



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Renata Lopes dos Santos

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ALGINATO POR  
*Pseudomonas mendocina***

Florianópolis/SC

2011





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Renata Lopes dos Santos

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ALGINATO POR  
*Pseudomonas mendocina***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Miguel Müller

Florianópolis/SC

2011



Renata Lopes dos Santos

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ALGINATO POR**  
*Pseudomonas mendocina*

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia de Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 31 de agosto de 2011.

Prof. Dr. José Miguel Müller  
Orientador

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Luismar Marques Porto

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regina Vasconcelos Antônio

Prof. Dr. Willibaldo Schmidell



Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO) do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis, SC.



## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que são os grandes responsáveis pelas minhas realizações, pois me ensinaram com muito amor, carinho e amizade os caminhos que deveria seguir. E que, apesar da grande distância, estiveram sempre presentes em todos os momentos da minha vida, incentivando, apoiando e acreditando nos meus sonhos.

Ao meu irmão Érico, que sempre me serviu como exemplo a ser seguido.

À minha irmã Simone pelo grande carinho.

Aos sobrinhos Mário Luís e Luan pelo amor sincero, espontâneo e reconfortante.

Ao professor José Miguel Müller pela orientação, dedicação, incentivo e ensinamentos transmitidos.

À professora Regina Vasconcellos Antônio pelos ensinamentos em biologia molecular, sugestões e livros emprestados.

Ao pessoal do LBBMM por terem me recebido no laboratório, pelo enorme auxílio nas análises de biologia molecular e principalmente pela amizade.

Aos colegas do Engebio, por todo o respeito e compreensão.

À aluna de graduação Daniela, pela grande ajuda.

Às amigas Cristiane, Karina e Raquel pela amizade, pelos momentos de descontração e pela paciência em momentos de dificuldade.

Aos amigos que estiveram sempre presentes, incentivando com carinho e dedicação e que hoje compartilham comigo mais essa conquista.

À secretária do curso de pós-graduação em Engenharia de Alimentos, Raquel Agostinetti e à professora Alcilene Fritz pela atenção e ajuda nos assuntos burocráticos.

Aos professores Luismar Marques Porto, Regina Vasconcelos Antônio e Willibaldo Schmidell, membros da banca examinadora, por aceitarem avaliar esse trabalho contribuindo para sua melhoria.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.



## RESUMO

O alginato é um exopolissacarídeo constituído de quantidades variáveis de ácidos  $\beta$ -D-manurônico e seu epímero C-5 ácido  $\alpha$ -L-gulorônico, unidos por ligações  $\beta$ -1,4 glicosídicas. É extensamente utilizado na indústria de alimentos e biotecnológica. Atualmente a demanda do alginato para estas aplicações é suprida a partir da sua extração de algas marinhas, entretanto vários estudos reportam a produção de alginato por micro-organismos do gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter*. A produção bacteriana de alginato apresenta-se como uma alternativa interessante e sua produção por micro-organismos, além de possibilitar a produção de biopolímeros de alta qualidade com características específicas e pré-determinadas, irá diminuir o impacto ambiental nas regiões em que as algas marinhas das quais é extraído são coletadas. Nos últimos anos, vários estudos relacionados à produção de alginato por micro-organismos foram realizados com o objetivo de avaliar sua produção e rota metabólica de biossíntese, para caracterizar o material produzido e para determinar as potencialidades de aplicação deste novo material. O conhecimento sobre a via metabólica de um organismo permite a compreensão da fisiologia celular e regulação de seu metabolismo, sendo a quantificação de fluxos metabólicos um importante objetivo, principalmente no que diz respeito à obtenção de produtos úteis comercialmente ou cientificamente. Neste estudo foi avaliado o efeito da relação C:N na produção de alginato. Foram realizados experimentos em frascos agitados a 240 rpm e 30°C, em meios contendo glicerol como fonte de carbono nas concentrações iniciais de 20 a 40 g.L<sup>-1</sup> e (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> como fonte de nitrogênio em concentrações de 0,5 a 2,0g.L<sup>-1</sup>. Fluxos extracelulares, medidos experimentalmente, foram utilizados para estimar fluxos intracelulares no metabolismo do glicerol em *Pseudomonas mendocina* na biossíntese de alginato. Foram utilizados modelos estequiométricos e técnicas de balanço de massa, conhecidas como Análise de Fluxo Metabólico (MFA). Para avaliação foi considerado o Estado Pseudo-estacionário (PSS). O objetivo foi avaliar o efeito das concentrações da fonte de carbono e da fonte de nitrogênio no fluxo de carbono. Os resultados indicaram um maior rendimento de bioconversão de substrato em alginato em concentrações menores de nitrogênio, sugerindo que nessas condições *P. mendocina* utiliza a fonte de carbono principalmente para produção de alginato. Assim, o aumento da relação C:N favorece a produção de alginato, diminuindo o fluxo de carbono na via Entner-Doudoroff e o crescimento celular.

**Palavras-chaves:** Alginato. *P. mendocina*. Análise de Fluxo metabólico. Via metabólica.

## ABSTRACT

Alginate is an exopolysaccharide consisting of variable amounts of  $\beta$ -D-mannuronic acid and its C5-epimer  $\alpha$ -L-guluronic acid linked via  $\beta$ -1,4-glycosidic bonds. It is widely used in applications in the food and biotechnology industries. Currently the demand for these applications of alginate is supplied from the extraction of seaweed, however several studies report the production of alginate by micro-organisms of the genus *Pseudomonas* and *Azotobacter*. The bacterial production of alginate appears to be an interesting alternative and its production by micro-organisms, besides enabled the production of high quality polymers with specific characteristics and pre-determined, will reduce the environmental impact in areas where the seaweed is collected. In recent years, several studies relating the production of alginate by micro-organisms were carried out to evaluate their production and metabolic pathway of biosynthesis, to characterize the material produced and to determine the potential application of this new material. The knowledge about the metabolic pathway of an organism allows the understanding of cell physiology and regulation of their metabolism. The quantification of metabolic fluxes is an important goal, specially with regard to obtaining commercially or scientifically useful products. This study assessed the effect of C: N ratio in the production of alginate. Experiments were performed in shaken flasks at 240rpm and 30°C in medium containing glycerol as carbon source at initial concentrations of 20, 30 and 40 g.L<sup>-1</sup> and (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> as a nitrogen source at initial concentrations of 0,5; 1,0; 1,5 and 2,0 g.L<sup>-1</sup>. Extracellular fluxes, measured experimentally, were used to estimate intracellular fluxes of glycerol metabolism in *Pseudomonas mendocina* in the biosynthesis of alginate. It was used stoichiometric models and mass balance techniques, known as metabolic flux analysis (MFA). For evaluation was considered the pseudo-steady state (PSS). The objective was to evaluate the effect of concentrations of carbon and nitrogen sources in the flow of carbon. The results indicated a higher yield of bioconversion of substrate in alginate in lower concentrations of nitrogen, suggesting that in these conditions *P. mendocina* uses the carbon source mainly for alginate production. Thus, increased C:N ratio favors the production of alginate, decreasing the flow of carbon into the Entner-Doudoroff pathway and cell growth.

**Keywords:** Alginate. *P. mendocina*. Metabolic flux analysis. Metabolic pathway.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Estrutura de (a) ácido $\beta$ -D manurônico, (b) ácido $\alpha$ -L-gulurônico e (c) alginato (ERTESVÅG; VALLA, 1998).....	35
Figura 2 Modelo “Caixa de Ovos” (adaptado de SABRA; ZENG; DECKWER, 2001).....	36
Figura 3 Polimanuronato parcialmente acetilado sintetizado por <i>Pseudomonas mendocina</i> . MOAc – Unidade de manuronato acetilada; M – Manuronato. ....	37
Figura 4 Via metabólica da produção de alginato por <i>Pseudomonas</i> (Adaptado, REMMINGHORST; REHM, 2006).....	38
Figura 5 Modelo proposto do complexo enzimático envolvido na polimerização, modificação e exportação do alginato (Adaptado de REHM; VALLA, 1997). ....	39
Figura 6 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 20 g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 2,0 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	59
Figura 7 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 20 g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 1,5 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	60
Figura 8 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 20 g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 1,0 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	60
Figura 9 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 20 g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 0,5 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	61
Figura 10 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 30 g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 2,0 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ...	62
Figura 11 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 30 g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 1,5 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ...	62
Figura 12 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 30 g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 1,0 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ...	63

Figura 13	Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 30 g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 0,5 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ..	63
Figura 14	Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 40 g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 2,0 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ..	64
Figura 15	Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 40 g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 1,5 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ..	65
Figura 16	Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 40 g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 1,0 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ..	65
Figura 17	Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 40 g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 0,5 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> . ..	66
Figura 18	Espectro de infravermelho para o alginato produzido por <i>Pseudomonas mendocina</i> . (a) alginato, (b) alginato desacetilado.....	71
Figura 19	Micrografias de alginato produzido por <i>P. mendocina</i> , com aumento de: 1 – 100x, 2 – 400x, 3- 800x e 4 – 3000x. ....	73
Figura 20	Efeito da concentração de alginato na viscosidade reduzida (μred) a 25°C em dispersões de 0,1 M NaCl.....	74
Figura 21	Eletroforese em gel de agarose 1%, primeira banda – ladder, segunda banda – Produto de PCR. ....	77
Figura 22	Árvore filogenética, construída por meio do programa <i>MEGA5</i> . Os valores expressos na árvore, nos nós internos, se referem aos valores de <i>Bootstrap</i> , em 100 réplicas.....	78
Figura 23	Via metabólica da produção de alginato por <i>P. mendocina</i> . ....	79
Figura 24	Fluxos obtidos para a rede de reações quando utilizado 40g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 0,5 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , para 20 horas de cultivo. (a) Velocidades obtidas por balanço de massa simples para a rede de reações em estudo. (b) Velocidades obtidas após o melhoramento estatístico.....	86
Figura 25	Fluxos obtidos para a rede de reações quando utilizado 40g.L <sup>-1</sup> de glicerol e 0,5 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , para 80 horas de cultivo. (a) Fluxos obtidos por balanço de massa simples para a rede de reações em estudo. (b) Fluxos obtidos após o melhoramento estatístico. ....	87

