0,032$  g/g). Desta forma, quando o cultivo entrou na fase linear, grande parte da glicose (84%) já havia sido convertida em ácido e o crescimento continuou na mesma velocidade no período de consumo do produto. Portanto, a fase linear ocorreu bem depois dos máximos  $dP/dt$ , coincidindo com o período de máximos  $dS_P/dt$  (Figura 13A). Em G40\*-PG, ao contrário, apenas 61% do açúcar foram consumidos neste período e o cultivo saiu da fase exponencial e assumiu o perfil linear em momento de máximos  $dP/dt$ , havendo, portanto, mais ácido em solução quando este passou a ser o substrato. Esta condição parece ter exigido uma readaptação do cultivo, com diminuição da velocidade de crescimento, verificando-se uma nova fase linear após o período de máximos  $dS_P/dt$  (Figura 24A). Neste contexto, é possível deduzir que, em G40\*, a maior parte da energia para o crescimento veio da oxidação do ácido glicônico. Por outro lado, no ensaio G40\*-PG, a quantidade extra de glicose adicionada ao meio parece ter entrado diretamente na via HMP, gerando menos energia, pelo menos em um primeiro momento, para a produção de biomassa.

A inclusão de extrato de levedura na solução de alimentação do meio (ensaio G40\*-PGYE) praticamente não afetou o perfil da curva de produção de ácido glicônico (Figura 26A), que foi semelhante ao de G40\*-PG (Figura 23A). A produção máxima de ácido foi análoga, mas como a concentração total de glicose foi cerca de 10% menor, o rendimento em produto foi levemente favorecido ( $R=76\%$ ). Por outro lado, como as velocidades de formação do composto foram ligeiramente maiores (Figura 27A), o valor de  $t_{pm}$  foi menor, resultando em uma produtividade em produto (2,74 g/L.h) similar. A alteração da concentração de nitrogênio durante o cultivo provocou, no entanto, uma profunda mudança na cinética de crescimento, não tendo ocorrido qualquer inflexão na curva  $X=f(t)$ . Nas primeiras 9 h, intervalo que antecedeu o pulso de nutrientes, os perfis foram coincidentes, conforme esperado, sendo medidos valores ligeiramente distintos de  $Y_{P/S}$  de 0,91 g/g e  $Y_{X/S}$  de 0,081 g/g em razão das diferenças citadas acima. Porém, diferentemente de G40\*-PG, e de forma idêntica ao ocorrido em G40\*, a fase linear teve início após a exaustão da glicose e obtenção da máxima concentração de ácido, coincidindo com o intervalo de máximos valores de  $dS_p/dt$  (Figura 27A), que foram expressivamente maiores (74%) que em G40\*-PG. Desta forma, como a energia gerada via PQQ-GDH e NAD-GDH é maior que aquela produzida quando glicose entra na via HMP, as velocidades de crescimento foram muito superiores ( $dX/dt=0,76$  g/L.h), permitindo também melhor aproveitamento da quantidade extra de nutrientes nitrogenados no meio, que foram direcionados para a geração de quantidade adicional de biomassa. O aumento de quase 50% em  $X_m$  (10,8 g/L) permitiu melhora expressiva de  $Y_{X/S}$  (quase 62% maior) e as maiores velocidades de crescimento, na medida em que diminuíram  $t_{xm}$ , permitindo ganho elevado (67%) em  $Q_x$ .

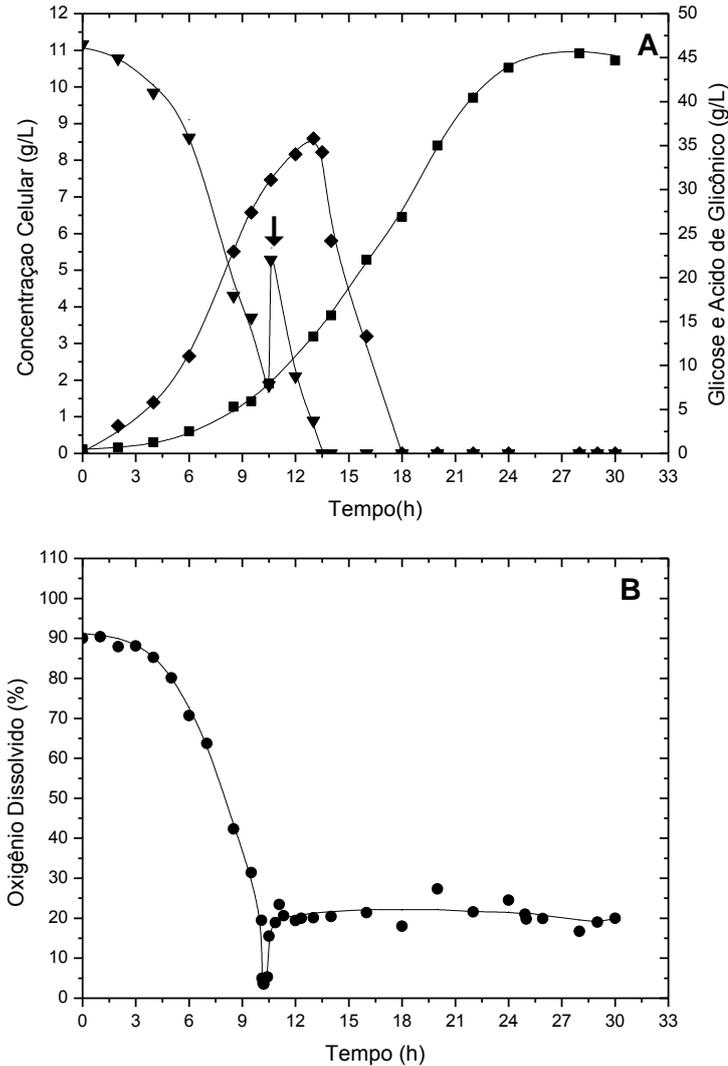


Figura 26 – Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (●) [B] em função do tempo no ensaio G40\*-PGYE. A seta indica o momento da suplementação do meio com glicose e extrato de levedura.

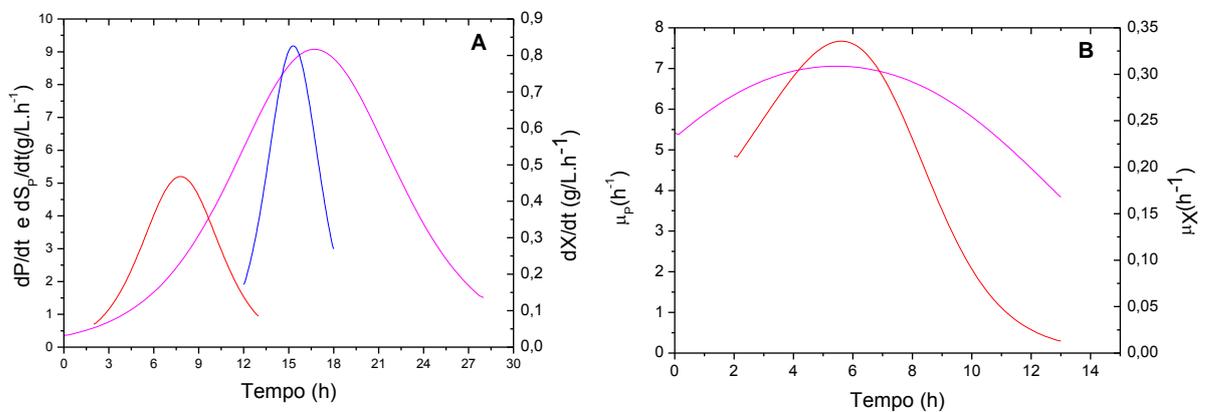


Figura 27 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_p/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_p$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G40\*-PGYE.

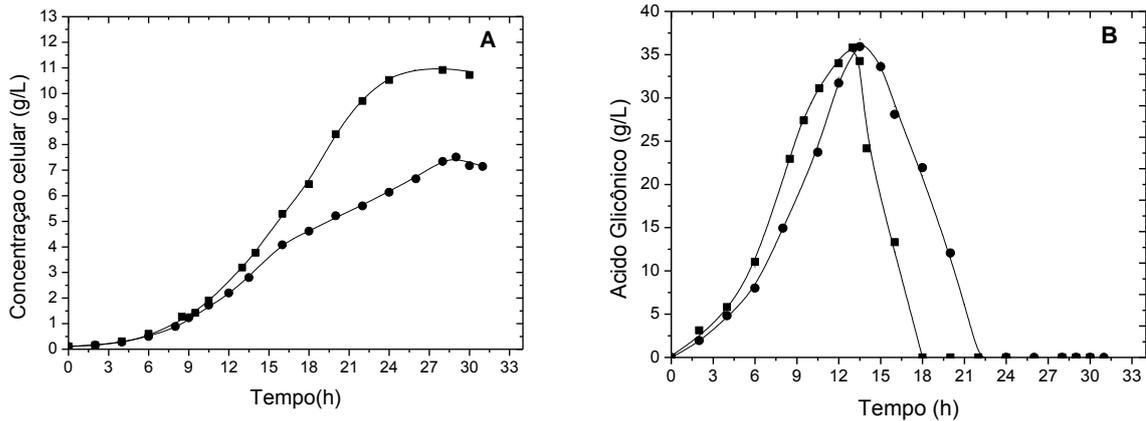


Figura 28 – Concentração de células [A] e de ácido glicônico [B] em função do tempo nos ensaios G40\*-PG (●) e G40\*-PGYE (■).

Como os resultados do ensaio G40\*-PGYE evidenciaram claramente a vantagem de aumentar a concentração de extrato de levedura durante o cultivo, no ensaio seguinte (G40\*-2PGYE), buscando obter um aumento adicional de  $X_m$ , foi realizado um segundo pulso da solução de glicose contendo este componente. A concentração inicial de glicose foi ligeiramente maior ( $S_0=49,0$  g/L), mas as velocidades de consumo foram levemente superiores, levando ao esgotamento do substrato em 10 h (Figura 29A). Assim, como o momento para a realização do pulso tomou como base a cinética da curva  $S=f(t)$  dos dois ensaios anteriores (Figuras 23A e 26A), a concentração de glicose ficou nula por um período de duas horas. Nesta condição, a bactéria passou a consumir o ácido formado, com concomitante incremento da concentração celular, mas sua síntese foi reiniciada após a adição de nova parcela de açúcar. Da mesma forma, com elevados valores de  $dS/dt$ , houve rápido consumo da glicose adicionada, resultando em um novo intervalo em que o ácido glicônico passou a ser o substrato. Este foi, no entanto, mais curto ( $\cong 1$  h), diminuindo a quantidade de ácido metabolizado. Após a segunda alimentação, o consumo de glicose ocorreu em igual velocidade, havendo produção adicional de ácido.

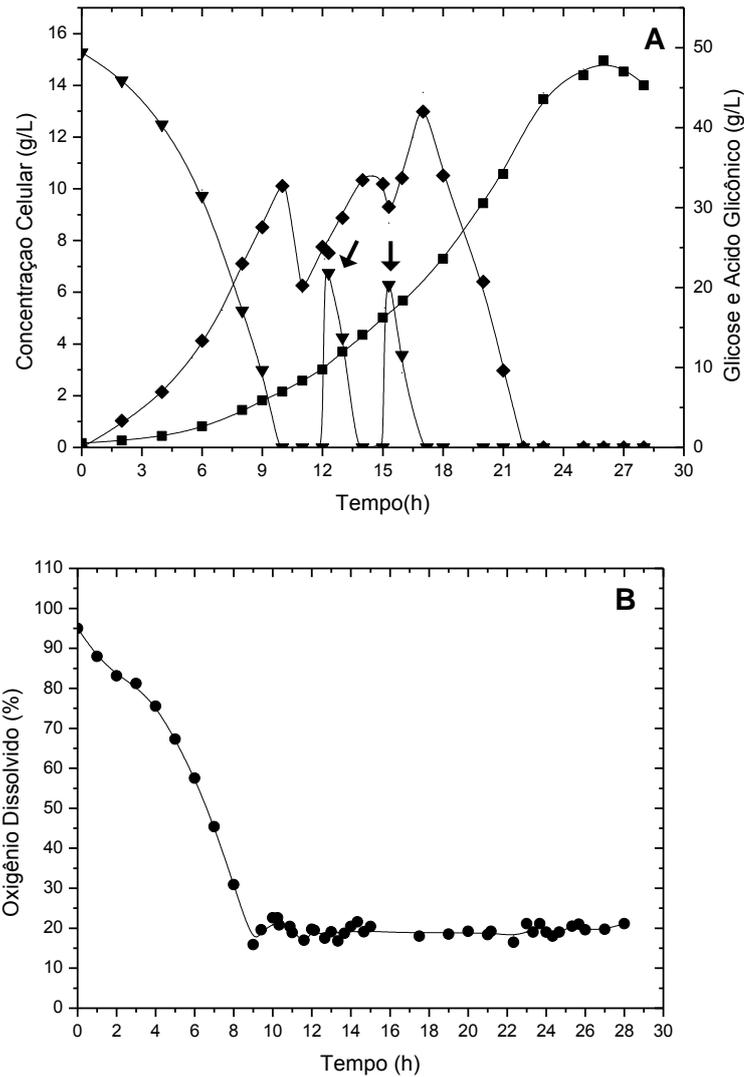


Figura 29 – Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G40\*-2PGYE. As setas indicam o momento da suplementação do meio com glicose e extrato de levedura.

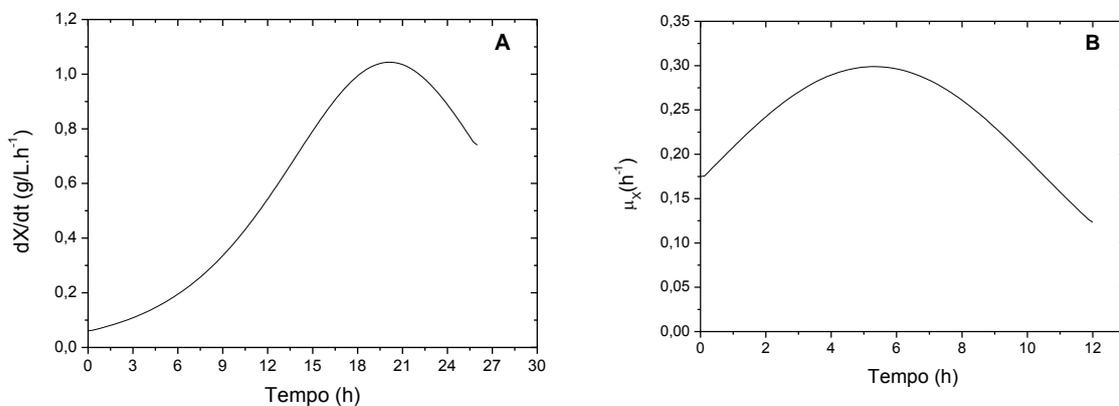


Figura 30 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [A] e velocidades específicas de crescimento ( $\mu_x$ ) [B] em função do tempo no ensaio G40\*-2PGYE.

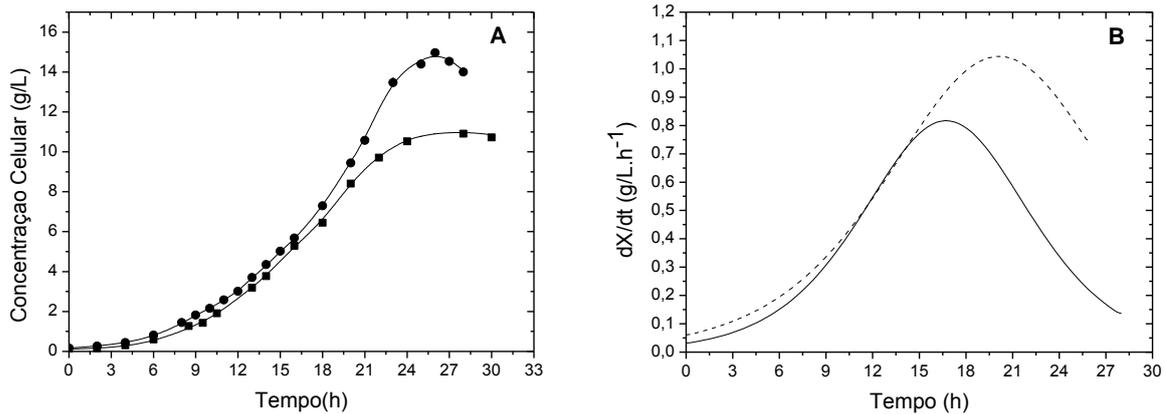


Figura 31 - Concentração de células em função do tempo nos ensaios G40\*-PGYE (■) e G40\*-2PGYE (●) [A]; Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) nos ensaios G40\*-PGYE (—) e G40\*-2PGYE (- - -) [B].

Apesar de todas as variações na cinética de consumo de glicose e formação de ácido, a curva de crescimento não apresentou nenhuma inflexão até atingir a fase estacionária. Considerando-se as primeiras nove horas de fermentação, o cultivo comportou-se como em G40\*, em que a produção de ácido foi privilegiada, resultando em valor de  $Y_{P/S}$  (0,46 g/g) superior ao de  $Y_{X/S}$  (0,16 g/g). Porém, as velocidades de crescimento aumentaram continuamente no período correspondente às duas alimentações do meio (entre 12 e 17h), e a fase linear começou com o esgotamento da glicose adicionada no segundo pulso e máxima produção de ácido, repetindo o comportamento verificado em G40\*-PGYE. Levando-se em conta a concentração total de glicose fornecida ao cultivo ( $\Delta S=90,7$  g/L) e considerando a produção máxima de ácido aquela obtida após o segundo pulso de nutrientes ( $P_m=42$  g/L), o valor de  $Y_{P/S}$  neste cultivo foi igual a 0,46 g/g. Isto representa um rendimento de 45,8%, em relação ao máximo valor teórico, o qual é 66% menor que o alcançado em G40\*-PGYE. Por outro lado, apesar das velocidades de consumo de glicose terem sido similares nos dois ensaios, o crescimento ocorreu em maior velocidade em G40\*-2PGYE ( $dX/dt=1,0$  g/L.h), tendo sido obtida concentração final de células 35% maior. Como o valor de  $t_{x_m}$  foi ligeiramente menor, a produtividade em células foi também francamente favorecida ( $Q_x=0,57$  g/L.h).

Constatou-se, portanto, que a maior concentração de extrato de levedura foi determinante para o melhor desempenho do cultivo em G40\*-2PGYE. No início da fase linear, momento em que já haviam sido feitas as duas adições de nutrientes, a concentração celular era o dobro daquela verificada em G40\*-PGYE no mesmo

estágio do processo. Assim, com maior concentração de ácido glicônico, mais energia foi gerada durante a sua oxidação, a qual foi utilizada, aparentemente, para incorporação dos componentes nitrogenados do extrato de levedura adicional, ampliando ainda mais a síntese de células. O extrato de levedura é, de fato, um componente que favorece o crescimento bacteriano, pois contém proteínas (73%-75%), aminoácidos livres e oligopeptídeos de diferentes massas moleculares, além de vitaminas, nucleotídeos, sais minerais e polissacarídeos, predominantemente mananas e glicanas (Sommer, 1996; Sacksinchai *et al.*, 2001), que atuam como precursores necessários para a síntese de biomassa (Mignone e Avignone-Rossa, 1996; Downs, 2006).

Comparando-se os resultados de G40\*-2PGYE com aqueles obtidos em G80\* (Tabela 6 e Figura 29), constata-se que, mesmo que o valor de  $\Delta S$  tenha sido apenas 10% menor neste último, a formação de ácido glicônico e o rendimento em produto foram superiores (23% e 36%, respectivamente). Por outro lado, o tempo necessário para alcançar a máxima concentração celular foi quase 20% maior e a cinética de crescimento apresentou uma inflexão no final do período de produção de ácido que levou a dois períodos lineares na curva  $X=f(t)$  (Figura 29A), com baixos valores de  $dX/dt$  no primeiro deles (Figura 30A). Neste contexto, a análise comparativa dos dois ensaios mostra que a produção de biomassa, assim como o valor de  $Q_x$ , foi significativamente inferior (26% e 46%, respectivamente) aos de G40\*-2PGYE, reforçando a hipótese de que o teor de nitrogênio ou outros micronutrientes eram insuficientes em relação a concentração de açúcar utilizada.

No ensaio G140\*-PYE, em que a concentração inicial de glicose foi aumentada para 140 g/L, o metabolismo do açúcar foi verificado desde o início da fermentação (Figura 32A), com máximas velocidades (8,5 g/L.h) entre 6 e 13 h e consumo completo com 22,5 h (Figura 33A). A produção de ácido glicônico ocorreu no mesmo período, sendo obtidas 61,5 g/L do composto, o que representa um rendimento inferior a 50% (Tabela 6). As máximas velocidades de síntese (3,89 g/L.h) foram verificadas em momento anterior aos máximos valores de  $dS/dt$ , havendo diminuição de  $dP/dt$  após adição de extrato de levedura ao meio, feito em  $t=15$  h. A curva de crescimento mostrou uma fase lag de cerca de 2 horas e a fase exponencial evidenciou máximas velocidades específicas de crescimento ( $\mu_m$ ) de  $0,24 \text{ h}^{-1}$ , o menor valor obtido nos ensaios realizados até então. A partir da exponencial, as velocidades de crescimento aumentaram em paralelo ao aumento de  $dS/dt$ , mas os

máximos  $dX/dt$  foram obtidos no período de redução destas velocidades e com mais baixos valores de  $dP/dt$ . Após  $t_{Pm}$ , com o início do metabolismo do ácido formado, que ocorreu na mesma velocidade até o final ( $dS_p/dt=4,38$  g/L.h), houve aumento progressivo da concentração celular, que atingiu 12,6 g/L com 38 h. A intensa formação de espuma e a necessidade de uso de maior quantidade de antiespumante, neste intervalo, interferiu nas medidas de X, prejudicando o traçado da cinética de crescimento, bem como o cálculo das velocidades.

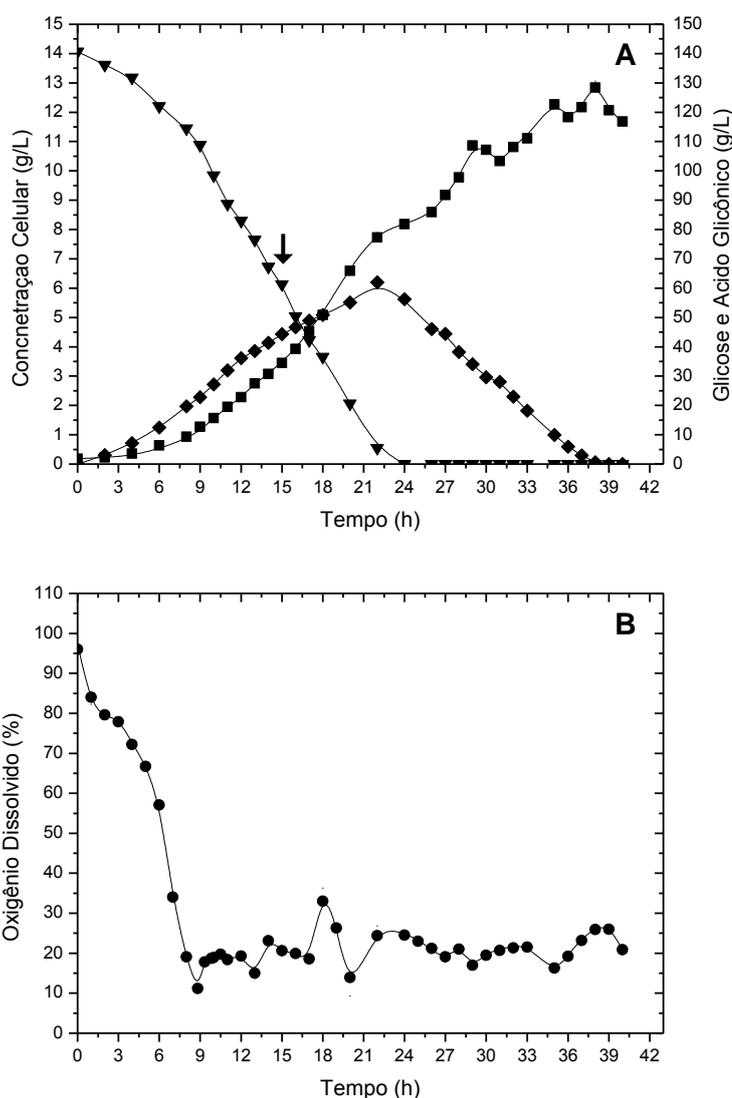


Figura 32 – Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (●) [B] em função do tempo no ensaio G140\*-PYE. A seta indica o momento da suplementação do meio com extrato de levedura.

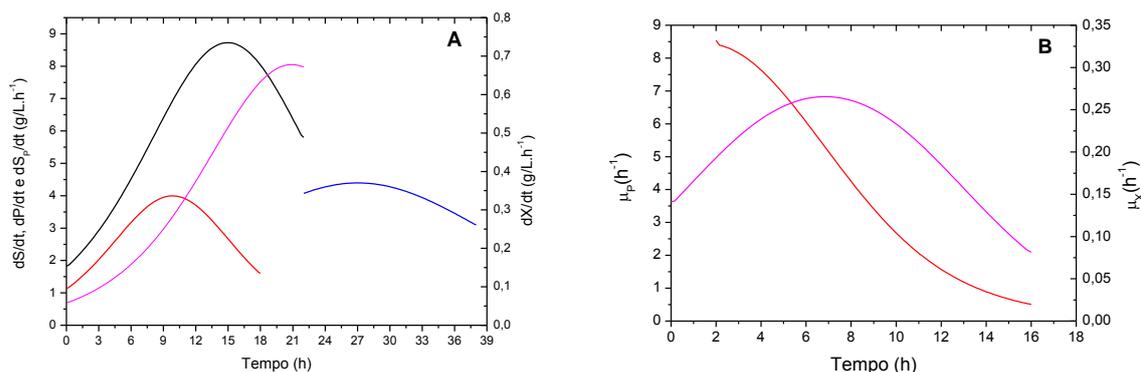


Figura 33 – Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; e velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G140\*-PYE.