Figura 26 Sensibilidade acumulada para todos os fluxos medidos. ....	89
Figura 27 Curva de calibração para a Biomassa .....	105
Figura 28 Curva de calibração para Glicerol.....	106
Figura 29 Curva de calibração para Nitrogênio .....	106



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Etapas da reação de PCR.....	52
Tabela 2 Resultados obtidos para a produção de alginato por <i>P. mendocina</i> em cultivo de 120 horas.....	68
Tabela 3 Comparação entre resultados reportados na literatura e resultados obtidos neste trabalho para concentração de biopolímero, fator de conversão de substrato em produto e fator de conversão de produto em relação à biomassa.....	69
Tabela 4 Massa molecular do alginato nas diferentes concentrações de glicerol e nitrogênio.....	75
Tabela 5 Valores obtidos na literatura e neste trabalho para a massa molecular (kg.mol <sup>-1</sup> ).....	76
Tabela 6 Velocidades de conversões de metabólitos extracelulares para 20 e 80 horas de cultivo em experimentos com concentração inicial de 40g.L <sup>-1</sup> .....	82
Tabela 7 Velocidades calculadas para os metabólitos intracelulares, no tempo de 20 horas, em ensaios com concentrações de 2,0; 1,5; 1,0 e 0,5 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e 40 g.L <sup>-1</sup> de glicerol.....	83
Tabela 8 Velocidades calculadas para os metabólitos intracelulares, no tempo de 80 horas, em ensaios com concentrações de 2,0; 1,5; 1,0 e 0,5 g.L <sup>-1</sup> de (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> e 40 g.L <sup>-1</sup> de glicerol.....	84
Tabela 9 Valores obtidos para a função teste (hε).....	85
Tabela 10 Sensibilidade dos fluxos calculados em relação a variações nos fluxos medidos.....	88
Tabela 11 Reações metabólicas para a produção de alginato por <i>Pseudomonas mendocina</i> .....	109
Tabela 12 Enzimas envolvidas nas reações.....	111
Tabela 13 Matriz Estequiométrica.....	113



## LISTA DE ABREVIACÕES

3PG	3-fosfoglicerato
ACCOA	Acetil Ca
ACT	Acetato
AKG	cido $\alpha$ -cetoglutrico
ALG	Alginato
CIT	Citrato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
F1,6P	Frutose 1,6-difosfato
F6P	Frutose 6-fosfato
G3P	Gliceraldeído 3-fosfato
GDP	Guanosina difosfato
GDPAM	cido GDP manurônico
GDPM	GDP-manose
GL	Glicerol
GL3P	Glicerol 3-fosfato
GLN	Glutamina
GLU	Glutamato
GMD	Manose desidrogenase
KDPG	2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato
M1P	Manose 1-fosfato
M6P	Manose 6-fosfato
OAA	Oxalacetato
PEP	Fosfoenolpiruvato
PGM	Fosfomanose mutase
PMI-GMP	Fosfomanose isomerase/guanosina-difosfomanose pirofosforilase
PMT	Polimanurato
PIR	Piruvato
SUCCOA	Succinil CoA



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
1.1 OBJETIVOS .....	28
<b>1.1.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>28</b>
<b>1.1.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>28</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>29</b>
2.1 POLÍMEROS .....	29
2.2 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS.....	29
2.3 EXOPOLISSACARÍDEOS .....	30
<b>2.3.1 Xantana.....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.2 Dextrana .....</b>	<b>31</b>
<b>2.3.3 Gelana .....</b>	<b>32</b>
<b>2.3.4 Pululana .....</b>	<b>32</b>
2.4 ALGINATO .....	32
<b>2.4.1 Características .....</b>	<b>32</b>
<b>2.4.2 Aplicações.....</b>	<b>33</b>
<b>2.4.3 Estrutura química.....</b>	<b>34</b>
<b>2.4.4 Biossíntese do Alginato.....</b>	<b>37</b>
2.5 FONTE DE CARBONO .....	40
2.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MICRO- ORGANISMOS .....	41
2.7 FLUXO METABÓLICO .....	43
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
3.1 MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO .....	45
3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	45
3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	46
<b>3.3.1 Determinação de Glicerol.....</b>	<b>46</b>
<b>3.3.2 Determinação do Nitrogênio .....</b>	<b>46</b>
<b>3.3.3 Determinação da concentração celular .....</b>	<b>46</b>

<b>3.3.4 Determinação do biopolímero pelo método gravimétrico</b> .....	47
3.4 CÁLCULO DA PRODUTIVIDADE DE BIOPOLÍMERO.....	47
3.5 FATOR DE RENDIMENTO.....	47
<b>3.5.1 Fator de rendimento de substrato em produto</b> .....	47
<b>3.5.2 Fator de rendimento de biomassa em produto</b> .....	48
3.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR).....	48
3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) ..	49
3.8 MASSA MOLECULAR POR VISCOSIDADE INTRÍNSECA .....	49
3.9 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE <i>Pseudomonas mendocina</i> .....	51
<b>3.9.1 Extração do DNA genômico</b> .....	51
<b>3.9.2 Amplificação do gene 16S rDNA por PCR</b> .....	52
<b>3.9.3 Purificação do DNA</b> .....	52
<b>3.9.4 Eletroforese em gel de agarose 1%</b> .....	53
<b>3.9.5 Quantificação em espectrofotômetro</b> .....	53
<b>3.9.6 Sequenciamento</b> .....	53
<b>3.9.7 Análise Filogenética</b> .....	54
3.10 ANÁLISE DO FLUXO METABÓLICO .....	54
<b>3.10.1 Construção da via metabólica</b> .....	54
<b>3.10.2 Construção da matriz estequiométrica</b> .....	55
<b>3.10.3 Cálculo das velocidades</b> .....	55
<b>3.10.4 Análise de sensibilidade</b> .....	57
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	59
4.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO E DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE ALGINATO.....	59
4.2 CÁLCULO DE PRODUTIVIDADE E RENDIMENTO.....	67
4.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR).....	71
4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) ..	72
4.5 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR VISCOSIDADE INTRÍNSECA .....	73

4.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA <i>Pseudomonas mendocina</i> .....	76
4.7 FLUXO METABÓLICO .....	78
4.7.1 Construção da rede metabólica .....	78
4.7.2 Construção da matriz estequiométrica .....	81
4.7.3 Cálculo das velocidades extracelulares .....	81
4.7.4 Estimativa das velocidades intracelulares .....	82
4.7.5 Análise de sensibilidade.....	88
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>93</b>
<b>7 ANEXOS .....</b>	<b>105</b>
7.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO .....	105
7.2 SEQUÊNCIA OBTIDA PELO SEQUENCIAMENTO DO 16S RDNA .....	107
7.3 REAÇÕES METABÓLICAS .....	109
7.4 ENZIMAS ENVOLVIDAS NAS REAÇÕES .....	111
7.5 MATRIZ ESTEQUIOMÉTRICA .....	113
7.6 ALGORITMO UTILIZADO PARA O CÁLCULO DAS VELOCIDADES ESTIMADAS.....	115



## 1 INTRODUÇÃO

---

Biopolímeros obtidos pela ação de micro-organismos por processos fermentativos possuem capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso, mesmo quando aplicados em baixas concentrações. Apresentam vantagens em relação aos polissacarídeos de origem vegetal e animal, tais como: reprodutibilidade e estabilidade das propriedades físico-químicas, custo e suprimento estáveis (MOREIRA; PINO; VENDRUSCOLO, 2003).

Exemplos de exopolissacarídeos microbianos são: dextrana, xantana, gelana, pululana e alginato bacteriano. Dextrana, xantana e gelana são praticamente os únicos polissacarídeos microbianos comercializados em larga escala (PRADELLA, 2006). O alginato comercial ainda é extraído de algas, porém a crescente preocupação em minimizar o impacto da ação humana sobre o ecossistema torna a produção de alginato por micro-organismos uma opção interessante. Adicionalmente, a possibilidade de produzir alginatos de alta qualidade com características pré-determinadas fazem com que alginato bacteriano apresente vantagens sobre o material extraído de algas.

A indústria de alimentos é uma das principais consumidoras do alginato. No entanto, as aplicações mais promissoras deste material encontram-se na área médica e farmacêutica, onde vem sendo frequentemente utilizado como um biomaterial e suas aplicações vão desde curativos, ou implantes dentários a engenharia de tecidos (REMMINGHORST; REHM, 2006; DRAGET; TAYLOR, 2009).

Na literatura somente dois gêneros são reportados como produtores de alginato, *Azotobacter* e *Pseudomonas*. As propriedades reológicas do biopolímero sintetizado por bactérias estão associadas ao grau de polimerização, às interações entre íons e resíduos gulurônicos e manurônicos e ao grau de acetilação. A força do gel formado irá depender do número e da extensão dos blocos de resíduos gulurônicos ao longo da cadeia polimérica e da concentração de íons presentes (REHM, 2010).

Estudos observaram que alginatos produzidos por *Pseudomonas* podem ser constituídos somente de resíduos manurônicos, o que é de extrema importância em algumas aplicações e ainda pode ser utilizado como matéria-prima para projetar alginatos com estruturas específicas (GIMMESTAD *et al.*, 2003).

A utilização da *Pseudomonas mendocina* é interessante para o estudo da produção de alginato bacteriano por não apresentar patogenicidade a humanos, ao contrário da *Pseudomonas aeruginosa*.

Embora a glicose e sacarose sejam citadas como fontes de carbono preferenciais para a produção de polissacarídeos, a elevada produção de glicerol como resíduo da indústria de biodiesel, impulsionou a necessidade de novas aplicações para este subproduto, o qual vem sendo investigado como a futura fonte de carbono em processos microbianos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado (SUTHERLAND, 2002).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi explorar as propriedades de síntese de alginato por *Pseudomonas mendocina* utilizando glicerol como fonte de carbono, para aplicações em diferentes áreas.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- Avaliação da dinâmica de produção de alginato a partir de diferentes concentrações de glicerol e de nitrogênio;
- Avaliação das características físico-químicas do alginato sintetizado pelo micro-organismo;
- Caracterização genética do micro-organismo utilizado; e
- Avaliação da síntese do biopolímero através da análise de fluxo metabólico.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

### 2.1 POLÍMEROS

Polímeros são macromoléculas formadas a partir de unidades estruturais menores, os monômeros. O número de unidades estruturais repetidas numa macromolécula é chamado grau de polimerização. Os polímeros são classificados como homopolímeros, quando as unidades monoméricas são idênticas, ou em heteropolímeros, quando são constituídas por duas ou mais espécies de monômeros (MANO, 1985).