Mesmo que não seja adequado fazer uma comparação direta entre os resultados de G140\*-PYE com os do ensaio G40\*-2PGYE, em razão das diferenças operacionais, alguns aspectos da cinética de crescimento de ambos devem ser destacados (Figura 34). Em G40\*-2PGYE, houve produção de ácido glicônico após os dois pulsos da solução de glicose/extrato de levedura, com aumento contínuo da concentração celular e nenhuma inflexão na curva  $X=f(t)$ . Em G140\*-PYE, verificou-se, da mesma forma, aumento da concentração de ácido após o pulso de extrato de levedura ( $t=15$  h), mas, neste caso, ainda havia elevada concentração de glicose no meio ( $\cong 61$  g/L) e o valor de  $Y_{P/S}$  calculado entre este momento e  $t_{Pm}$  foi a metade daquele obtido no intervalo anterior ao pulso (0,56 e 0,27 g/g, respectivamente). Este comportamento sugere que glicose estava sendo preferencialmente direcionada para a geração de energia neste intervalo, resultando no aumento da concentração celular. Porém, após  $t_{Pm}$ , as velocidades de consumo do ácido foram sensivelmente inferiores ( $dS_P/dt=4,38$  g/L.h) às de G40\*-2PGYE ( $dS_P/dt=8,0$  g/L.h), verificando-se também redução das velocidades de crescimento e impacto sobre a curva  $X=f(t)$ , que apresentou uma clara inflexão. Nesta situação, mesmo com concentração total de glicose quase 40% maior, a produção de biomassa não foi favorecida, obtendo-se  $X_m$  (12,6 g/L) quase 20% menor. Do mesmo modo, como o  $t_{Pm}$  foi 50% maior, houve profundo impacto sobre a produtividade em células, que sofreu redução de 68%. Estes resultados reforçam a importância de haver um melhor equilíbrio entre as concentrações de glicose e de nitrogênio fornecidas ao cultivo, podendo-se deduzir que a quantidade de extrato de levedura adicionada ao

meio em G140\*-PYE foi insuficiente para o crescimento. Acredita-se que, um eventual segundo pulso deste nutriente, por volta de 20 horas de processo, implicaria numa cinética de crescimento distinta e a aproximaria daquela obtida em G40\*-2PGYE.

A comparação entre G140\*-PYE e G120\* (Figura 35), em que  $\Delta S$  foi apenas 12% menor, pode reforçar a hipótese de escassez de nitrogênio no primeiro, quando este foi comparado com o ensaio G40\*-2PGYE. Nas primeiras 15 horas de processo, a relação C:N inicial era menor em G120\*, mas as máximas velocidades específicas de crescimento foram superiores ( $0,28 \text{ h}^{-1}$ ) (Tabela 6), indicando que a menor atividade de água de G140\*-PYE contribuiu para o menor valor de  $\mu_m$  obtido neste ensaio ( $0,24 \text{ h}^{-1}$ ) (Tabela 6). As velocidades instantâneas de consumo de glicose e de formação de ácido seguiram, porém, um perfil similar, resultando em valores equivalentes de  $Y_{P/S}$  neste intervalo. A partir daí, no entanto, a concentração de nitrogênio em G120\*, que era menor, parece ter sido insuficiente para garantir a mesma produção de ácido, que foi ligeiramente inferior ( $P_m=56,7 \text{ g/L}$ ), afetando também as velocidades de crescimento, que caíram continuamente até  $t_{Pm}$ , ao contrário do ocorrido em G140\*-PYE (Figura 35B). Da mesma forma, mesmo com  $dS_p/dt$  semelhantes, os valores de  $dX/dt$  continuaram baixos durante grande parte do período de metabolismo do composto, confirmando que, apesar da geração energia, faltou nitrogênio para a formação de mais biomassa, que foi 30% menor ( $X_m=9,7 \text{ g/L}$ ) que a de G140\*-PYE.

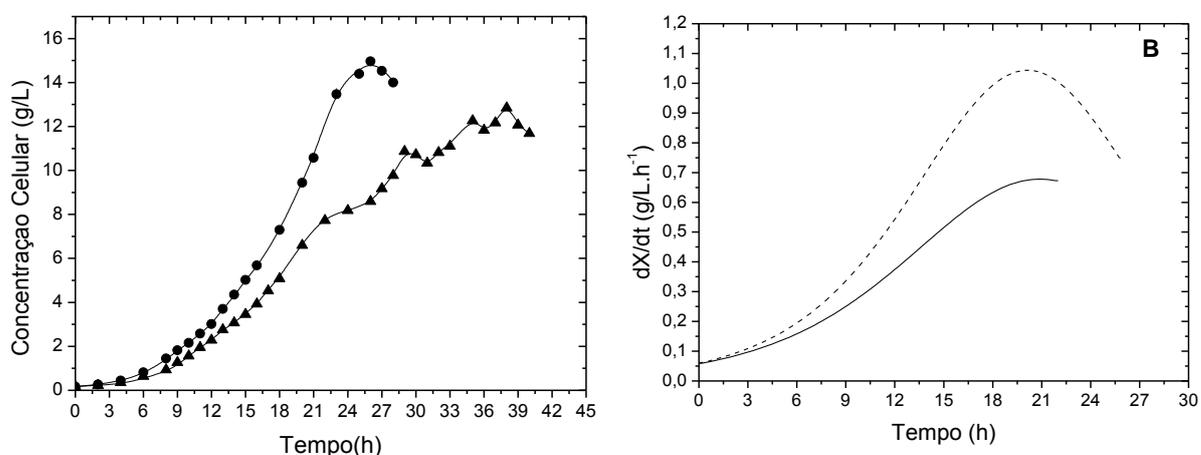


Figura 34- Concentração de células em função do tempo nos ensaios G140\*-PGYE (▲) e G40\*-2PGYE (●) [A]; Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) nos ensaios G140\*-PYE (—) e G40\*-2PGYE (- - -) [B].

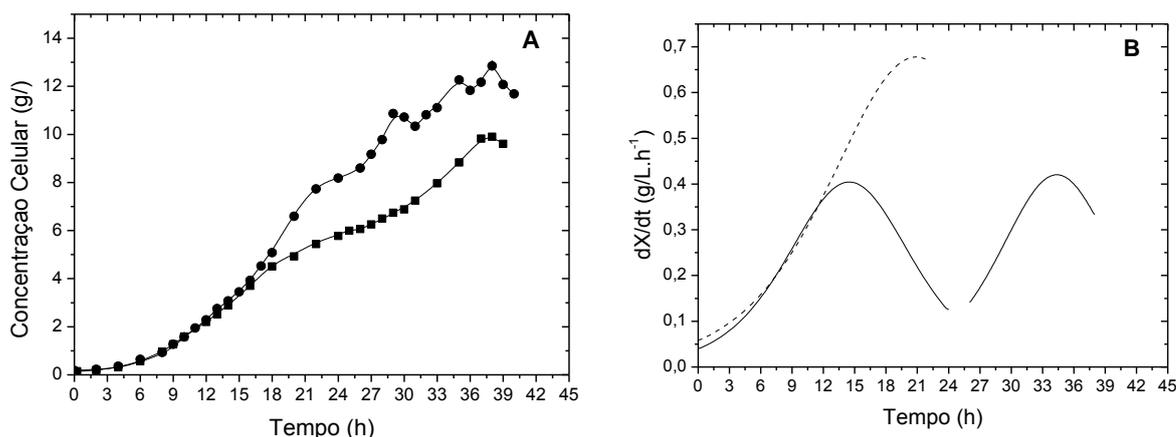


Figura 35 - Concentração de células em função do tempo nos ensaios G120\* (■) e G140\*-PYE (•) [A]; Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) nos ensaios G120\* (—) e G140\*-PYE (- -) [B].

No contexto discutido acima, fica também mais evidente que foi a escassez de nitrogênio, e não a concentração de ácido glicônico presente no meio, conforme hipótese feita anteriormente, o fator determinante para as diferenças na cinética de crescimento obtidas nos ensaios G80\* e G120\*, em comparação com G60\* (item 4.2.2). De fato, conforme ressaltado na discussão daqueles ensaios, o trabalho de Attwood *et al.* (1991) mostra que a concentração da ordem de 140,0 g/L de ácido não afetou a velocidade de crescimento e a produção de biomassa por *G. diazotrophicus* em cultivo com concentração inicial de glicose de 150 g/L.

#### 4.3.2 - Meios com maior concentração inicial de extrato de levedura

Os ensaios do item 4.3.1 mostraram que o fornecimento extra de nitrogênio para o meio de fermentação exerceu influência positiva sobre o crescimento celular. Mais especificamente, os dados obtidos em G140\*-PYE indicaram que ao compensar parcialmente a elevada relação carbono:nitrogênio inicial do meio (C:N=31,1), com a adição extra de extrato de levedura durante o processo, foi possível melhorar a concentração celular em relação à obtida em G120\* (Grupo II), cujo meio tinha relação C:N de 27,7. No caso de G140\*-PYE, no entanto, a maior relação C:N foi resultante do aumento de  $S_0$ , uma vez que as concentrações de todos os componentes nitrogenados do meio GDS<sub>2N</sub> foram mantidas constantes. Desta forma, a fim de avaliar o efeito da redução da relação C:N inicial do meio

GDS<sub>2N</sub> pela alteração da concentração inicial de extrato de levedura do meio, dois novos ensaios foram realizados. Optou-se por utilizar duas outras concentrações iniciais de glicose empregadas no Grupo II, 60 e 80 g/L (ensaios G60\* e G80\*, respectivamente), mas com menor relação C:N que aquelas empregadas nestes ensaios. No primeiro caso, o meio foi suplementado com o dobro da concentração de extrato de levedura (ensaio G60\*-2YE), e, no segundo, com o triplo da concentração deste componente (ensaio G80\*-3YE). Como os valores reais de  $S_0$  foram ligeiramente maiores, tanto em G60\*-2YE quanto em G80\*-3YE, a relação C:N inicial foi análoga (11,5) e inferior aos valores iniciais (14,4 e 18,3, respectivamente).

Na Tabela 7 são mostrados os principais parâmetros de processo obtidos nestes ensaios. Nas Figuras 36 e 38 são apresentados os perfis de variação das concentrações de glicose, ácido glicônico e células em G60\*-2YE e G80\*-3YE, respectivamente. Na Figura 40 estes mesmos perfis são apresentados conjuntamente de modo a facilitar a comparação.

O comportamento cinético do cultivo foi semelhante nos dois ensaios, embora em G80\*-3YE a máxima velocidade específica de crescimento tenha sido 30% menor, comprovando que a bactéria é, de fato, afetada por concentrações elevadas de sólidos no meio. Neste ensaio, apesar de  $S_0$  ter sido 60% menor que o empregado em G140\*-PYE, a concentração de extrato de levedura foi três vezes maior no meio inicial, o que pode explicar os valores equivalentes de  $\mu_m$  obtidos nos dois ensaios (0,23 e 0,24 h<sup>-1</sup>, respectivamente). As velocidades instantâneas de consumo de glicose foram, na maior parte do processo, ligeiramente menores em G80\*-3YE, mas os máximos valores de  $dS/dt$  foram análogos (Figura 40D). Por outro lado, as velocidades de formação de ácido glicônico ficaram muito bem correlacionadas (Figura 40F), havendo apenas uma defasagem no período de obtenção dos máximos valores de  $dP/dt$ , que foram comparáveis, em função da maior quantidade de glicose de G80\*-3YE e do maior tempo para seu consumo. Do mesmo modo, as máximas velocidades de consumo do ácido foram praticamente idênticas (Figuras 37 e 39), embora também defasadas em consequência da maior concentração do produto em G80\*-3YE. Neste contexto, verificaram-se velocidades de crescimento ligeiramente menores em G80\*-3YE durante grande parte da fermentação, mas as condições do meio permitiram crescimento adicional, com

máximos valores de  $dX/dt$  superiores aos de G60\*-2YE e obtidos em momento posterior (Figura 40B).

Tabela 7 - Parâmetros gerais do cultivo de *G. diazotrophicus* PAL5 em meio GDS<sub>4N</sub> (Ensaio G60\*-2YE) e GDS<sub>6N</sub> (Ensaio G80\*-3YE).

Parâmetro	Meio de cultivo	
	G60*-2YE	G80*-3YE
$t_f$ (h)	28	27,8
$t_{x_m}$ (h)	25	27,9
$t_{p_m}$ (h)	12	15
$X_m$ (g/L)	10,7	12,1
$S_0$ (g/L)	70,0	88,8
$\Delta S$ (g/L)	70,0	88,8
$P_m$ (g/L)	36,9	48,1
$Y_{X/S}$ (g/g)	0,15	0,14
$Y_{P/S}$ (g/g)	0,53	0,54
R (%)	57,7	58,8
$Q_x$ (g/L/h)	0,43	0,44
$Q_p$ (g/L/h)	3,1	3,2
$\mu_m$ (h <sup>-1</sup> )	0,30	0,23

$t_f$  - Tempo total de fermentação;  $t_{x_m}$  - tempo para obtenção da máxima concentração celular;  $t_{p_m}$  - tempo para obtenção da máxima concentração de ácido glicônico;  $X_m$  - diferença entre a concentração celular em  $t_{x_m}$  e no início do cultivo;  $S_0$  - concentração inicial de glicose;  $\Delta S$  = total de glicose consumida;  $P_m$  - máxima concentração de produto;  $Y_{X/S}$  - fator de conversão de glicose em células;  $Y_{P/S}$  - fator de conversão de glicose em ácido glicônico; R - rendimento em ácido glicônico;  $Q_x$  - produtividade em células;  $Q_p$  - produtividade em ácido glicônico;  $\mu_m$  - máxima velocidade específica de crescimento.

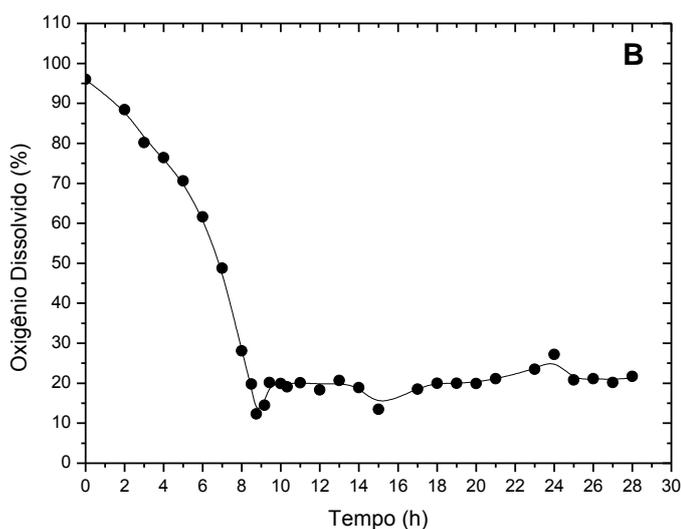
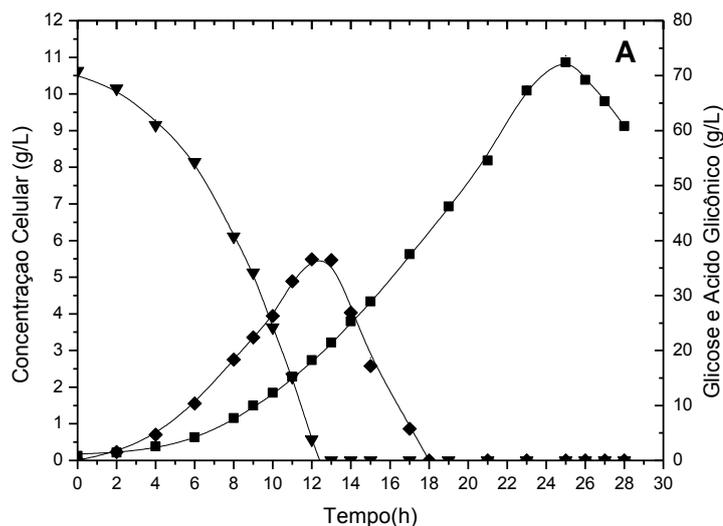


Figura 36 - Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G60\*-2YE.

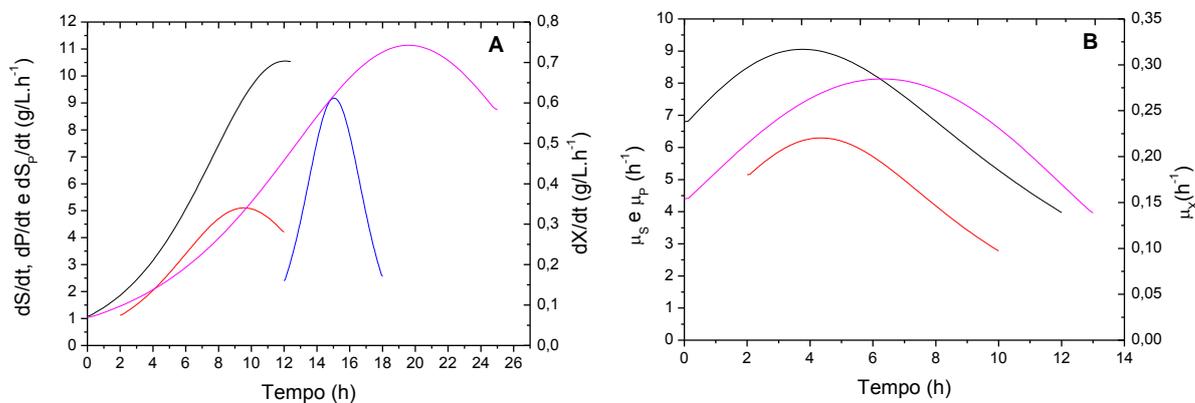


Figura 37 - Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G60\*-2YE.

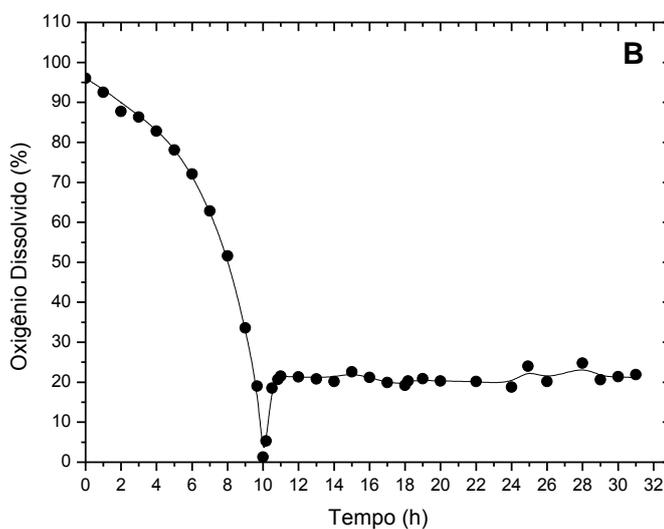
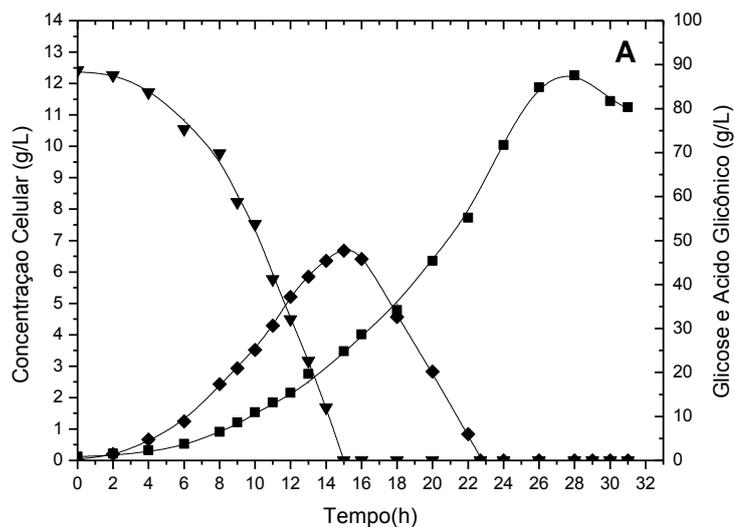


Figura 38 - Concentração de células (■), glicose (▼), ácido glicônico (◆) [A] e oxigênio dissolvido (•) [B] em função do tempo no ensaio G80\*-3YE.

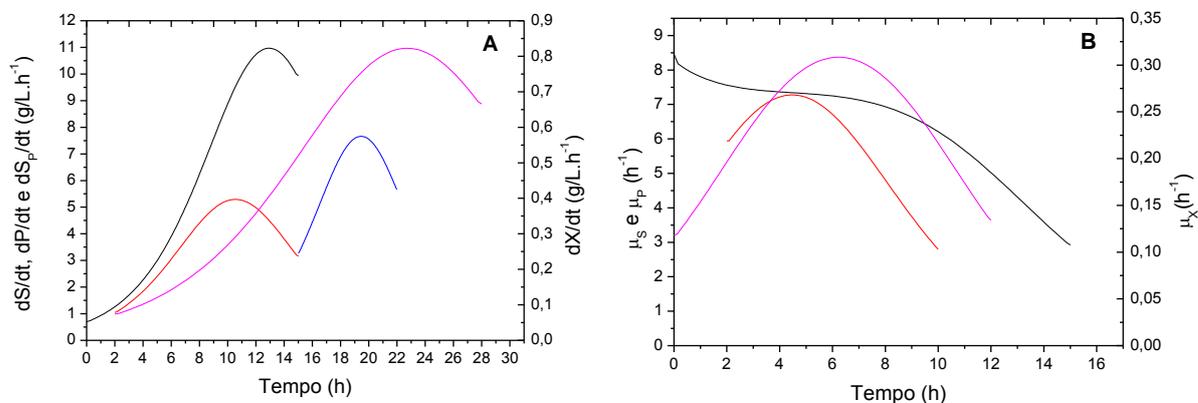


Figura 39 - Velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) (—), de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) (—), de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) (—), e de consumo de ácido glicônico ( $dS_P/dt$ ) (—) [A]; velocidades específicas de crescimento ( $\mu_X$ ) (—), de consumo de glicose ( $\mu_S$ ) (—), e de formação de ácido glicônico ( $\mu_P$ ) (—) [B] em função do tempo no ensaio G80\*-3YE.

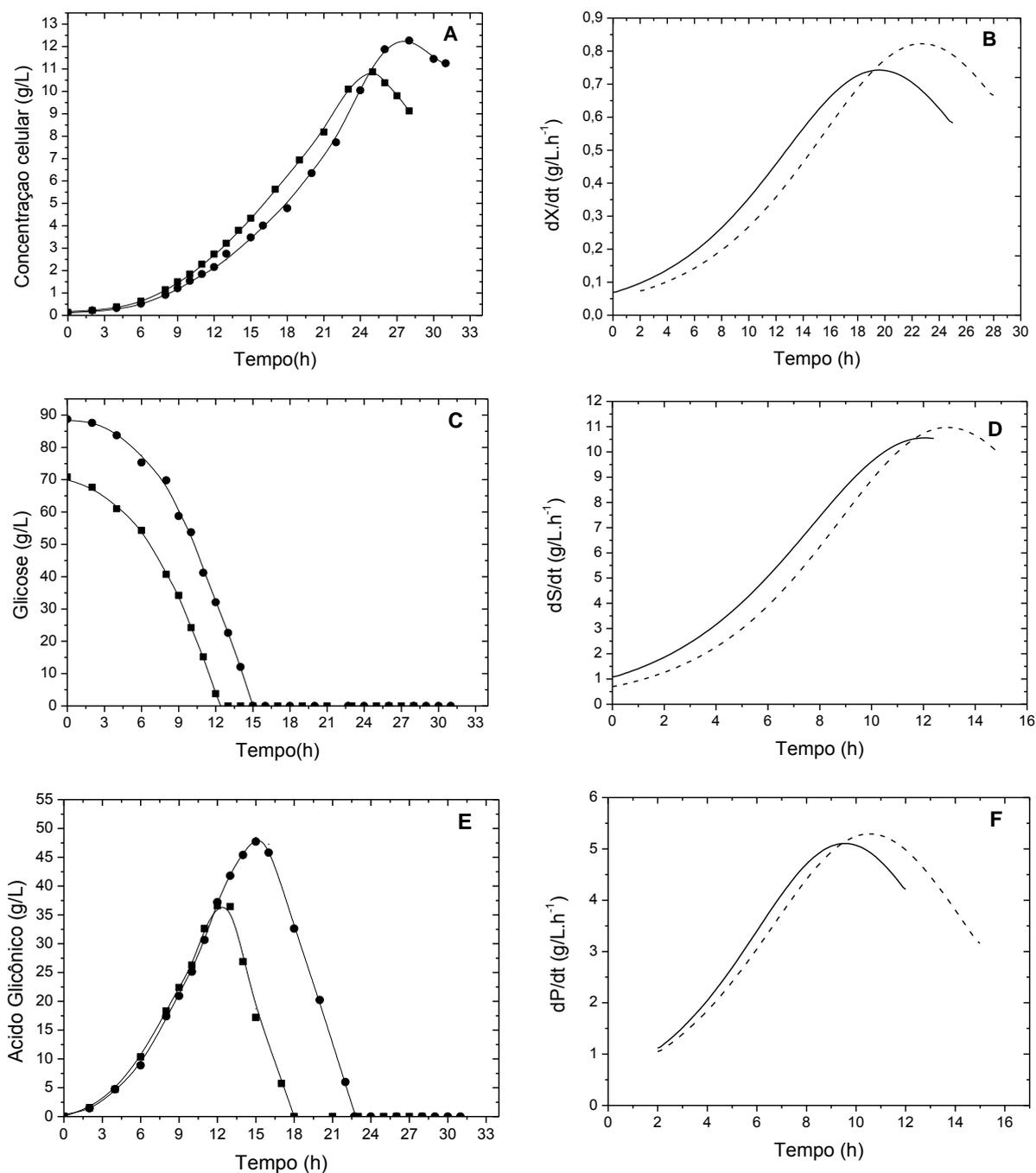


Figura 40 – Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E], e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) [D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo, nos Ensaio G60\*-2YE (■ —) e G80\*-3YE (● - - -).

Ao comparar os principais parâmetros de fermentação obtidos nos dois ensaios (Tabela 7), verificou-se que a maior concentração de glicose de G80\*-3YE levou ao aumento proporcional da concentração de ácido glicônico, de forma coerente com as velocidades de consumo do açúcar e de formação do composto, resultando em

rendimentos equivalentes. Da mesma forma, apesar da maior concentração (30%) de produto e maior (25%)  $t_{Pm}$ , os valores análogos de  $dS_P/dt$  permitiram a obtenção de uma produtividade em produto praticamente idêntica à de G60\*-2YE. O pequeno aumento ( $\cong 12\%$ ) da concentração celular final e de  $t_{xm}$ , em G80\*-3YE, garantiu valores de  $Y_{X/S}$  e de  $Q_X$  similares aos de G60\*-2YE, apesar do maior  $\Delta S$  no primeiro.

Estes resultados sugerem que a maior produção de biomassa em G80\*-3YE foi consequência da maior quantidade de extrato de levedura na formulação inicial do meio de cultivo. Ou seja, mesmo que a relação C:N tenha sido idêntica à de G60\*-2YE, outros fatores de crescimento, como vitaminas, estavam presentes em maior quantidade em G80\*-3YE, permitindo que a energia fosse aproveitada para geração de quantidade extra de biomassa. Isto indica que a qualidade da fonte complexa de nitrogênio, não só a quantidade, é também importante neste processo fermentativo.

Outros autores atribuíram ao extrato de levedura o papel de fonte importante de carbono e energia em culturas de bactérias, em função da quantidade abundante de vitaminas, minerais e aminoácidos presentes no composto. Os fatores de crescimento entram na composição das células ou funcionam como precursores dos constituintes celulares (Mignone e Avignone-Rossa, 1996; Matsumura *et al.*, 1999; Yamatsu *et al.*, 2006). As vitaminas fornecidas por extrato de levedura mostraram ser cofatores essenciais na via de síntese de acetato e para manter o crescimento de quatro espécies acetogênicas estudadas por Leclerc *et al.* (1998). Em fermentação em batelada descontínua com *Pseudomonas sp.*, bactéria com capacidade de biodegradação de polímero PVA (polyvinil álcool), Li *et al.* (2011) realizaram quatro pulsos de extrato de levedura ao longo da fermentação, verificando influência positiva sobre o crescimento celular e sobre a atividade da enzima PVA-ase, que degrada o polímero. Hu *et al.* (2011) constataram que três aminoácidos (glicina, serina e tirosina) presentes no extrato de levedura desempenham papel central na produção de PVAases. As vias de metabolismo destes e de inúmeros outros aminoácidos estão presentes em *G. diazotrophicus* (Lery *et al.* (2008).