Os polímeros podem ser provenientes de produtos petroquímicos, plantas ou animais. Devido ao aumento do custo de colheita e extração de polímeros produzidos por plantas e preços de mercado voláteis das gomas vegetais e de algas, esses biopolímeros vêm sendo substituídos pelos polissacarídeos microbianos obtidos através de processos fermentativos (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

### 2.2 POLISSACARÍDEOS MICROBIANOS

Vários micro-organismos possuem a habilidade de sintetizar polissacarídeos a partir de substratos orgânicos simples ou complexos. Embora a composição destes polissacarídeos possa ser limitada a um número pequeno de monossacarídeos e outros componentes como fosfato, piruvato e acetato, uma extensa faixa de propriedades físicas é encontrada (SANDFORD, 1979). Polissacarídeos produzidos por micro-organismos têm a capacidade de formar géis e soluções viscosas em meio aquoso (MOREIRA; PINO; VENDRUSCOLO, 2003).

Polissacarídeos microbianos podem apresentar-se como constituintes da parede celular (lipopolissacarídeos ou LPS), associados covalentemente à superfície celular (polissacarídeos capsulares ou CPS), ou secretados para o meio extracelular (exopolissacarídeos ou EPS) (BOELS *et al.*, 2001).

Os polissacarídeos obtidos de micro-organismos são uma alternativa válida, pois possuem propriedades similares aos tradicionais e, em alguns casos mais vantajosos, por possuírem propriedades específicas que o qualificam para o desenvolvimento de novos produtos. As gomas microbianas não dependem de condições climáticas, contaminação marinha ou falha na colheita, que prejudicam a oferta das

gomas tradicionais e, além disso, são menos suscetíveis à variabilidade em sua qualidade, pois sua produção pode ser controlada cuidadosamente. Finalmente, existem técnicas genéticas que permitirão obter polissacarídeos com propriedades específicas (MAUGERI, 2001). Têm como principal desvantagem o seu elevado custo, o que se deve aos processos de produção que são intensivos em capital e energia (PACE, 1991; MAUGERI, 2001).

Para um polímero microbiano ter boa aplicabilidade, este deve possuir propriedades reológicas interessantes e contínuas durante mudanças de temperatura, pH e força iônica. Além disso, deve ter composição química compatível com o metabolismo humano e aprovação prévia dos órgãos competentes, por meio de um rigoroso controle de qualidade, para ser utilizado em produtos para consumo humano, como alimentos, fármacos e cosméticos (PRADELLA, 2006).

### 2.3 EXOPOLISSACARÍDEOS

Muitos micro-organismos sintetizam exopolissacarídeos, que permanecem ligados à superfície da célula ou são encontrados no meio extracelular na forma de um lodo amorfo. Em ambientes naturais em que os micro-organismos são encontrados, esses polímeros podem ser associados com a virulência, como no caso de patógenos de plantas ou animais, ou mesmo para proteção microbiana contra dessecação ou ataque por bacteriófagos e protozoários (SUTHERLAND, 1998).

De acordo com PACE (1991), algumas funções possíveis dos exopolissacarídeos incluem: proteção do micro-organismo contra desidratação; formação de barreira impedindo que vírus e anticorpos se liguem a sítios específicos sobre a parede celular; ligação e neutralização de toxinas carregadas ou íons metálicos tóxicos; atuação como uma fonte de carbono e energia; conversão do excesso de substrato em uma massa espumosa que é muito mais fácil ser metabolizada por outros micro-organismos; interação com células de animais ou plantas em relações específicas, simbióticas ou patogênicas.

Enquanto os polissacarídeos associados à célula (CPS e LPS) apresentam importância médica, muitos EPS têm amplo espectro de aplicações na indústria alimentícia, podendo ser utilizados como espessantes, estabilizantes, emulsificantes, coagulantes, formadores de filmes, gelificantes, agentes de suspensão e dispersantes (SUTHERLAND, 1998). Os EPS microbianos podem ser polímeros de monossacarídeos aniônicos, neutros e catiônicos ou derivados destes e,

frequentemente, contêm grupos laterais como acetato, piruvato, succinato, componentes lipídicos, nitrogênio orgânico ou íons inorgânicos. O grau de substituição destes grupos laterais tem um importante efeito sobre as propriedades dos polímeros (PACE, 1991).

Como exemplos de EPS microbianos citam-se dextranas obtidas de *Leuconostoc mesenteroides*, xantana obtida de *Xantomonas campestris*, gelana obtida de *Sphingomonas paucimobilis*, pululana obtida de *Aureobasidium pullulans* e alginato bacteriano produzido por bactérias dos gêneros *Azotobacter* e *Pseudomonas* (SANTOS; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2000; GARCIA-OCHOA; SANTOS; ALCON, 2004; FLORES CANDIA, 1998; GIAVASIS; HARVEY; MCNEIL, 2000; CHI; ZHAO, 2003; REMMINGHORST; REHM, 2006). Dextrana, xantana e gelana são praticamente ainda os únicos polissacarídeos microbianos comercializados em larga escala, tendo relevada importância no mercado de gomas (MAUGERI, 2001).

### 2.3.1 Xantana

Do ponto de vista comercial, a goma xantana é o polissacarídeo microbiano mais importante, com uma produção mundial de cerca de 30.000 toneladas por ano, movimentando um mercado de aproximadamente 408 milhões de dólares. As principais indústrias produtoras de xantana são Kelco (EUA), Rhône-Poulenc (França), Pfizer (EUA) e Mero-Rousselot-Santia (França) (PRADELLA, 2006).

### 2.3.2 Dextrana

A dextrana tem muitas aplicações industriais devido ao seu caráter não iônico e boa estabilidade. Entre outras aplicações, a dextrana é amplamente usada na indústria farmacêutica como, por exemplo, expansor volumétrico de sangue ou plasma sanguíneo artificial, como componente em géis de filtração em cromatografia, e na indústria de alimentos como estabilizantes e agentes de viscosidade (SHAMALA; PRASAD, 1995). O maior produtor mundial de dextrana e soluções de dextrana é a Pharmacia (Suécia); outros produtores são: Fisons (Reino Unido), Meito (Japão), Pfeiffer & Langen e UEB Sermwerke (Alemanha) e Polfa (Polônia). Alguns produtores de dextrana clínica são: Pharmacia (EUA e Suécia), Knoll/Schiwa (Alemanha), Abbott (EUA), Travenol (EUA) e Fisons (Reino Unido) (MAUGERI, 2001).

### 2.3.3 Gelana

Gelana é um exopolissacarídeo também conhecido comercialmente como heteropolissacarídeo-60 (PS-60), produzido por *Sphingomonas paucimobilis*, anteriormente referida como *Pseudomonas elodea* (MARTIN *et al.*, 1996). Devido à diversidade de suas estruturas e propriedades, entre a propriedade de produzir um gel termoreversível, a gelana tem uma vasta aplicação nas indústrias alimentícia, farmacêutica e outras, como texturizante, estabilizante, espessante, emulsificante e agente gelificante (JIN *et al.*, 2003). Desenvolvida e produzida pela Kelco, divisão da Merck, é comercializado pelo nome de Gelrite ou Kelcogel com o preço aproximado de \$5/lb.

### 2.3.4 Pululana

Pululana é o nome genérico dado ao homopolissacarídeo solúvel em água que é produzido extracelularmente por fungos como o *Aureobasidium pullulans* (KACHHAWA; BHATTACHARJEE; SINGHAL, 2003). Entre os fatores que influenciam a produção de exopolissacarídeo em *A. pullulans* estão a variabilidade de características das cepas utilizadas, a natureza da fonte de carbono no meio de cultura, o pH, a temperatura de incubação, os níveis de oxigênio dissolvidos, a configuração do fermentador, e a fonte de nitrogênio (MCNEIL; KRISTIANSEN, 1990; SHINGEL, 2004).

A pululana pode ser comprimida e moldada sem o auxílio de plastificantes, dando origem a filmes transparentes biodegradáveis com uma alta permeabilidade ao oxigênio. Este polímero pode ser usado como adesivo, ligante, espessante, estabilizante, filmes de revestimento e embalagem para alimentos. Pode também ser utilizado na obtenção de material plástico biodegradável, não poluente e comestível. Comercialmente, a pululana tem sido produzida pela Hayashibara, Japão (MAUGERI, 2001).

## 2.4 ALGINATO

### 2.4.1 Características

O alginato é um polissacarídeo encontrado tanto na matriz intercelular de algas marrons quanto recobrindo, extracelularmente, algumas espécies de bactérias (MOE *et. al.*, 1995). Foi descoberto em

algas marrons no final do século 19 e desde a sua descoberta tornou-se um importante produto industrial, usado em alimentos, materiais estéticos e indústria médica e farmacêutica (HAY *et al.*, 2010).

Embora o alginato comercializado ainda seja extraído a partir de algas, a capacidade de modificar geneticamente as bactérias produtoras de alginato, como as dos gêneros *Azotobacter* e *Pseudomonas*, para a produção de alginatos específicos com alto valor é promissora (REHM, 2010).

#### 2.4.2 Aplicações

O alginato é amplamente utilizado em alimentos, cosméticos, medicamentos e também encontra aplicação na indústria têxtil e de papel. Atualmente vem sendo utilizado em aplicações inovadoras na área médica e farmacêutica (DRAGET; TAYLOR, 2009).

A indústria de alimentos utiliza a maior parte do alginato produzido. Entre as aplicações nesta indústria estão a utilização do biopolímero como: agente controlador de viscosidade em xaropes e molhos; estabilizante em sorvetes e cerveja; agente de suspensão em bebidas e temperos para saladas; agente de formação de filmes em salsichas, e agente gelificante em doces contendo leite e em geléias (SABRA; ZENG; DECKWER, 2001).

Na indústria têxtil a utilização do alginato melhora o desempenho das tintas utilizadas nos processos de impressão favorecendo a aderência e a deposição destes materiais sobre os tecidos. Na indústria de papel a adição de alginato permite que as propriedades para impressão destes materiais também melhorem (SABRA; ZENG; DECKWER, 2001).