A análise conjunta entre estes resultados e aqueles obtidos em G60\* e G80\* dá mais subsídios para esta interpretação. Comparando-se primeiramente a cinética de crescimento de G60\*-2YE com a de G60\* (Figura 41; Tabelas 5 e 7), cujo meio teve apenas 10% menos glicose, mas a metade da concentração de extrato de levedura, fica evidente o efeito negativo da escassez do nutriente. Verificaram-se diferenças

nas velocidades de consumo de glicose (Figura 41D), que, em G60\*, foram menores no início e ao final do período de metabolismo do açúcar. As velocidades de formação de ácido foram, por outro lado, discretamente mais altas neste ensaio (Figura 41F) e a concentração total do produto ligeiramente favorecida, implicando em maior rendimento (26%) que o de G60\*-2YE. Como o tempo necessário para a obtenção de  $P_m$  foi idêntico (12 h), a produtividade em ácido foi levemente favorecida neste último. Neste contexto, as curvas de crescimento foram absolutamente coincidentes nas primeiras 16 horas (Figura 41A), período que englobou o início do consumo do ácido e a fase linear ( $dX/dt=0,44$  g/L.h) em G60\* (Figura 41B). A partir daí, houve forte redução de  $dX/dt$  neste ensaio, verificando-se também menores velocidades de consumo do ácido. Em G60\*-2YE, ao contrário, a geração de maior quantidade de energia, em função dos maiores valores de  $dS_p/dt$ , e a maior disponibilidade de extrato de levedura, garantiram o aumento contínuo das velocidades de crescimento após a exaustão do ácido glicônico, e a fase linear de crescimento ocorreu em momento posterior e com velocidades médias muito superiores ( $dX/dt=0,72$  g/L.h). Esta situação permitiu a diminuição de  $t_{x_m}$  e o aumento expressivo (48%) da concentração celular, com ganho proporcional na produtividade em células. Ressalta-se também, os valores idênticos de  $\mu_m$  obtidos nestes ensaios, o que indica que a concentração de sólidos em G60\*-2YE não foi inibidora para o cultivo.

Ao comparar a cinética de G80\*-3YE com G80\* (Figura 42) verificaram-se algumas diferenças em relação ao comportamento descrito na avaliação de G60\*-2YE e G60\*. Os valores de  $dS/dt$  foram análogos até 7 horas de processo, mas depois disso houve grande defasagem entre as duas curvas, com valores máximos superiores em G80\*-3YE (Figura 42D) e esgotamento do substrato com 15 h de processo. As velocidades de formação de ácido não foram, no entanto, incrementadas na mesma proporção, mas, ao contrário, ficaram levemente inferiores às de G80\* (Figura 42F). Com isso, mesmo que uma concentração de glicose muito maior ( $\cong 39\%$ ) tenha sido consumida neste período, a produção total de ácido foi 15% menor ( $P_m=48,1$  g/L), impactando também negativamente o rendimento no produto. Por outro lado, como os valores de  $dS_p/dt$  foram ligeiramente maiores, a exaustão do produto ocorreu seis horas antes, resultando em um valor similar de  $Q_p$ . O emprego do triplo da concentração inicial de extrato de levedura, bem como o maior  $S_0$ , levaram à diminuição de  $\mu_m$  em G80\*-3YE. Porém, a inibição foi superada e as

velocidades de crescimento aumentaram progressivamente, atingindo a fase linear cerca de 3 horas após o início do metabolismo do ácido (Figura 42B). A máxima concentração celular foi, no entanto, similar à de G80\*, sem diferença importante entre os valores de  $t_{xm}$  e  $Q_x$ . Neste caso, portanto, ficou evidenciado que a quantidade extra da fonte complexa de nutrientes foi consumida ao longo do cultivo, evitando a desaceleração da velocidade de crescimento e a ocorrência das duas fases lineares observada em G80\* (Figura 42A). Ou seja, os dados reafirmam a hipótese feita na discussão dos resultados do ensaio G80\* (item 4.2.2), na qual o comportamento cinético da fermentação foi atribuído à escassez de nutrientes no meio.

Os rendimentos em ácido glicônico obtidos no trabalho são comparáveis a alguns resultados alcançados com *Gluconobacter oxydans*, uma das principais bactérias candidatas para substituir *A. niger* em escala comercial (Hermann *et al.*, 2004; Elfari *et al.*, 2005). Porém, os rendimentos em produtos nesta espécie bacteriana variam amplamente entre as diferentes estirpes e dependem, por outro lado, da forma e das condições específicas utilizadas para na fermentação. A influência do pH na formação do produto é significativa. Enquanto o pH ótimo para crescimento é 5,5, as enzimas responsáveis pelo metabolismo de gliconato são sensíveis à pH baixo (Silberbach *et al.*, 2003). De acordo com Attwood *et al.* (1991), o uso linhagens acidófilas e acidotolerantes, como *G. diazotrophicus*, pode aumentar a eficiência da formação do produto e deve ser considerada para aplicação em escala industrial.

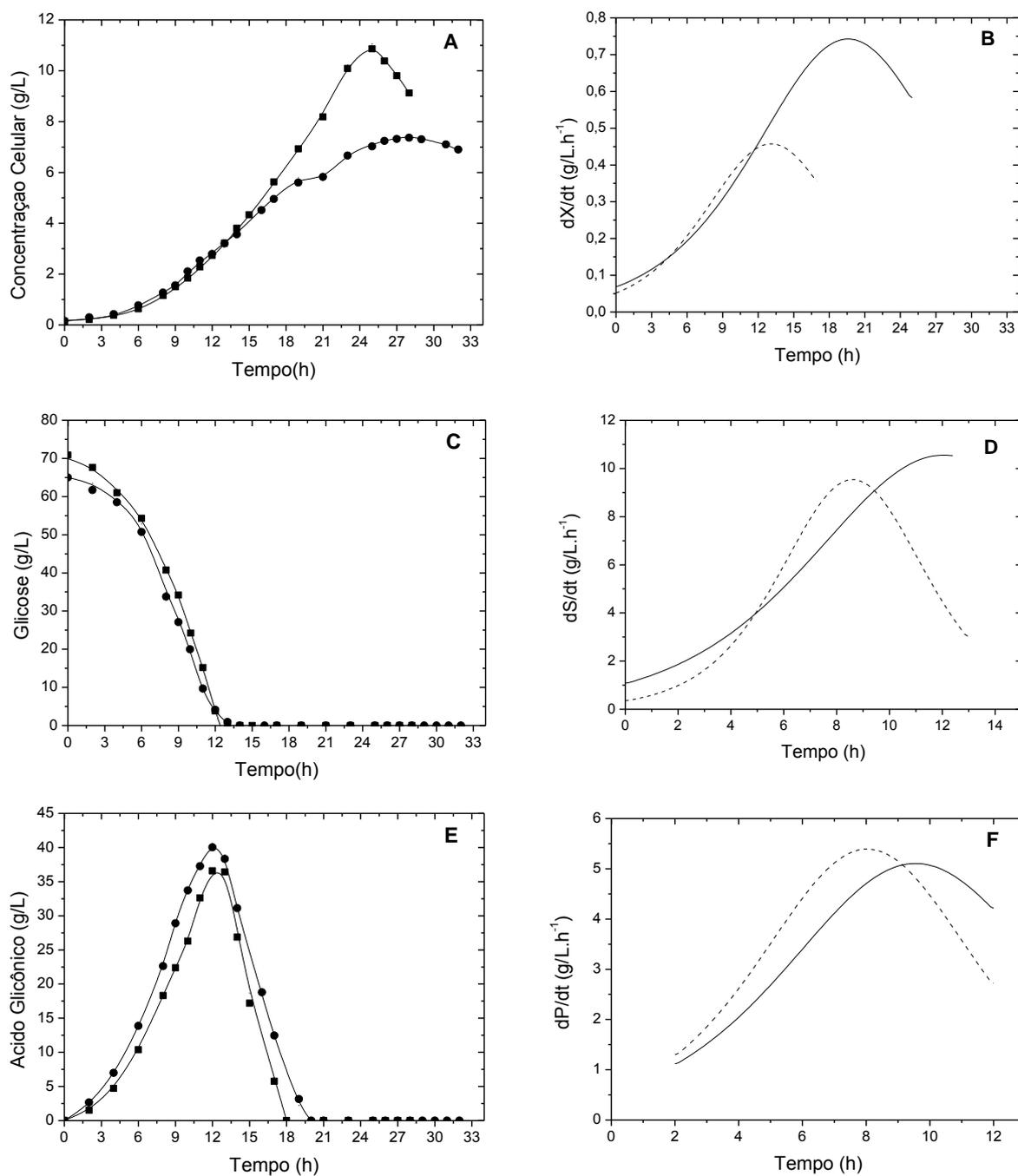


Figura 41 - Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E] e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) [D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo, nos Ensaios G60\*-2YE (■ —) e G60\* (• ---).

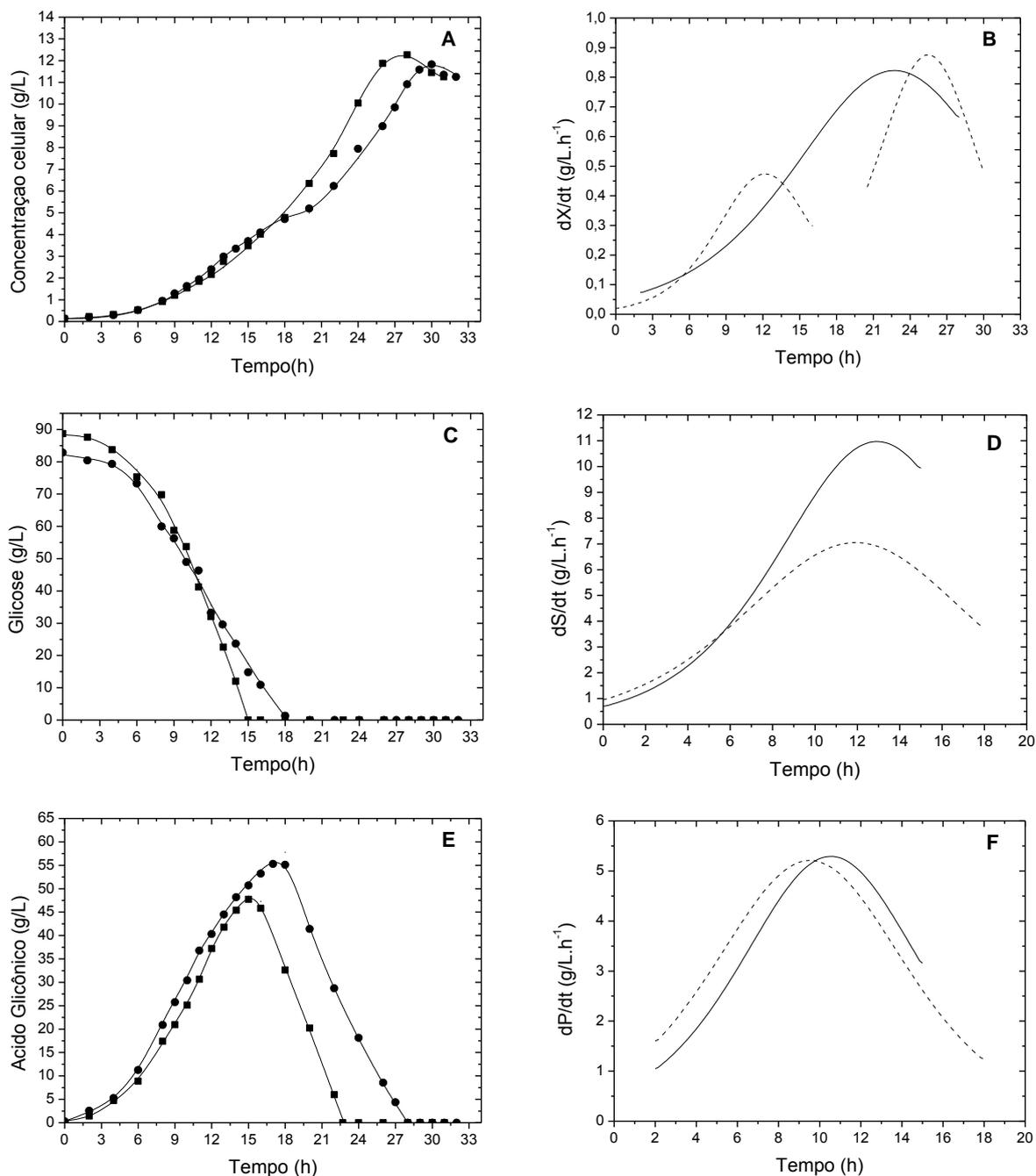


Figura 42 - Concentração de células [A], glicose [C] e ácido glicônico [E] e velocidades instantâneas de crescimento ( $dX/dt$ ) [B], de consumo de glicose ( $dS/dt$ ) [D] e de formação de ácido glicônico ( $dP/dt$ ) [F], em função do tempo, nos Ensaios G80\*-3YE (■ —) e G80\* (• - - -).