O alginato vem sendo frequentemente utilizado como um biomaterial em aplicações médicas e entre as suas aplicações estão a imobilização de células, liberação sustentada, tratamento no refluxo esofágico, dermatologia e cicatrização de feridas e materiais de moldagem dental. A microencapsulação de drogas, peptídeos ou células em esferas de alginato como sistemas de liberação controlada é um campo crescente de aplicação (REMMINGHORST; REHM, 2006).

Estudos recentes avaliam o potencial de estruturas homopoliméricas de alginato. Entre aplicações reportadas na literatura para estes materiais, está o estímulo a células do sistema imune, como citocinas, interleucina 1, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa, cuja resposta está associada à estrutura sequencial de biopolímeros constituídos exclusivamente de grupos manurônicos (SABRA; ZENG; DECKWER, 2001). Estruturas constituídas somente de grupos

gulurônicos foram propostas para o tratamento de pacientes portadores de fibrose cística em função de sua capacidade de modificar as características reológicas da mucina (DRAGET; TAYLOR, 2009).

Novas possibilidades de aplicação de alginatos de alta qualidade envolvem sua utilização no transplante de células. Entre os estudos apresentados na literatura é reportada sua utilização para imobilizar células produtoras de insulina para reversão de diabetes tipo I e para elaborar cápsulas de alginato/poli-L-lisina contendo Ilhotas de Langerhans, que são avaliadas atualmente como pâncreas endócrino bioartificial (SABRA; ZENG; DECKWER, 2001; DRAGET; TAYLOR, 2009).

Para a maioria das aplicações, o biopolímero é vendido por US\$ 5-20/kg, mas para melhores níveis de pureza chegam a ser vendidos por até US\$ 40.000/kg (RHEM; VALLA, 1997).

### 2.4.3 Estrutura química

A estrutura do ácido alginico consiste de cadeias lineares de resíduos de ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) unidos por ligações tipo (1 $\rightarrow$ 4) e resíduos de seu epímero, o ácido  $\alpha$ -L-gulurônico (G), em várias proporções. Estes resíduos estão arranjados na forma de blocos de ácidos manurônico (M) ou gulurônico (G), que podem ser compostos por blocos de homopolímeros (GG e MM) junto com blocos alternados (MG) na mesma molécula (DRAGET; SKJÅK BRÆK e SMIDSRØD, 1994), como pode ser visto na Figura 1. Na molécula, a disposição espacial dos monômeros se dá segundo a posição energética mais favorável. Para blocos G-G esta é uma posição em forma de cadeira,  ${}^1C_4$ , sendo os monômeros unidos por ligação glicosídica  $\alpha(1\rightarrow4)$ . Para M-M trata-se da posição  ${}^4C_1$ , sendo a ligação glicosídica do tipo  $\beta(1\rightarrow4)$ . O grupo carboxílico é responsável por uma ligação glicosídica equatorial/equatorial em M-M, uma ligação glicosídica axial/axial em G-G e uma ligação glicosídica equatorial/axial para M-G (NUSSINOVITCH, 1997).

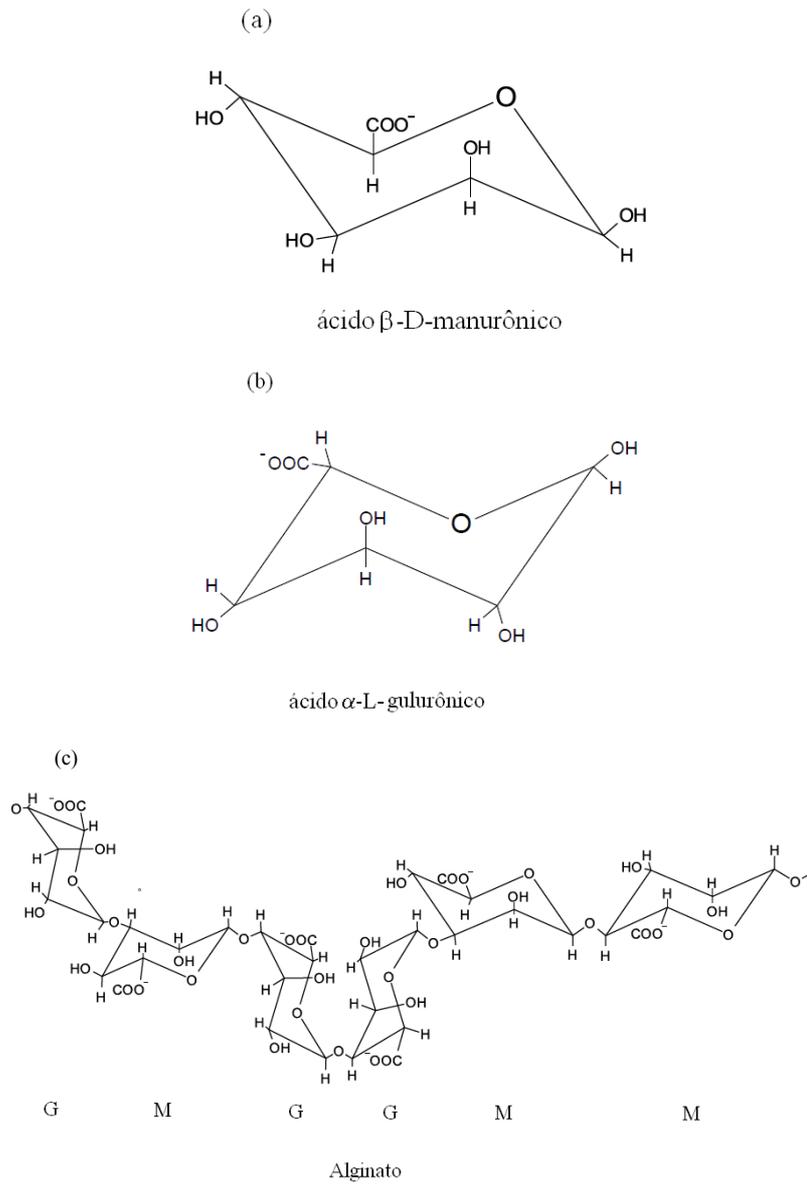
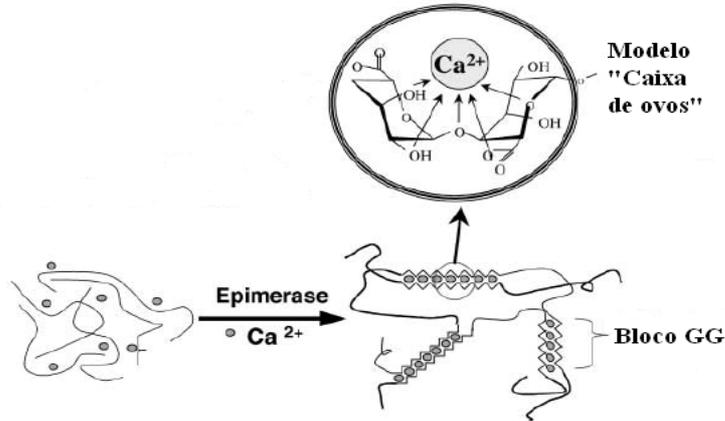


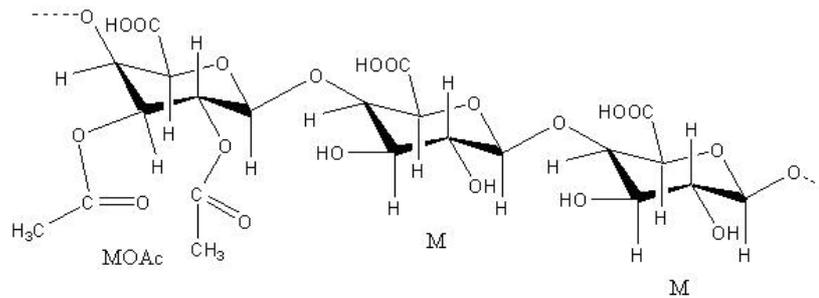
Figura 1 Estrutura de (a) ácido  $\beta$ -D manurônico, (b) ácido  $\alpha$ -L- gulurônico e (c) alginato (ERTESVÁG; VALLA, 1998).

Alginatos que contêm sequências de resíduos gulurônicos formam géis rígidos na presença de cátions divalentes como  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Mg}^{++}$ . A interação entre os íons divalentes e os blocos gulurônicos forma a estrutura denominada “modelo caixa de ovos”, esta estrutura pode ser observada na Figura 2. (GRANT *et al.*, 1973; SABRA; ZENG; DECKWER, 2001).



**Figura 2** Modelo “Caixa de Ovos” (adaptado de SABRA; ZENG; DECKWER, 2001).

Uma característica apresentada por alginatos produzidos por *Pseudomonas* é a ausência de resíduos ou de blocos constituídos de ácidos gulurônicos. As variações nas estruturas dos blocos de monômeros e o grau de acetilação afetam fortemente as propriedades físico-químicas e reológicas do polímero (SKJAK-BRØK; GRASDALEM; LARSEN, 1986; SMIDSRØD; DRAGET, 1996).