Uma análise dos resultados obtidos no trabalho permite concluir que, para a eventual aplicação tecnológica da bactéria *G. diazotrophicus* PAL5 em processos fermentativos voltados à produção de altas concentrações de biomassa, é conveniente utilizar meio composto com nutrientes orgânicos e glicose como fonte de carbono. A bactéria também pode ser explorada para a produção de ácido

glicônico, necessitando pra isso um estudo mais aprofundado do processo e a otimização das condições operacionais.

A Tabela 8 reúne os principais parâmetros relativos ao crescimento celular em algumas das condições testadas. O ensaio G40\*-2PGYE se destacou como a condição que permitiu obter a maior concentração celular, a maior conversão de glicose em células e a maior produtividade em células. O total de glicose utilizado neste ensaio foi 90,7 g/L, concentração similar às empregadas nos ensaios G80\* e G80\*-3YE, nos quais foram obtidas concentrações celulares 21 e 26% menores, respectivamente. A concentração de extrato de levedura em G40\*-2PGYE é a mesma empregada em G80\*-3YE, mas é, no entanto, três vezes maior que a de G80\*. Por outro lado, em G140\*-PYE, em que foi obtida concentração de células similar à de G80\*-3YE e mesma produtividade em células que em G40\*-2PGYE, o consumo total de glicose foi muito maior (140 g/L), mas a concentração de extrato de levedura foi 1/3 daquela empregada nestes ensaios. Assim, a escolha da condição a ser empregada no processo dependerá não só do custo e quantidade dos dois componentes principais do meio, glicose e extrato de levedura, mas dos rendimentos em células obtidos em cada um. Como o preço é afetado por condições econômicas, a avaliação dependerá, de qualquer forma, do momento específico de análise de viabilidade econômica. Como os dados do presente trabalho estão incluídos numa Patente do Processo Tecnológico (Berbert-Molina *et al.*, 2009), estes aspectos deverão ser levados em consideração por um eventual usuário da tecnologia desenvolvida.

Tabela 8 - Principais parâmetros de fermentação relacionados ao crescimento de *G. diazotrophicus* PAL5 obtidos em diferentes ensaios.

Ensaio	Parâmetros de Processo			
	$\Delta S$	$X_m$	$Y_{x/s}$	$Q_x$
<b>G60*</b>	64,0	7,2	0,17	0,29
<b>G60*-2YE</b>	70,0	10,7	0,15	0,43
<b>G80*</b>	82,0	11,6	0,14	0,39
<b>G80*-3YE</b>	88,8	12,1	0,14	0,44
<b>G40*-2PGYE</b>	90,7	14,6	0,16	0,57
<b>G140*-PYE</b>	140,0	12,6	0,09	0,57

## 5. CONCLUSÕES

- O cultivo de *G. diazotrophicus* é fortemente afetado pela transfrência de oxigênio no meio;
- Em cultivo sem limitação de oxigênio e S0 entre 40 e 120 g/L, a maior concentração celular, a maior produtividade em células e o máximo rendimento em ácido glicônico foram obtidos com 80 g/L de glicose;
- Extrato de levedura e sua concentração no meio são fundamentais para obtenção de altas densidades celulares. A melhor estratégia para a condução do processo é sua adição, em mistura com glicose, no curso da fermentação., o que permite maiores velocidades de crescimento, concentração celular e produtividade em células. No entanto, essa condição não favorece o rendimento em ácido;
- A redução da relação carbono:nitrogênio inicial do meio de cultivo não permitiu melhora das concentrações celulares, que foram, ao contrário, inferiores, embora o rendimento em ácido glicônico tenha sido ligeiramente maior;
- As concentrações de células obtidas no trabalho são muito superiores a qualquer valor já descrito para a bactéria e as concentrações de ácido glicônico são comparáveis às obtidas por outras bactérias de interesse industrial;
- *G. diazotrophicus* tem enorme potencial para a produção industrial de inoculantes agrícolas e ácido glicônico. Os processos fermentativos desenvolvidos no trabalho são versáteis na medida em que permitem escolher a condição operacional que favorece uma ou outra rota biotecnológica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adachi, O.; Moonmangmee, D.; Toyama, H.; Yamada, M.; Shinagawa, E.; Matsushita, K. New developments in oxidative fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.60, p.643–653, 2003.

Alquéres, S.; Cardoso, A.; Brito-Moreira, J.; Baldani, J.; Martins, O. Transfer RNA-dependent asparagine biosynthesis in *Gluconacetobacter diazotrophicus* and its influence on biological nitrogen fixation. *Plant and Soil*, v.356, n.1-2, p.209-216, 2012.

Alquéres, S.; Meneses, C.; Rouws, L.; Rothballer, M.; Baldani, I.; Schmid, M.; Hartmann, A. The Bacterial Superoxide Dismutase and Glutathione Reductase Are Crucial for Endophytic Colonization of Rice Roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.26, n.8, p.937-945, 2013.

Alquéres, S.M.C.; Oliveira, J.H.M.; Nogueira, E.M.; Guedes, H.V.; Oliveira, P.L.; Câmara, F.; Baldani, J.I.; Martins, O.B. Antioxidant pathways are up-regulated during biological nitrogen fixation to prevent ROS-induced nitrogenase inhibition in *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Archives of Microbiology*, v.192, n.10, p.835-841, 2010.

Alvarez, B.; Martinez-Drets, G. Metabolic characterization of *Acetobacter diazotrophicus*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 41, n. 10, p. 918-924, 1995.

Anastassiadis, S.; Aivasidis, A.; Wandrey, C.; Rehm, H.J. Process optimization of continuous gluconic acid fermentation by isolated yeast-like strains of *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnology and Bioengineering*, v.91, p494-501, 2003.

Araújo, F. F.; Santos Junior, J. D. Desenvolvimento e nutrição de milho em solo degradado biofertilizado com fosfato natural, enxofre e *Acidithiobacillus*. *Revista da Caatinga*, v. 22, n. 1, p. 98-103, 2009.

Ash, C.; Jasny, B.R.; Malakoff, D.A.; Sugden, A.M., Feeding the future. *Science*, v.327, p.797, 2010.

Ashbolt, N.J.; Inkerman, P.A. Acetic Acid Bacterial Biota of the Pink Sugar Cane Mealybug, *Saccharococcus sacchari*, and Its Environs. *Applied and Environmental Microbiology*, v.56, p.707-712, 1990.

Attwood, M. M., Vandijken, J.P., Pronk, J.T. Glucose-Metabolism and Gluconic Acid Production by *Acetobacter-diazotrophicus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v.72, n.2, p.101-105. 1991.

Azevedo, J.L.; Maccheroni Jr., W.; Araújo, W.L.; Pereira, J.O. Microrganismos endofíticos e seu papel em plantas tropicais. In: Serafini, L.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. (orgs). *Biotecnologia: Avanços na Agricultura e na Agroindústria*. Caxias do Sul, EDUCS, p. 197-232, 2002.

Baldani, J.I.; Caruso, L.; Baldani, V.L. D.; Goi, S. R.; Döbereiner, J. Recent advances in FBN with non-legume plants. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 29, n. 5-6, p. 911-922, 1997.

Baldani, J.I.; Baldani, L.D.V. History on the biological nitrogen fixation research in graminaceous plants: special emphasis on the Brazilian experience. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.77, p.549-579, 2005.

Baldani, J.I.; Reis, V.M.; Teixeira, K.R.S.; Baldani, V.L.D. Potencial biotecnológico de bactérias diazotróficas associativas e endofíticas. In: *Biotecnologia: Avanços na agricultura e na agroindústria*. (Atti Serafini, L.; Barros, N. M. & Azevedo, J .L. orgs.) Caxias do Sul, EDUCS, p.197-232, 2002.

Bastian, F.; Cohen, A.; Piccoli, P.; Luna, V.; Baraldi, R.; Bottini, R. Production of indole-3-acetic acid and gibberellins A1 y A3 by *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum seropedicae* in chemically-defined culture media. *Plant Growth Regulation*. v.24, p.7-11, 1998.

Benizri, E.; Baudoin, E.; Guckert, A. Root colonization by inoculation plant growth-promotion rhizobacteria. *Biocontrol Science and Technology*, v. 11, p. 557-574, 2001.

Berbert-Molina, M.A.; Nunes, M.C.O.; Boniolo, F.S. Processo Tecnológico para a produção de biomassa bacteriana e produtos de fermentação de *Gluconacetobacter diazotrophicus*. 2009, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: PI09176667, data de depósito: 21/12/2009, Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Bertalan, M.; Albano, R.; De Pádua, V.; Rouws, L.; Rojas, C.; Hemerly, A.; Teixeira, K.; Schwab, S.; Araujo, J.; Oliveira, A.; França, L.; Magalhães, V.; Alquéres, S.; Cardoso, A.; Almeida, W.; Loureiro, M. M.; Nogueira, E.; Cidade, D.; Oliveira, D.; Simão, T.; Macedo, J.; Valadão, A.; Dreschel, M.; Freitas, F.; Vidal, M. Guedes, H.; Rodrigues, E.; Meneses, C.; Brioso, P.; Pozzer, L.; Figueiredo, D.; Montano, H.; Junior, J.; Filho, G.; Flores, V.; Ferreira, B.; Branco, A.; Gonzalez, P.; Guillobel, H.; Lemos, M.; Seibel, L.; Macedo, J.; Alves-Ferreira, M.; Sabetto-Martins, G.; Coelho, A.; Santos, E.; Amaral, G.; Neves, A.; Pacheco, A. B.; Carvalho, D.; Lery, L.; Bisch, P.; Rössle, S. C.; Ürményi, T.; Von Krüger, W.; Martins, O.; Baldani, J. I.; Ferreira, P. C. G. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. *BMC Genomics*, v.10, n.450, p.1-17, 2009.

Bettiol, W. Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 5, p. 59-97, 1997.

Boddey R.M.; Döbereiner J. Nitrogen fixation associated with grasses and cereals: recent progress and perspectives for the future. *Fertilizer Research*, v.42, p.241-250, 1995.

Boddey, R.M.; de Oliveira, O. C.; Urquiaga, S.; Reis, V. M.; de Olivares F. L.; Baldani, V. L. D.; Döbereiner, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: Contributions and prospects for improvement. *Plant and Soil*, v.174, p.195-209, 1995.

Boddey, R. M.; Urquiaga, S.; Alves, B. J. R.; Reis, V. Endophytic nitrogen fixation in sugarcane: present knowledge and future applications. *Plant Soil*, v. 252, n. 1, p. 139-149, 2003.

Boddey, R. M.; Urquiaga, S.; Reis, V.; Döbereiner, J. Biological nitrogen fixation associated with sugar cane. *Plant Soil*, v.137, p.111-117,1991.

Boniolo, F.S.; Rodrigues, R.C.; Delatorre, E.O.; Silveira, M.M.; Flores, V.M.Q.; Berbert-Molina, M.A. Glycine betaine enhances growth of nitrogen-fixing bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 under saline stress conditions. *Current Microbiology*, v.59, n. 6, p. 593-599, 2009.

Bucher, C.A.; Reis, V.M. Biofertilizante contendo bactérias diazotróficas. Seropédica: *Embrapa Agrobiologia*, 17 p. (Embrapa Agrobiologia, Documentos 247), 2008.

Burris, R.H. Comparative-Study of the Response of *Azotobacter vinelandii* and *Acetobacter diazotrophicus* to Changes in pH. *Protoplasma*, v. 183, n. 1-4, p.62-66, 1994.

Burris, R.H. Nitrogen fixation assay-methods and techniques. *Methods in Enzymology*, v.24B, p.415-431, 1972.

Caballero-Mellado, J. Natural association of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and diazotrophic *Acetobacter peroxydans* with wetland rice. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 28, n. 3, p. 277-286, 2005.

Caballero-Mellado, J.; Martín-Romero, E. Limited genetic diversity in the endophytic sugarcane bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 60, p. 1531–1537, 1994.

Carvalho, T.L.G.; Balsemao-Pires, E.; Saraiva, R.M.; Ferreira, P.C.G.; Hemerly, A.S. Nitrogen signalling in plant interactions with associative and endophytic diazotrophic bacteria. *Journal of Experimental Botany*, v.65, n.19, SI, p.5631-5642, 2014.

Cavalcante, V.A.; Döbereiner, J. A New Acid-Tolerant Nitrogen-Fixing Bacterium Associated with Sugarcane. *Plant Soil*, v.108, n.1, p.23-31, 1988.

Cojho, E.H.; Reis, V.M.; Schnberg, A.C.G.; Döbereiner, J. Interactions of *Acetobacter diazotrophicus* with an amylolytic yeast in nitrogen-free batch culture. *FEMS Microbiology Letters*, v. 106, p. 341–346, 1993.

da Silva, M.F.; Antonio, C.S.; de Oliveira, P.J.; Xavier, G.R.; Rumjanek, N.G.; Soares, L.H.B.; Reis, V.M. Survival of endophytic bacteria in polymer-based inoculants and efficiency of their application to sugarcane. *Plant and Soil*, v.356, n.1-2, p.231-243, 2012.

Danese, P.N.; Pratt, L.A., Kolter, R. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology*, v.182, p.3593-3596, 2000.

Deaker, R.; Roughley, R. J.; Kennedy, I. R. Legume seed inoculation technology - a review. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 36, p. 1275–1288, 2004.

Demain, A.L.; Adrio, J.L. Contributions of Microorganisms to Industrial Biology. *Molecular Biotechnology*, v. 38, p. 41–55, 2008.

Deppenmeier, U.; Hoffmeister, M.; Prust, C. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.60, p.233–242, 2002.

Döbereiner, J. History and new perspectives of diazotrophs in association with non-leguminous plants. *Symbiosis*, v.13, p.1-13, 1993.

Dong, Z.; Canny, M.J.; Mccully, M.E.; Roboredo, M.R.; Cabadilla, C.F.; Ortega, E.E.; Rodes, R. A Nitrogen-Fixing Endophyte of Sugarcane Stems (A New Role for the Apoplast). *Plant Physiology*, v.105, n.4, p.1139-1147, 1994.