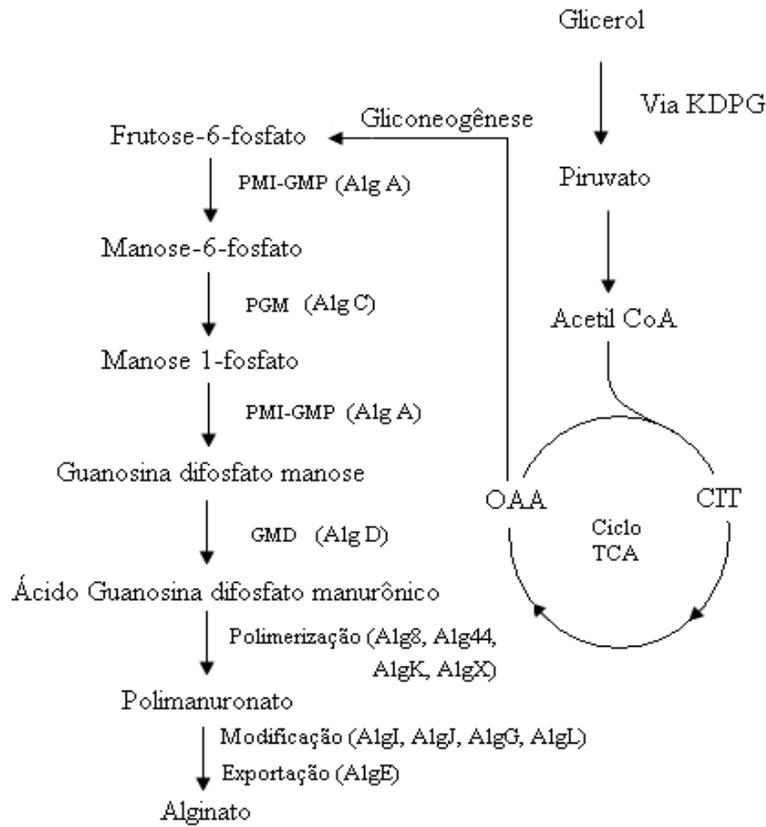


**Figura 3 Polimanuronato parcialmente acetilado sintetizado por *Pseudomonas mendocina*. MOAc – Unidade de manuronato acetilada; M – Manuronato.**

#### 2.4.4 Biossíntese do Alginato

As vias de biossíntese de alginato são similares nas espécies *Azotobacter* e *Pseudomonas*. A maioria dos conhecimentos sobre a biossíntese deriva de estudos de *Pseudomonas aeruginosa*, principalmente devido à importância médica deste organismo como um patógeno oportunista em pacientes com fibrose cística (MAY; CHAKRABARTY, 1994).

Estudos realizados com carbono marcado têm mostrado que a síntese do alginato começa com a entrada de substratos com seis carbonos na via Entner-Doudoroff (via KDPG), resultando em piruvato, que é canalizado para o ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA), enquanto o oxaloacetato a partir do ciclo TCA pode ser convertido em frutose-6-fosfato através da gliconeogênese (LYNN; SOKATCH, 1984). A via metabólica simplificada para a produção de alginato por *Pseudomonas mendocina* utilizando glicerol como fonte de carbono, é apresentada na Figura 4.



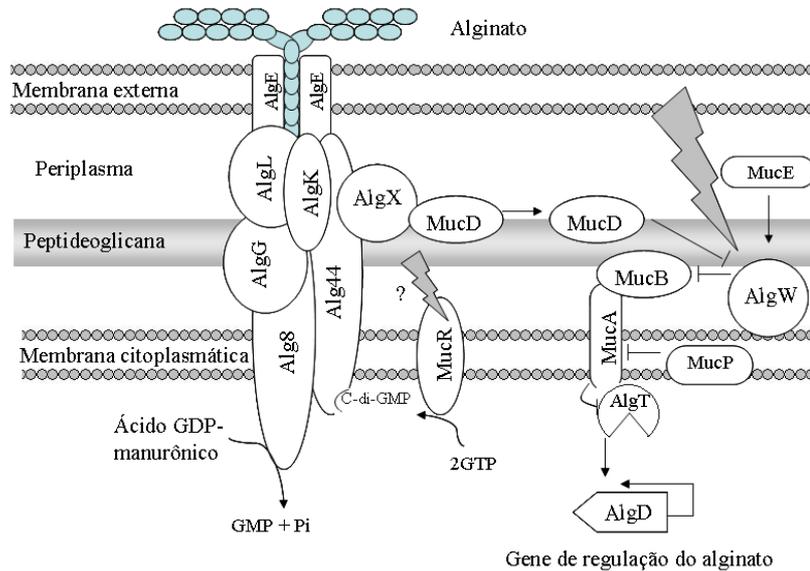
**Figura 4** Via metabólica da produção de alginato por *Pseudomonas* (Adaptado, REMMINGHORST; REHM, 2006).

Apesar de ser inicialmente sintetizado em forma de ácido polimanurônico, o alginato sofre modificações químicas que compreendem a acetilação e a epimerização, que ocorrem durante a transferência periplasmática e antes da exportação definitiva através da membrana externa. Geralmente a via de biossíntese do alginato pode ser dividida em quatro fases (REMMINGHORST; REHM, 2006):

- (i) síntese do substrato precursor,
- (ii) polimerização e transferência para a membrana citoplasmática,

- (iii) transferência e modificação periplasmática, e
- (iv) exportação para fora da membrana externa.

Um modelo do complexo enzimático envolvido nas etapas de polimerização, modificação e exportação do alginato foi proposto por REHM e VALLA (1997) e está apresentado na Figura 5.



**Figura 5** Modelo proposto do complexo enzimático envolvido na polimerização, modificação e exportação do alginato (Adaptado de REHM; VALLA, 1997).

Os genes envolvidos na síntese do precursor, ácido GDP-manurônico, foram todos identificados e caracterizados, e lhes foram atribuídas as designações *algA* (codificando PMI-GMP), *algC* (codificando fosfomanosemutase) e *algD* (codificando guanosina-difosfomanose desidrogenase) (REHM; VALLA, 1997).

A etapa de polimerização ocorre pela ação de um conjunto de proteínas localizadas na membrana citoplasmática. As funções biológicas de genes supostamente envolvidos no processo de polimerização são pouco conhecidas, principalmente porque ensaios *in vitro* da síntese de alginato ainda não foram estabelecidos. No entanto, os genes produtores de *alg8*, *alg44* e *algX* (*alg60* em *Azotobacter*) são

candidatos a serem subunidades da polimerase do alginato (REHM; VALLA, 1997).

As enzimas que alteram a estrutura do alginato, como acetilases e epimerases, são encontradas no espaço periplásmico dos microorganismos produtores (SABRA; ZENG; DECKWER, 2001).

A cadeia polimérica formada é constituída inicialmente de resíduos manurônicos. Sequencialmente o polimanuronato é acetilado e epimerizado. Na etapa de acetilação, grupos acetil são ligados aos carbonos 2 e/ou 3 dos resíduos manurônicos (REHM; VALLA, 1997; ANDERSON; HACKING; DAWES, 1987). Os fatores que afetam esta etapa de biossíntese, não estão definidos para ambos os gêneros e a presença de grupos acetil sugere uma proteção da ação de epimerases (REMMINGHORST; REHM, 2006).

A ação de epimerases converte o ácido  $\alpha$ -L-manurônico em seu epímero C-5, ácido  $\beta$ -D-gulurônico. Para o gênero *Azotobacter* foram identificadas sete epimerases que apresentam diferentes padrões para conversão destes resíduos, cuja atividade está associada à concentração de cálcio no meio de cultura. Para *Pseudomonas* foi somente identificada uma epimerase e os fatores que afetam sua atividade ainda não foram definidos (ERTESVÅG *et al.*, 1999). As epimerases podem ser divididas em dois grupos: um que gera somente blocos alternados (MG) e outro que forma blocos de resíduos gulurônicos (GG). A ação destas enzimas possibilita a elaboração de alginatos que não apresentam blocos de resíduos manurônicos (MM) (GIMMESTAD *et al.*, 2006). Estudos observaram que em *Pseudomonas* a ausência do gene *algG* faz com que o alginato produzido possua somente resíduos manurônicos (GIMMESTAD *et al.*, 2003).

## 2.5 FONTE DE CARBONO

Glicose e sacarose são citadas como fontes de carbono preferenciais para a produção de biopolímeros (SUTHERLAND, 2002), porém, algumas fontes alternativas têm sido sugeridas, tais como melão de açúcar de beterraba, soro de leite, casca de café, e bagaço de mandioca para a produção de goma xantana; soro de leite e resíduo de soja para a produção de goma gelana (NITSCHKE; RODRIGUES; SCHINATTO, 2001; WOICIECHOWSKI, 2001; FIALHO *et al.*, 1999; JIN *et al.*, 2003; KALOGIANNIS *et al.*, 2003).

A utilização de resíduos da agroindústria em bioprocessos permite a obtenção de substratos alternativos de baixo custo para

processos fermentativos, que reduzem os custos de produção e auxiliam na destinação de resíduos, minimizando problemas ambientais.

A extraordinária expansão da indústria de biodiesel no Brasil e no mundo vem originando grandes volumes do principal subproduto, o glicerol. Sabe-se que para cada 100 litros de biodiesel produzidos, resultam cerca de 10 kg de glicerina bruta ou 9 kg de glicerol. A superprodução de glicerol afeta negativamente o preço do biodiesel no mercado, tornando imperiosa a busca de novas aplicações para este subproduto e essencial o uso intensivo deste co-produto para a sustentabilidade econômica da indústria de biodiesel no país (HGCA, 2006).

Considerando a situação e a projeção para os próximos anos, a utilização do glicerol como substrato para cultivo torna-se vantajosa em relação ao preço de outros resíduos tradicionalmente utilizados. Neste contexto, o glicerol vem sendo investigado como a futura fonte de carbono em processos microbianos para a obtenção de bioprodutos de alto valor agregado (RIVALDI *et al.*, 2007).

## 2.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE MICRO-ORGANISMOS

A utilização de seqüências do gene 16S rDNA para o estudo da filogenia e taxonomia bacteriana tem sido o marcador genético mais comum, usado devido a uma série de razões. Essas razões incluem (i) a sua presença em quase todas as bactérias, muitas vezes existindo como uma família multigênica, ou operons; (ii) a função do gene 16S rDNA não mudou ao longo do tempo, o que sugere que as mudanças aleatórias na seqüência é uma medida mais precisa de tempo (evolução), e (iii) o gene 16S rDNA (1500 pb) é grande o suficiente para fins de informática (JANDA; ABBOTT, 2007).

A extração dos ácidos nucléicos é o primeiro passo para a realização da maioria das metodologias de biologia molecular. Basicamente, o processo de extração de DNA consiste em duas etapas. A primeira é a extração propriamente dita e consiste no rompimento das membranas celulares e, conseqüentemente, a exteriorização do DNA. A segunda fase consiste na purificação do DNA em solução, ou seja, a remoção dos outros componentes celulares, como restos de membrana, proteínas e RNA (BARTLETT; STIRLING, 2003).