Dong, Z.; Mccully, M.E.; Canny, M.J. Does *Acetobacter diazotrophicus* live and move in the xylem of sugarcane stems? Anatomical and physiological data. *Annals of Botany*, v. 80, n. 2, p.147-158, 1997.

Downs, D.M. Understanding microbial metabolism. *Annual Review of Microbiology*, v. 60, p. 533-559, 2006.

Dunne, W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clinical Microbiology Reviews*, v.15, p.155-166, 2002.

Elfari, M.; Ha, S.-W.; Bremus, C.; Merfort, M.; Khodaverdi, V.; Herrmann, U.; Sahm, H.; Görisch, H. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, p. 668–674, 2005.

Ernandes, F.M.P.G.; Garcia-Cruz, C.H. Levana bacteriana: aspectos tecnológicos, características e produção. *Semina: Ciências Agrárias*, v.26, n.1, p.71-82, 2005.

Erzinger, G.S.; Silveira, M.M.; da Costa; J.P.C.L.; Vitolo, M.; Jonas, R. Activity of glucose-fructose oxidoreductase in fresh and permeabilised cells of *Zymomonas mobilis* grown in different glucose concentrations. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.34, n.4, 2003.

Flores-Encarnacion, M.; Contreras-Zentella, M.; Soto-Urzuva, L.; Aguilar, G.R.; Baca, B.E.; Escamilla, J.E. The respiratory system and diazotrophic activity of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5. *Journal Bacteriology*, v.181, n.22, p.6987-6995, 1999.

Fuentes-Ramirez, L.E.; Jimenez Salgado, T.; Abarcao Campo, I.R.; Caballero-Mellado, J. *Acetobacter diazotrophicus*, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. *Plant Soil*, v. 154, n. 2, p.145-150, 1993.

Gaden Jr., E. L. Fermentation kinetics and productivity. *Chemical Industry*, v. 7, p.154, 1955.

Galar, M.L.; Boiardi, J.L. Evidence for a Membrane-Bound Pyrroloquinoline Quinone Linked Glucose Dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.43, n.4, p.713-716, 1995.

Gillis, M.; Kersters, K; Hoste, B.; Janssens, D.; Kroppenstedt, R.M.; Stephan, M.P.;

Teixeira K.R.S.; Döbereiner, J.; De Ley, J. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a Nitrogen-Fixing Acetic Acid Bacterium Associated with Sugarcane. *International Journal Of Systematic Bacteriology*, v.39, n.3, p.361-364, 1989.

Gomes-Manzo, S.; Contreras-Zentella, M.; Gonzalez-Valdez, A.; Sosa-Torres, M.; Arreguin-Espinoza, R.; Escamilla-Marvan, E. The PQQ-alcohol dehydrogenase of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *International Journal of Food Microbiology*, v. 125, p. 71–78, 2008.

Gupta, A; Singh, V.K.; Qazi, G.N.; Kumar, A. *Gluconobacter oxydans*: its biotechnological applications. *J. Mol Microbiol Biotechnol*, v.3, p.445-456, 2001.

Hernández, L.; Arrieta, J.; Menéndez, C.; Vazquez, R.; Coego, A.; Suárez, V.; Selman, G.; Petit-Glatron, M. F. Isolation and enzymic properties of levansucrase secreted by *Acetobacter diazotrophicus* SRT4, a bacterium associated with sugar cane. *The Biochemical Journal*, v. 309, n. 1, p. 113-118, 1995.

Herrmann, U.; Merfort, M.; Jeude, M.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacteroxydans* DSM 2343. *Applied Microbiology and Biotechnology* v. 64, p. 86-90, 2004.

Hu, Z.Y.; Du, G.C. Hua, Z.Z.; Chen, J. Effect of different carbon and nitrogen sources on PVA degradation in a mixed culture and PVA degradation mechanism. *Journal of Food Science and Biotechnology*, v.25, n.6, p.73-78, 2006.

Ikeda, Y.; Park, E.Y.; Okuda, N. Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, v.97, p.1030-1035, 2006

Intorne, A.C.; Oliveira, M.V.V.; Lima, M. F.; Silva, J.F.; Olivares, F.L.; Souza Filho, G.A. Identification and characterization of *Gluconacetobacter diazotrophicus* mutants defective in the solubilization of phosphorus and zinc. *Archives of Microbiology*, v. 191, p. 477–483, 2009.

James, E.K. Nitrogen fixation in endophytic and associative symbiosis. *Field Crops Research*, v.65, p.197-209. , 2000.

James, E.K.; Olivares, F.L. Infection and colonization of sugar cane and other gramineous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences*, v.17, p.77-119, 1998.

James, E.K.; Olivares, F.L.; De Oliveira, A.L.; Dos Reis, F.B.Jr.; Da Silva, L.G.; Reis, V.M. Further observations on the interaction between sugar cane and *Gluconacetobacter diazotrophicus* under laboratory and greenhouse conditions. *Journal of Experimental Botany*, v. 52, n. 357, p. 747-760, 2001.

James, E.K.; Reis, V.M.; Olivares, F.L.; Baldani, J.I.; Döbereiner, J. Infection of Sugar-Cane by the Nitrogen-Fixing Bacterium *Acetobacter-Diazotrophicus*. *Journal of Experimental Botany*, v.45, n.275, p.757-766, 1994.

Jiménez-Salgado, T.; Aparicio Fabr e, R.; Caballero-Mellado, J. Detecci n de citocininas en *Acetobacter diazotrophicus* aislado de ca a de az car. XVII Reuni n

Latinoamericana de Rhizobiología. La Habana, Cuba. 1994.

Jimenez-Salgado, T.; Fuentes-Ramirez, L. E.; Tapia-Hernández, A.; Mascarua-Esparza, M. A.; Martinez-Romero, E.; Caballero-Mellado, J. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus*, and isolation of other nitrogen-fixing acetobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 9, p. 3676-3683, 1997.

Kirchhof, G.; Baldani, J.I.; Reis, V.M.; Hartmann, A. Molecular assay to identify *Acetobacter diazotrophicus* and detect its occurrence in plant tissues. *Canadian Journal of Microbiology*, v.44, p.12-19, 1998.

Krajewski V.; Simic, P.; Mouncey N.J.; Bringer S, Sahm H, Bott M. Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* for improved growth rate and growth yield on glucose by elimination of gluconate formation. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 13, p. 4369-4376, 2010.

Laue, H.; Schenk, A; Li, H.; Lambertsen, L.; Neu, T.R.; Molin, S.; Ullrich, M.S. Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology*, v.152, p. 2909-2918, 2006.

Leclerc, M.; Elfoul-Bensaid, L.; Bernalier, A. Effect of yeast extract on growth and metabolism of H<sub>2</sub>-utilizing acetogenic bacteria from the human colon. *Current Microbiology*, v.37, p. 166-171, 1998.

Lerner, A.; Castro-Sowinski, S.; Lerner, H.; Okon, Y.; Burdman, S. Glycogen phosphorylase is involved in stress endurance and biofilm formation in *Azospirillum brasilense* Sp7. *FEMS Microbiology Letters*, v. 300, p. 75-82, 2009.

Lery, L.M.S.; Coelho, A.; Von Kruger, W.M.A.; Gonçalves, M.S.M.; Santos, M.F.; Valente, R.H.; Santos, E.O.; Rocha, S.L.G.; Perales, J.; Domont, G.B.; Teixeira, K.R.S.; Bisch, P.M. Protein expression profile of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5, a sugarcane endophytic plant growth-promoting bacterium. *Proteomics*, v. 8, n.8, p. 1631–1644, 2008.

Lery, L.M.S.; VonKruger, W.M.A.; Viana, F.C, Teixeira, K.R.S.; Bisch, P.M. A comparative proteomic analysis of *Gluconacebacter diazotrophicus* PAL5 at exponential and stationary phases of cultures in the presence of high and low levels of inorganic nitrogen compound. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1784, p.1578-1589, 2008.

Li, M.; Liao, X.; Zhang, D.; Du, G.; Chen, J. Yeast extract promotes cell growth and induces production of polyvinyl alcohol-degrading enzymes. *Enzyme Research*, 2011, Article ID 179819, 8 p. doi:10.4061/2011/179819. Disponível em: file:///C:/Users/Mar%C3%ADlia/Downloads/Yeast%20Extract%20Promotes%20Cell%20Growth%20and%20Induces%20%20Production.pdf. Acessado em: 20 de jul de 2015.

Li, R.P.; MacRae, I.C. Specific association of diazotrophic acetobacters with sugarcane. *Soil Biology and Biochemistry*, v.23, p.999-1002, 1991.

Liu, J.-Z.; Weng, L.-P.; Zhang, Q.-L.; Xu, H.; Ji, L.-N. A mathematical model for

gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, v.14, p.137-141, 2003.

Luna, M.F.; Galar, M.L.; Area, J.; Molinari, M.L.; Boiardi, J.L. Colonization of sorghum and wheat by seed inoculation with *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Biotechnology Letters*, publicação online, 2010, disponível em <[www.springerlink.com/index/a83237jvp5l3t40u.pdf](http://www.springerlink.com/index/a83237jvp5l3t40u.pdf)>. Acesso em 18 de abril de 2015.

Luna, M.F.; Aprea, J.; Crespo, J. M.; Boiardi, J.L. Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Applied Soil Ecology*, v.61, p. 225-229, 2011.

Luna, M.F.; Bernardelli, C.E.; Galar, M.L.; Boiardi, J.L. Glucose metabolism in batch and continuous cultures of *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL3. *Current Microbiology*. v.52, n.3, p.163-168, 2006.

Luna, M.F.; Boiardi, J.L. Growth yields and glucose metabolism of N<sub>2</sub>-fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus* at different culture pH values. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.24, p.587–590, 2008.

Luna, M.F.; Mignone, C.F.; Boiardi, J.L. The carbon source influences the energetic efficiency of the respiratory chain of N<sub>2</sub>-fixing *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.54, n.4, p.564-569, 2000.

Luna, M.F. Bernardelli, C.E.; Mignone, C.F.; Boiardi, J.L. Energy Generation by Extracellular Aldose Oxidation in N<sub>2</sub>-Fixing *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, v.68, p. 2054–2056, 2012.

Magalhães, F.M.; Baldani, J.I.; Souto, S.M.; Kuykendall, J.R.; Döbereiner, J. A new acid-tolerant *Azospirillum* species. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 55, n. 4, p. 417-430, 1983.

Magnani, G.S.; Diversidade de bactérias endofíticas em cana de açúcar. *Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica)*. UFPR – Curitiba, 2005.

Maiorano, A.E.; Piccolli, R.M.; da Silva, E.S.; de Andrade Rodrigues, M.F. Microbial production of fructosyltransferases for synthesis of pre-biotics. *Biotechnology Letters*, v.30, p. 1867-1877, 2008.

Malvessi, E.; Carra, S.; da Silveira, M.M.; Ayub, M.A.Z. Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose-fructose oxidoreductase/glucono-delta-lactonase present in calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. *Biochemical Engineering Journal*, v.51, p.1-6, 2010.

Mamlouk, D.; Gullo, M. Acetic Acid bacteria: physiology and carbon sources oxidation. *Indian Journal of Microbiology*, v.53, p.377-384, 2013.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. Projeções do Agronegócio no Brasil: 2009/2010 a 2019/2020. Brasília : Mapa/ACS, 2ª edição, 2010. 76 p.

Mariano, R.L.R.; Silveira, e. B.; Assis, S.M.P.; Gomes, A.M. A.; Nascimento, A.R.P.;

Donato, V.M.T.S. Importância de bactérias promotoras de crescimento e de biocontrole de doenças de plantas para uma agricultura sustentável. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica*, v.1, p. 89-111, 2004.

Marin, V.A.; Baldani, V.L.D.; Teixeira, K.R.S.; Baldani, J.I.; Fixação Biológica de Nitrogênio: Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de Importância para a Agricultura Tropical. *Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia Documento 091*, 1999, 32 p.

Matsumura, S.; Tomizawa, N.; Toki, A.; Nishikawa, K.; Toshima, K. Novel poly (vinyl alcohol)-degrading enzyme and the degradation mechanism. *Macromolecules*, v.32, n.23, p. 7753-7761, 1999.

Matsushita, K.; Toyama, H.; Adachi, O. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, v. 36, p.247–301, 1994.

Matsushita, K.; Toyama, H.; Adachi, O. Respiratory chains in acetic acid bacteria: membrane bound periplasmic sugar and alcohol respirations. In: Zannoni D, editor. *Respiration in archaea and bacteria, advances in photosynthesis and respiration*. Dordrecht: Springer, p. 81–99, 2004.

Matzerath, I.; Kläui W.; Klasen, R.; Sahm, H. Vanadate catalysed oxidation of 5-keto-D-gluconic acid to tartaric acid: the unexpected effect of phosphate and carbonate on rate and selectivity. *Inorganica Chimica Acta*, v. 237, p.203–205, 1995.

Mehnaz, S.; Lazarovits, G. Inoculation effects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. *Microbial Ecology*, v. 3, p. 326–335, 2006.

Merfort, M.; Herrmann, U.; Bringer-Meyer, S.; Sahm, H. High-yield 5-keto-D-gluconic acid formation is mediated by soluble and membrane-bound gluconate-5-dehydrogenases of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbial and Cell Physiology*, v. 73, p. 443-451, 2006.

Mignone, C.F.; Avignone-Rossa, C. Analysis of glucose carbon fluxes in continuous cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 46, p. 78 – 84, 1996.

Molinari, M.L.; Boiardi, J.L. Levans production by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.16, <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue3-fulltext-9>, 2013.

Muñoz Rojas, J.; Caballero Mellado, J. *Gluconacetobacter diazotrophicus*, modelo de bacteria endófitas. In: Martínez Romero, E, Martínez Romero, J.C. (Ed.) *Microbios en Línea*. México: Editora da Universidad Autónoma de México, 2ª ed., Cap. 9, p.157-176, 2001. Disponível em: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/UNAM,México>. Acessado em: 20 de setembro de 2014.

Muñoz-Rojas, J.; Caballero-Mellado, J. Population dynamics of *Gluconacetobacter diazotrophicus* in sugarcane cultivars and its effect on plant growth. *Microbial Ecology*, v. 46, p. 454-464, 2003.

Mussatto, S.I.; Mancilha, I.M. Non-digestible oligosaccharides: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 68, p. 587-597, 2007.

Muthukumarasamy, R.; Revathi, G.; Lakshminarasimhan, C. Influence of N fertilisation on the isolation of *Acetobacter diazotrophicus* and *Herbaspirillum* spp. from Indian sugarcane varieties. *Biology and Fertility of Soils*, v. 29, p. 157–164, 1999.

Muthukumarasamy, R.; Revathi, G.; Seshadri, S.; Lakshminarasimhan, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*, v.83, p.137-145, 2002.

Muthukumarasamy, R.; Revathi, G.; Seshadri, S.; Lakshminarasimhan, C. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*, v.83, p.137-145, 2002.

Nieto-Peñalver C.G.; Savino, M.J.; Bertini, E.V.; Sánchez, L.A.; de Figueroa, L.I.C. Gluconic acid produced by *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 possesses antimicrobial properties. *Research in Microbiology*, v.165, n.7, p.549-558, 2014.

NOVA CANA. Produção de cana-de-açúcar no Brasil (e no mundo). Disponível em:<http://www.novacana.com/cana-de-acucar/producao-cana-de-acucar-brasil-e-mundo/>. Acessado em: 10 out 2015.

Nunes, F.S.; Raimondi, A.C.; Niedwieski, A.C. Fixação de nitrogênio: estrutura, função e modelagem bioinorgânica das nitrogenases. *Química Nova*, v. 26, n. 6, p. 872-879, 2003.

Nunes, M.C.O. Análise Cinética do Cultivo de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5 em cultivo submerso. *Dissertação (Biociências e Biotecnologia)* – UENF, Campos dos Goytacazes, 2010.

Olivares, F. L. Microrganismos promotores do crescimento vegetal: desafios e perspectivas na agricultura brasileira. XXXI Congresso Brasileiro de Ciência do Solo, Gramado - RS, 2007. Disponível em: <[http://www6.ufrgs.br/cbcs/trabalhos/simposios/simp\\_012.pdf](http://www6.ufrgs.br/cbcs/trabalhos/simposios/simp_012.pdf)>. Acesso em 10 de fevereiro de 2009.

Olivares, F.L.; Reis, V.M.; FAÇANHA, A.R. The role of endophytic diazotrophs in sugarcane root morphogenesis and development. In: Finan T. M., O'Brian M. R., Layzell, D. B.; Vessey, J. K. and Newton, W. (Eds), Nitrogen fixation: global perspectives. Oxon: *CAB International*, p. 476-477, 2002.

Oliveira, A.L.M.; Stoffels, M.; Schmid, M.; Reis, V.M.; Baldani, J. I.; Hartmann, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. *European Journal of Soil Biology*, v. 45, p. 106–113, 2009.

Oliveira, A.L.M.; Urquiaga, S.; Baldani, J.I. Processos e mecanismos envolvidos na influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: *Embrapa Agrobiologia* Documento 161, 2003, 40 p.

Oliveira, A.L.M.; Urquiaga, S.; Baldani, J.I. Processos e mecanismos envolvidos na

influência de microrganismos sobre o crescimento vegetal. Seropédica: *Embrapa Agrobiologia* Documento 161, 2003, 40 p.

Paula, M.A. de; Siqueira, J.O. Döbereiner, J. Ocorrência de fungos micorrízicos vesículo-arbusculares e de bactérias diazotróficas na cultura de batata doce. *Revista Brasileira de Ciência de Solo*, v.16, p.349-356, 1993.

Pedraza, R.O.; Recent advances in nitrogen fixing acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, n. 125, p. 25-35, 2008.

Pelczar, M.; Chan, E.C.S.; Krieg, N.R. Caracterização dos microrganismos. In: *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. 2. Ed. São Paulo: *Makron Books do Brasil*, v. 1, Cap. 3, p. 75-99, 1996.

Purane, N.; Shinde, M.; Sharma, S.; Mahajani, S. Effect of nutrient additives on gluconic acid production by *Aspergillus niger* during submerged fermentation. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, v.5, n.1, p.235-239, 2011.

Purane, N.K.; Sharma, S.K.; Salunkhe, P.D.; Labade, D.S.; Tondlikar, M.M. Gluconic acid production from Golden Syrup by *Aspergillus niger* strain using semiautomatic stirred-tank fermenter. *Journal of Microbial & Biochemical Technology*, v.4, n.4, p.92-95, 2012.

Rajkumar, M.; Sandhya, S.; Prasad, M.N.V.; Freitas, H. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. *Biotechnology Advances*, v.30, p.1562–1574, 2012.

Ramachandran, S.; Fontanille, P.; Pandey, A.; Larroche, C. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, n. 2, p. 185-195, 2006.

Rees, D.C.; Tezcan, F.A.; Haynes, C.A.; Walton, M.Y.; Andrade, S.; Einsle, O.; Howard, J.B. Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philosophical Transactions of the Royal Society A*, v. 363, p. 971–984, 2005.

Reinhold-Hurek, B.; Hurek, T. Living inside plants: bacterial endophytes. *Current Opinion in Plant Biology*, v.14, p. 435-443, 2011

Reis Junior, F.B.; Reis, V.M.; Urquiaga, S.; Döbereiner, J. Influence of nitrogen fertilisation on the population of diazotrophic bacteria *Herbaspirillum* spp. and *Acetobacter diazotrophicus* in sugar cane (*Saccharum* spp.). *Plant and Soil*, v. 219, p. 153–159, 2000.

Reis, V. M.; De Paula, M. A.; Döbereiner, J.; Ocorrência de micorrizas arbusculares e da bactéria diazotrófica *Acetobacter diazotrophicus* em cana de açúcar. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 34, n. 10, p.1933-1941, 1999.

Reis, V.; Pereira, W.; Hipólito, G.S. Método de aplicação de bactérias diazotróficas em cana – planta para fins de determinação de eficiências agrônômica. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 4p. (Embrapa Agrobiologia, Comunicado Técnico 118), 2009.

Reis, V.M.; Olivares, F.L.; Vias de infecção de penetração de plantas por bactérias. Seropédica: EMBRAPA Agrobiologia Documento 216, 2006, 34 p.

Rodríguez, H.; Fraga, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances*, v. 17, p. 319-339, 1999.

Rodríguez, H.; Gonzalez, T.; Goire, I.; Bashan, Y. Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. *Naturwissenschaften*, v.91, p.552-555, 2004.

Roukas, T. Citric acid and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, v. 25, 298–304, 2005.

Sacksinchai, S.; Supphantharika, M.; Verduyn, C. Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*: a physiological study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 17, p. 307-316, 2001.

Saravanan, V.S.; Kalaiarasan, P.; Madhaiyan, M.; Thangaraju, M. Solubilization of insoluble zinc compounds by *Gluconacetobacter diazotrophicus* and the detrimental action of zinc ion ( $Zn^{2+}$ ) and zinc chelates on root knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 44, p. 235–241, 2007.

Saravanan, V.S.; Madhaiyan, M.; Osborne, J.; Thangaraju, M.; Sa, T.M.; Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing Acetobacteraceae members: their possible role in plant growth promotion. *Microbial Ecology*, v.55, n.1, p.130-40, 2008.

Saravanan, V.S.; Madhaiyan, M.; Thangaraju, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growthpromoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Chemosphere*, v.66, p.1794–1798, 2007.

Segun, I. Y.; Karabiyikli, S. Importance of aceticacidbacteria in food industry. *Food Control*, v.22, p. 647-656, 2011.

Sevilla, M.; Burris, R.H.; Gunapala, N.; Kennedy, C. Comparison of benefit to sugarcane plant growth and  $15 N_2$  incorporation following inoculation of sterile plants with *Acetobacter diazotrophicus* wild type and  $Nif^-$  mutant strains. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, v. 14, p. 358–366, 2001.

Sharma, A.; Vivekanand, V.; Singh, R.P. Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. *Bioresource Technology*, v.99, p.3444-3450, 2008.

Sievers, M.; Schlegel, H.G.; Caballero-Mellado, J.; Döbereiner, J.; Ludwig, W. Phylogenetic identification of two major nitrogen-fixing bacteria associated with sugarcane. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 21, n. 4, p. 505-508, 1998.

Silberbach, M.; Maier, B.; Zimmermann, M.; Büchs, J. Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans*: characterization in shaking-flasks, scale-up and optimization of the pH profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.62, p.92-98, 2003.

Silveira, M.M.; Wisbeck, E.; Lemmel, C.; Erzinger, G.; da Costa, J.P.; Bertasso, M.; Jonas, R. Bioconversion of glucose and fructose to sorbitol and gluconic acid by

untreated cells of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology*, v.75, p.99-103, 1999.

Simpson, F.B.; Burris, R.H. A nitrogen pressure of 50 atmosphere does prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science*, v. 224, p. 1095-1097, 1984.

Singh, O.V.; Jain, R.K.; Singh, R.P. Gluconic acid production under varying fermentation conditions by *Aspergillus niger*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.78, p.208-212, 2003.

Singh, O.V.; Kapur, N.; Singh, R.P. Evaluation of agro-food byproducts for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* ORS-4.410. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.21, p.519-524, 2005.

Singh, O.V.; Kumar, R. Biotechnological production of gluconic acid: future implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.75, p.713-722, 2007.

Singh, O.V.; Singh, R.P. Bioconversion of grape must into modulated gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4410. *Journal of Applied Microbiology*, v.100, p.1114-1122, 2006.

Singh, R.S.; Singh, R.P. Production of fructooligosaccharides from inulin by endoinulinases and their prebiotic potential. *Food Technology and Biotechnology*, v. 48, p. 435-450, 2010.

Sommer, R. Yeast Extracts: Production, Properties and Components. In: *International Symposium on Yeasts*, 9<sup>th</sup>, Sydney, Austrália, 1996. Disponível em: <[http://www.fantastic-flavour.com/files-downloads/Yeast\\_extracts\\_Production.doc](http://www.fantastic-flavour.com/files-downloads/Yeast_extracts_Production.doc)> Acesso em 13 de dezembro de 2014.

Stephan, M.P.; Oliveira, M.; Teixeira, K.R.S.; Martinezdrets, G.; Döbereiner, J. Physiology and dinitrogen fixation of *Acetobacter-Diazotrophicus*. *FEMS Microbiology Letters*, v.77, n.1, p. 67-72, 1991.

Strzelczyk, E.; Kamper, M.; Li, C. Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiological Research*, v.149, p.55-60, 1994.

Támbara, Y.; Hormaza, J.V.; Pérez, C.; León, A.; Arrieta, J.; Hernández, L. Structural analysis and optimised production of fructo-oligosaccharides by levansucrase from *Acetobacter diazotrophicus* SRT4. *Biotechnology Letters*, v. 21, n. 2, p. 117-121, 1999.

Tapia-Hernández, A.; Bustillos-Cristales, M.R.; Jiménez-Salgado, T.; Caballero-Mellado, J.; Fuentes-Ramírez, L.E. Natural endophytic occurrence of *Acetobacter diazotrophicus* in pineapple plants. *Microbial Ecology*, v.39, p.49-55, 2000.

Tejera, N.A.; Ortega, E.; Rodés, R.; Lluch, C. Influence of carbon and nitrogen sources on growth, nitrogenase activity, and carbon metabolism of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 50, p. 745-750, 2004.

Trujillo-Toledo, L.E.; Gómez-Riera R.; Banguela-Castillo, A.; Soto-Romero, M.;

Arrieta-Sosa, J.G.; Hernández-García, L. Catalytical properties of N-glycosylated *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase produced in yeast. *Electronic Journal of Biotechnology*, v.7, n.2, 2004.

Velasco-Bedran, H.; López-Isunza, F. The unified metabolism of *Gluconacetobacter entanii* in continuous and batch processes. *Process Biochemistry*, v.42, p.1180–1190, 2007.

Velázquez-Hernández, M.L.; Baizabal-Aguirre, V.M.; Cruz-Vázquez, F.; Trejo-Contreras, M.J.; Fuentes-Ramírez, L.E.; Bravo-Patiño, A.; Cajero-Juárez, M.; Chávez-Moctezuma, M.P.; Valdéz-Alarcón, J.J. *Gluconacetobacter diazotrophicus* levansucrase is involved in tolerance to NaCl, sucrose and desiccation, and in biofilm formation. *Archives of Microbiology*, vol. 193, n. 2, p.137-149, 2011.

Yamada, Y.; Hoshino, K.; Ishikawa, T. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 61, n. 8, p.1244-1251, 1997.

Yamada, Y.; Yukphan, P. Genera and species in acetic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, v.125, p. 15-24, 2008.

Yamatsu, A.; Matsumi, R. Atomi, H.; Imanaka, T. Isolation and characterization of a novel poly (vinyl alcohol)-degrading bacterium, *Sphingopyxis* sp. PVA3. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v 72, n.4, p. 804-811, 2006.

Yun J.W. Fructooligosaccharides-occurrence, preparation and application. *Enzyme and Microbial Technology*, v.19, p.107–117, 1996.