O DNA genômico extraído é utilizado como DNA molde na reação em cadeia da polimerase (PCR), que nada mais é do que a

replicação *in vitro* do DNA. A metodologia envolve ciclos repetidos das etapas de desnaturação do DNA pelo calor, anelamento dos *primers* à sequência alvo em fita simples básica e extensão dos *primers* anelados por uma DNA polimerase termoestável. O resultado é uma acumulação exponencial do DNA alvo (SAIKI *et al.*, 1988).

A verificação do DNA extraído e do produto de PCR é realizada através da eletroforese, técnica utilizada para separar, identificar e purificar moléculas carregadas, como DNA e proteínas. A técnica apresenta basicamente um sistema de suporte (gel de agarose), um tampão no qual está imerso o gel e os eletrodos nas extremidades da cuba onde estão contidos o tampão e o gel. Sob a influência de um campo elétrico, moléculas carregadas e partículas migram em direção ao pólo oposto. A carga e a massa das moléculas fazem com que elas migrem em velocidades diferentes e, portanto, propiciam a separação destas. Como os ácidos nucléicos (DNA e RNA) possuem carga elétrica negativa (devido ao grupamento fosfato) eles sempre migrarão em direção ao pólo positivo. Então, o fator determinante da taxa de migração será a massa da molécula (WESTERMEIER, 2005).

O tampão mais utilizado na eletroforese de ácidos nucléicos é o TAE - Tris, Acetato e EDTA (AUSUBEL, 1994). A concentração de agarose atua de forma importante na eletroforese, pois ela determina a faixa de tamanho das moléculas de DNA que podem ser separadas. Para observar ácidos nucléicos em gel de agarose, deve-se corá-los e submetê-los a uma luz ultravioleta. O corante mais comum é o brometo de etídeo, que se intercala entre as bases do DNA (MANIATIS; FRITSCH; SAMBROOK, 1982).

O procedimento básico para o sequenciamento de DNA, proposto por SANGER (1977), compreende a incorporação de desoxinucleotídeos (dNTPs) e de didesoxinucleotídeos (ddNTPs) a uma cadeia de DNA em crescimento, tendo como molde o DNA de interesse. Quando os ddNTPs são adicionados, a extensão da cadeia é interrompida pois esses didesoxinucleotídeos não apresentam um grupo hidroxila (OH) 3' necessário para a ligação do próximo desoxinucleotídeo (dNTP). Como esses ddNTPs são marcados, podem ser detectados e a seqüência dos nucleotídeos, identificada (AUSUBEL, 1994).

A reação de sequenciamento é similar ao PCR, e é caracterizada pelas etapas de desnaturação, na qual ocorre a separação da molécula de DNA em fita simples, anelamento, caracterizada pela utilização de um único *primer* que irá se anelar à fita de DNA na região complementar à sua seqüência, e extensão do fragmento através da inserção dos dNTPs

(dATP, dTTP, dCTP, dGTP) pela Taq DNA Polimerase (AUSUBEL *et al.*, 1994).

Após a reação de sequenciamento, os produtos são submetidos à eletroforese capilar em sequenciador automático. Os fragmentos marcados com fluorescência migram ordenadamente no interior dos capilares e à medida que são excitados por um feixe de *laser*, emitem luz em diferentes comprimentos de onda que são detectados por uma câmera CCD. Em seguida essa informação é transmitida ao computador e processada para que ao final da corrida, os dados possam ser recuperados em formato de eletroforegrama ou de texto (formato FASTA), seguindo-se da análise de bioinformática (NASCIMENTO *et al.*, 1999).

## 2.7 FLUXO METABÓLICO

Segundo STEPHANOPOULOS e colaboradores (1998), uma das mais importantes contribuições da engenharia metabólica é, provavelmente, a ênfase empregada no fluxo metabólico e no seu controle sob condições *in vivo*. O conceito de fluxo metabólico não é novo, e o seu controle vem chamando a atenção de um pequeno, porém, avançado grupo de pesquisadores em bioquímica por aproximadamente trinta anos. A essência da engenharia metabólica é a possibilidade de combinar métodos analíticos para quantificar fluxos e o seu controle com técnicas de biologia molecular para implementar modificações genéticas sugeridas.

O conhecimento sobre a rede metabólica de um organismo é essencial para a compreensão de sua fisiologia e comportamento fenotípicos. A quantificação da magnitude dos fluxos metabólicos *in vivo* é um importante objetivo em fisiologia celular e engenharia metabólica, principalmente no que diz respeito à produção de produtos úteis comercialmente e cientificamente.

A análise de fluxo metabólico é uma metodologia eficiente para a obtenção dos fluxos onde as reações intracelulares são quantificadas a partir de fluxos extracelulares utilizando modelos estequiométricos e técnicas de balanço de massa. A análise de fluxo metabólico também indica as rotas mais eficientes para o melhor aproveitamento do substrato na produção de um metabólito de interesse, como, por exemplo, a obtenção de mutantes super-produtores do metabólito desejado. A análise de fluxo metabólico ainda fornece várias informações adicionais, como por exemplo, a identificação dos pontos

de bifurcação e de vias metabólicas alternativas, cálculo de fluxos extracelulares não medidos e de rendimentos teóricos máximos.

A engenharia metabólica pode trazer contribuições significativas em áreas específicas da produção industrial de produtos como gomas, polissacarídeos, proteínas, biogás, alimentos, ácidos orgânicos entre outros produtos produzidos biologicamente, devido principalmente à manipulação metabólica de micro-organismos (STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU, NIELSEN, 1998).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 3.1 MICRO-ORGANISMO E MANUTENÇÃO

O micro-organismo utilizado neste trabalho foi *Pseudomonas mendocina* M13 (CCT2245), um mutante isolado através da técnica de resistência ao antibiótico carbenicilina (MÜLLER, 1997). Este micro-organismo foi mantido em refrigeração a 4°C em placas de Petri contendo o meio descrito no item 3.2.

#### 3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

O meio utilizado para manutenção foi composto de (g.L<sup>-1</sup>) sacarose (1,0), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,3), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5), peptona (0,25) e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,25). Foram preparados 100 mL de meio suplementado com 2 % de Agar. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos, e vertido em placas de Petri. As placas foram inoculadas utilizando a técnica do esgotamento por estrias e colocadas em estufa a 30° C por 24 h e, em seguida, mantidas em refrigeração a 4° C.

As células foram reativadas em meio caldo nutriente, 1,3 g em 100 mL de água destilada, esterilizado em autoclave a 121 °C por 20 minutos. Uma colônia foi transferida da placa para o meio, durante 24 horas em meio agitado e 30°C. 1mL do inóculo foi adicionado a cada frasco do meio de cultura para a realização do cultivo.

O meio utilizado para a produção do biopolímero por *Pseudomonas mendocina* foi similar ao utilizado por MÜLLER (1997) com os seguintes constituintes (em g.L<sup>-1</sup>):

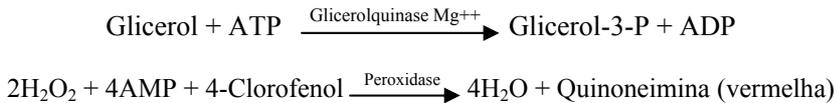
- Fonte de carbono composta por glicerol em concentrações de 20,30 e 40 g.L<sup>-1</sup>
- (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> em concentrações que variaram de 0,5 a 2,0 g.L<sup>-1</sup>
- Extrato de levedura (0,1), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,1), CaCl<sub>2</sub> (0,1); MnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,86×10<sup>-3</sup>), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,2×10<sup>-3</sup>), CoCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,28×10<sup>-3</sup>), CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O (0,25×10<sup>-3</sup>) e FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (3,6×10<sup>-3</sup>).
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (12,5 g.L<sup>-1</sup>); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (3 g.L<sup>-1</sup>) - tampão fosfato 0,11 M a pH 7,0.

Os experimentos foram realizados em frascos *erlenmeyer* não aletados de 250mL contendo 60mL do meio adicionado de 1mL de inóculo. Os frascos foram incubados em agitador da marca Marconi, 240rpm e 30°C durante o período de cultivo de 120 horas. Durante as primeiras 48 horas, um frasco era retirado para a realização das análises a cada 8 horas, a partir desse tempo as amostras passaram a ser retiradas a cada 12 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

#### 3.3.1 Determinação de Glicerol

O glicerol presente no meio foi determinado utilizando kit *Analisa -Triglicerídeos*, através do método enzimático-colorimétrico. A reação colorimétrica do glicerol está indicada abaixo.



A curva de calibração é apresentada no Anexo 7.1.

#### 3.3.2 Determinação do Nitrogênio

O nitrogênio do meio foi determinado utilizando kit para determinação da uréia por metodologia enzimática-colorimétrica, *Analisa – Uréia PP*. A uréia é hidrolisada pela urease a íons amônio e CO<sub>2</sub>. Em meio alcalino, os íons amônio reagem com salicilato e hipoclorito de sódio, sob a ação catalisadora do nitroprussiato de sódio, para formar indofenol. A absorvância do complexo azul formado, medida a 600nm, é diretamente proporcional à concentração de uréia na amostra analisada. A curva de calibração é apresentada no Anexo 7.1.

#### 3.3.3 Determinação da concentração celular

A biomassa foi determinada a partir da leitura de densidade óptica (D.O.) a 600nm. A relação obtida foi: Biomassa (g.L<sup>-1</sup>) = 0,2014\*ABS + 0,041. A curva de calibração é apresentada no Anexo 7.1.

### 3.3.4 Determinação do biopolímero pelo método gravimétrico

A determinação da concentração do biopolímero foi efetuada pelo método gravimétrico adaptado de MÜLLER (1997). Para a completa remoção das células, 10 mL da amostra foram centrifugados a 15000 Hz, por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi separado e novamente centrifugado nas mesmas condições por 10 minutos. Foram utilizados 5 mL do sobrenadante para a precipitação, aos quais foram adicionados três volumes de etanol. O precipitado foi lavado em etanol para remoção das impurezas e posteriormente seco em estufa a 80°C até peso constante.

### 3.4 CÁLCULO DA PRODUTIVIDADE DE BIOPOLÍMERO

A produtividade foi calculada pela concentração de biopolímero ao final do cultivo, pela Equação 1.

$$P = \frac{m_f}{V \cdot t} \quad (1)$$

onde  $P$  é a produtividade em  $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ,  $m_f$  é a massa (em gramas) de alginato precipitado,  $V$  (em litros) é o volume da amostra e  $t$  é o tempo de cultivo (em horas).

### 3.5 FATOR DE RENDIMENTO

#### 3.5.1 Fator de rendimento de substrato em produto

O fator de rendimento de glicerol em alginato foi obtido conforme a Equação 2.

$$Y_{P/S} = \frac{C_f - C_0}{S_0 - S_f} \quad (2)$$

onde:  $Y_{P/S}$  é o fator de rendimento de substrato em produto em  $\text{gP.gS}^{-1}$ ,  $C_0$  e  $C_f$  são as concentrações de alginato, em  $\text{g.L}^{-1}$ , e  $S_0$  e  $S_f$  são as concentrações de substrato, em  $\text{g.L}^{-1}$ .

### 3.5.2 Fator de rendimento de biomassa em produto

O fator de rendimento de biomassa em alginato foi obtido conforme a Equação 3.

$$Y_{P/X} = \frac{C_f - C_0}{X_f - X_0} \quad (3)$$

onde:  $Y_{P/X}$  é o fator de rendimento de biomassa em produto em  $\text{gP.gX}^{-1}$ ,  $C_0$  e  $C_f$  são as concentrações de alginato ( $\text{g.L}^{-1}$ ) e  $X_0$  e  $X_f$  são as biomassas, em  $\text{g.L}^{-1}$ .

### 3.6 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho baseia-se na absorção de radiação infravermelha por moléculas de uma determinada substância, geralmente orgânica. Esta técnica é útil para investigar a presença de grupos funcionais em um dado material. Cada grupo absorve em frequência característica de radiação na região do infravermelho.

Uma molécula pode absorver energia proveniente da radiação eletromagnética, sofrendo vários tipos de excitação como a eletrônica, rotacional, mudança de spin e deformação de ligação, entre outras. A espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy* ou FTIR) refere-se à radiação de excitação a números de onda entre 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$ . A diferença entre o feixe de referência e o feixe transmitido mede a quantidade absorvida. Os números de onda de absorção relativos aos modos de vibração dependem da força da ligação química entre os dois átomos, e intensidade de absorção da diferença do momento dipolar nesta mesma ligação (SILVERSTEIN; BASSLER, 1962).

Amostra contendo 2mL de meio contendo apenas alginato, já centrifugada para a completa remoção de células, foi liofilizada para a preparação das pastilhas utilizadas no FTIR.

A utilização de pastilha de KBr é a mais recomendada para análise de sólidos, especialmente sob a forma de pó. Primeiramente triturou-se com um pistilo, dentro de um almofariz de ágata, 400mg de KBr (Brometo de Potássio) e, em seguida, 2mg de alginato; posteriormente misturaram-se os dois componentes e colocou-se em um

molde para pastilhas (pastilhador), seguido de compressão em prensa hidráulica com pressão de 8 toneladas por 7 minutos, obtendo-se pastilhas finas e transparentes.

As análises de FTIR das pastilhas foram realizadas com o equipamento Espectrofotômetro Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) *IR Prestige-21, Shimadzu*, no laboratório do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

### 3.7 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

O poder de resolução do MEV é muito grande quando comparado com o microscópio óptico, permitindo assim estudos altamente detalhados da morfologia superficial. Outra vantagem do MEV é a grande profundidade do foco. Além da capacidade da imagem provida pelos elétrons secundários produzidos quando os feixes de elétrons colidem na amostra, existem vários outros sinais providos pela interação do feixe de elétrons com o material. O principal aspecto de formação da imagem do MEV é um feixe altamente focado em um pequeno diâmetro (5 nm), que é sequencialmente escaneado sobre a superfície da amostra em um campo regular de exploração sob o comando da bobina eletromagnética provida de uma coluna microscópica. A microscopia eletrônica fornece informações morfológicas e topográficas necessárias para se analisar a superfície do sólido (WILLARD; MERRITT; DEAN, 1974).

Através do MEV pode-se assim, observar as possíveis mudanças realizadas nos polímeros como, por exemplo, a plastificação e a inserção de sal, que eventualmente podem levar à mudança da estrutura da amostra e, conseqüentemente, da superfície (SILVA; CALIMAN; SILVA, 2005).

### 3.8 MASSA MOLECULAR POR VISCOSIDADE INTRÍNSECA

A viscosidade intrínseca  $[\mu]$  é uma propriedade característica de uma macromolécula em um dado solvente e é uma medida do volume hidrodinâmico ocupado pelo polímero. Depende primeiramente da massa molecular, da rigidez da cadeia e da qualidade do solvente.

A viscosidade intrínseca está correlacionada com a massa molecular média ( $M_M$ ) pela equação de Mark-Houwink (LAUNEY; DOUBLIER; CUVELIER, 1986):

$$[\mu] = K (M_M)^a \quad (4)$$

onde K e a são constantes empíricas.  $K = 1,24 \cdot 10^{-4}$  e  $a = 0,9615$

Para a determinação da viscosidade intrínseca do alginato, primeiramente determinou-se a viscosidade cinemática ( $\nu$ ) utilizando viscosímetro *Cannon-Fenske* capilar número 75 para medir o tempo de escoamento da solução de alginato e solvente. A viscosidade cinemática foi calculada pela equação 5:

$$\nu = C \cdot t \quad (5)$$

onde C é a constante de calibração (em centistokes por segundo) do capilar utilizado; t é o tempo (em segundos) de escoamento da solução através do capilar.

Calculou-se a viscosidade dinâmica ( $\mu$ ) das amostras como mostrado na equação 6

$$\mu = \nu \cdot \rho \quad (6)$$

onde  $\mu$  é expresso em centipoise (cP) e  $\rho$  é a densidade da solução ( $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ ).

Estimou-se a viscosidade reduzida ( $\mu_{\text{red}}$ ) pela equação 7:

$$\mu_{\text{red}} = (\mu - \mu_s) / (\mu_s \cdot c) \quad (7)$$

onde  $\mu_s$  é a viscosidade do solvente e c é a concentração de alginato, expressa em  $\text{g} \cdot \text{dL}^{-1}$ .

A viscosidade intrínseca  $[\mu]$  pode então ser estimada extrapolando a curva de viscosidade reduzida ( $\mu_{\text{red}}$ ) versus concentração de alginato (c) para c tendendo a zero (Equação 8):

$$[\mu] = \lim (c \rightarrow 0) \mu_{\text{red}} \quad (8)$$

A partir da viscosidade intrínseca, a massa molecular de alginatos bacterianos pode ser estimada pela regressão de Mark-Houwink, como mostra a equação 9 (CLEMENTI; MORESI; PARENTE, 1999):

$$M_M = 1,151 \times 10^4 [\mu]^{1,04} \quad (9)$$

### 3.9 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Pseudomonas mendocina*

#### 3.9.1 Extração do DNA genômico

O DNA foi extraído utilizando kit de extração *UltraClean™ Microbial DNA Isolation*, seguindo as informações do fabricante.

Foram centrifugados 2 mL da cultura de *Pseudomonas mendocina* para a completa separação das células. As células foram ressuspensas com a adição de 300 µL de solução tampão contendo sais que estabilizam e homogenizam as células dispersas antes da lise (solução *MicroBead*). As células ressuspensas foram transferidas para um tubo *microbead*. Adicionou-se 50 µL da solução MD1, solução contendo dodecil sulfato de sódio (SDS), um detergente aniônico forte que rompe ácidos graxos e lipídeos associados com a membrana celular do micro-organismo favorecendo a lise das células. Os tubos foram agitados em vórtex na velocidade máxima por 10 minutos. A agitação cria condições químicas e mecânicas para o rompimento das células e a liberação dos ácidos nucleicos desejados.

Após a lise celular, centrifugou-se a amostra para a separação das partes celulares. O DNA, que permanece no sobrenadante, é separado do material orgânico sem DNA e material inorgânico pela adição de 100 µL da solução MD2, que contém reagentes para a precipitação desses materiais, e incubação a 4°C por 5 minutos. Nova centrifugação foi realizada e o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde adicionou-se 900 µL da solução MD3. Transferiu-se 700 µL para um tubo filtro *spin* e centrifugou-se por 30 segundos. O DNA fica retido na membrana de sílica contida nesse filtro e o sobrenadante pode ser descartado. O processo foi repetido com o restante do sobrenadante contendo a solução MD3. Ao tubo contendo o filtro, foram adicionados 300 µL da solução MD4, solução à base de etanol para lavagem do DNA; assim contaminantes são removidos enquanto o DNA permanece preso à membrana de sílica. Para a remoção do DNA retido na sílica, utilizou-se 50 µL de solução salina (MD5) que permite que o DNA se desprenda da membrana de sílica e permaneça na solução.

Todas as soluções usadas durante a extração do DNA foram fornecidas pelo kit.

Para avaliar a quantidade e o sucesso do produto de extração do ácido nucleico, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1 % (m/v).

O DNA extraído foi armazenado em freezer a uma temperatura de -20°C.

### 3.9.2 Amplificação do gene 16S rDNA por PCR

As amostras de DNA foram submetidas à reação de PCR para amplificação do gene 16S rDNA.

A solução de amplificação foi preparada contendo:

- 100 ng do DNA extraído (*template*);
- 25 µl de solução PCR mix contendo suprimento dos quatros nucleotídeos para a montagem do novo DNA (dNTP's 0,4 mM), solução tampão 2x, enzima *Taq* DNA polimerase 2,5U, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, albumina bovina (BSA) 2x.
- 1µl de cada iniciador (*primer*) (0,2 µmol.L<sup>-1</sup>). Os *primers* utilizados foram o 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 517R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3'),
- água ultrapura para completar, totalizando volume final de 50 µl.

As reações de PCR foram realizadas em termociclador *Thermo Hybaid - PCR Sprint*. As etapas da reação de PCR foram definidas conforme descrito na Tabela 1:

**Tabela 1** Etapas da reação de PCR.

Etapa	Tempo	Temperatura	Nº Ciclos
Desnaturação inicial	5 minutos	94°C	1 ciclo
Desnaturação	45 segundos	94°C	
Anelamento	1 minuto	55°C	35 ciclos
Extensão	1 minutos	72°C	
Extensão Final	6 minutos	72°C	1 ciclo

### 3.9.3 Purificação do DNA

A purificação do DNA foi realizada utilizando-se o kit de purificação de DNA Fermentas.

Ao produto de PCR foram adicionados três volumes de solução tampão de ligação (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 M NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% tween 20), 5 µl de suspensão de sílica (*glassmilk*) e incubado a 55°C por 5 minutos para permitir a ligação do DNA na sílica. A mistura foi centrifugada por 10 segundos e o sobrenadante foi descartado. O

pellet foi ressuspensionado utilizando 500 µl de solução *washing* diluída em etanol. Nova centrifugação foi realizada descartando-se o sobrenadante. Este processo de lavagem do DNA foi repetido três vezes. Para remoção total do etanol, deixou-se o pellet secar por 15 minutos antes da próxima etapa da purificação. O etanol residual na amostra de DNA pode inibir as reações enzimáticas subsequentes.

Ressuspendeu-se o pellet em água ultra pura e encubou-se a 55°C por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante contendo o produto de PCR purificado foi armazenado a -20°C.

#### 3.9.4 Eletroforese em gel de agarose 1%

Neste trabalho foi utilizada uma concentração de 1% de agarose, para separação de moléculas de DNA na faixa de 0,5 a 7 kb. A observação de ácidos nucleicos em gel de agarose foi realizada corando-se o gel em brometo de etídeo por 20 minutos e submetendo-o a uma luz ultravioleta. Como referência é utilizada uma amostra contendo fragmentos de DNA de peso molecular conhecido (1 kb DNA *ladder*).

Após as etapas de extração de DNA, PCR e purificação foram realizadas eletroforeses em gel de agarose 1% para a confirmação da presença de ácidos nucleicos.

#### 3.9.5 Quantificação em espectrofotômetro

Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260 nm. Para fazer a leitura no espectrofotômetro, utilizou-se uma diluição em água. Para estimar a concentração de DNA utilizou-se a seguinte relação:  $1OD_{260} = 50 \mu\text{g DNA}$ . Dessa forma, a concentração de DNA na amostra é obtida pelo seguinte cálculo:

$$[\text{DNA}] = \text{Valor da leitura em O.D.} \times 50 \times \text{Fator de diluição}$$

As proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280 nm. Sendo assim, a relação  $A_{260}/A_{280}$  fornece um parâmetro de avaliação da qualidade das preparações de ácidos nucleicos. Valores inferiores a 1,8 resultam de contaminação com proteína. (SAMBROOK, 1989).

#### 3.9.6 Sequenciamento

As amostras contendo produto de PCR foram enviadas para sequenciamento no Laboratório ACTGene (Centro de Biotecnologia,

UFRGS, Porto Alegre, RS). O laboratório utilizou o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* com capilares de 50 cm e polímero POP6 (*Applied Biosystems*). Os DNAs-molde (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* 5'-NNNNNNNNNNNN-3' e 2 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (*Applied Biosystems*) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystems*) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 minutos, seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 55°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol e lavagem com etanol a 60 %. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida, desnaturados a 95 °C por 5 minutos, resfriados em gelo por 5 minutos e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection* v1.0.1 (*Applied Biosystems*) com os parâmetros *Dye Set* "Z"; *Mobility File* "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"; *BioLIMS Project* "3100\_Project1"; *Run Module 1* "StdSeq50\_POP6\_50cm\_cfv\_100"; e *Analysis Module 1* "BC 3100SR\_Seq\_FASTA.saz".

### 3.9.7 Análise Filogenética

A sequência obtida foi comparada com as sequências depositadas no banco de dados GenBank (NCBI, 2011), pelo método BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). As sequências obtidas nessas consultas foram selecionadas e alinhadas por meio do programa MEGA 5 (TAMURA *et al.*, 2011). As matrizes de distâncias foram calculadas segundo JUNKES e CANTOR (1969), e árvores de distâncias filogenéticas pela topologia do vizinho mais próximo (*neighbor-joining*) como descrito por SAITOU e NEI (1987).

## 3.10 ANÁLISE DO FLUXO METABÓLICO

### 3.10.1 Construção da via metabólica

A análise do fluxo metabólico considerou uma rede de reações bioquímicas reportadas na literatura para produção de alginato por *Pseudomonas* (ANDERSON; HACKING; DAWES, 1987; GACESA, 1998). A via metabólica foi construída levando-se em consideração

dados da literatura em relação à biossíntese do alginato (ANDERSON; HACKING; DAWES, 1987; REMMINGHORST; REHM, 2006; GALINDO, et al., 2007; REHM; VALLA, 2007; REHM, 2010), ao metabolismo da *P. mendocina* (HACKING et al., 1983; SENGHA et al., 1989) e ao catabolismo do glicerol (ZHANG et al., 2008; SUN et al., 2008; GONG et al., 2009). As equações do balanço material formuladas para a rede metabólica são apresentadas no Anexo 7.2. As reações sequenciais foram agrupadas com o objetivo de minimizar as dimensões do sistema (STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU, NIELSEN, 1998).

### 3.10.2 Construção da matriz estequiométrica

Para a formulação de uma estequiometria geral para as reações celulares, considera-se um sistema onde  $N$  substratos serão convertidos em  $M$  produtos metabólicos e  $Q$  componentes de biomassa. As conversões são realizadas em  $J$  reações. As reações bioquímicas e as espécies consideradas, com seus respectivos coeficientes estequiométricos, irão compor os elementos da chamada matriz estequiométrica. A interseção de uma linha com uma coluna na matriz indica se certa espécie faz parte ou não de uma reação em particular e, de acordo com o sinal do elemento da matriz (isto é, de seu coeficiente estequiométrico), pode-se saber se este é um reagente (valor positivo) ou um produto (valor negativo) da reação. E ainda, pela magnitude do coeficiente sabe-se a quantidade relativa consumida ou produzida em uma determinada reação. A matriz estequiométrica é constante e determinada pela constituição genética do organismo (STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU, NIELSEN, 1998).

### 3.10.3 Cálculo das velocidades

#### 3.10.3.1 Cálculo das velocidades medidas experimentalmente

A partir dos perfis de concentração celular, ajustado ao modelo de Gompertz e dos perfis de formação de produto, consumo de substrato e de nitrogênio, ajustados ao modelo de Boltzman, utilizando o *software Origin 8.0*, os dados foram extrapolados e as velocidades específicas de crescimento celular ( $\mu_X$ ), formação de produto ( $\mu_P$ ), consumo de substrato ( $\mu_S$ ) e consumo de nitrogênio ( $\mu_N$ ) foram calculadas segundo o método geométrico proposto por Le Duy; Zajic, com as equações deste método implementadas em planilha de cálculo Microsoft Excel

(SCHMIDELL *et al.*, 2001). As equações utilizadas estão representadas pelas definições 10, 11, 12 e 13.

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (10)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt} \quad (11)$$

$$\mu_s = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt} \quad (12)$$

$$\mu_N = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dN}{dt} \quad (13)$$

### 3.10.3.2 Cálculo das velocidades internas

A partir da matriz estequiométrica construída e das velocidades externas, obtidas a partir dos dados experimentais como indicado no item anterior, utilizou-se o *software MATLAB 7.4* (Mathworks) para a obtenção das velocidades internas da via metabólica. O algoritmo utilizado está apresentado no Anexo 7.6.

Para a obtenção das relações estequiométricas de uma rede metabólica em formato matricial, devem-se identificar as reações linearmente dependentes. Para isso, primeiramente obtém-se a matriz de redundância **R**, cujo “rank” indica quantas equações do sistema são linearmente independentes:

$$R = (G_m - G_c * \text{pinv}(G_c) * G_m) \quad (14)$$

Onde  $G_m$  é a matriz estequiométrica com as velocidades medidas,  $G_c$  a matriz contendo as velocidades a serem estimadas e  $\text{pinv}(G_c)$  a pseudo-inversa de  $G_c$ .

Com o número de equações linearmente independentes, calcula-se a matriz de redundância reduzida:

$$R_{red} = K * R \quad (15)$$

onde **K** é um vetor de dimensões  $(1 \times j)$ , sendo  $j$  o número de colunas da matriz, com uns nas posições referentes às linhas linearmente

dependentes, obtidas após a análise do “rank” da matriz de redundância, e zeros nas demais posições. A partir da matriz redundância reduzida, o resíduo  $\varepsilon$  é obtido:

$$\varepsilon = R_{red} * v_m \quad (16)$$

O resíduo é, então, usado para o cálculo da função  $P_\varepsilon$ , definida como:

$$P_\varepsilon = R_{red} * P_m * R_{red}' \quad (17)$$

E, em seguida para o cálculo da função teste:

$$h_\varepsilon = \varepsilon' * \text{inv}(P_\varepsilon) * \varepsilon \quad (18)$$

Assume-se que a função teste  $h_\varepsilon$  segue distribuição  $\chi^2$  o que indica se os ruídos das medidas estão ou não correlacionados. Os graus de liberdade da distribuição  $\chi^2$  são iguais ao “rank” da matriz de redundância  $\mathbf{R}$ . Se  $h_\varepsilon$  é maior que  $\chi_{95\%}^2(\text{rank}(P_\varepsilon))$  é sinal de que o modelo está incorreto ou existe um erro de medida. Se  $h_\varepsilon \leq \chi_{95\%}^2(\text{rank}(P_\varepsilon))$  pode-se obter novas estimativas para os fluxos medidos e para os fluxos estimados.

$$v_{mnew} = (\text{eye}(\text{size}(P_m)) - P_m * R_{red}' * \text{inv}(P_\varepsilon) * R_{red}) * v_m; \quad (19)$$

$$v_c = -\text{pinv}(G_c) * G_m * v_{mnew} \quad (20)$$

### 3.10.4 Análise de sensibilidade

A análise de sensibilidade é um meio sistemático para quantificar a relação entre os parâmetros do modelo e os resultados obtidos pelo modelo. A medida da sensibilidade de uma matriz é também chamada de número condicional,  $C$ , cuja magnitude fornece informações importantes sobre os requisitos de precisão nos fluxos medidos:

$$C = \|G\| \| (G')^\# \| \quad (21)$$

Para uma matriz estequiométrica ser considerada bem condicionada, o número condicional deve estar entre 1 e 100 (STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU, NIELSEN, 1998). Como o número condicional não fornece nenhuma informação sobre a sensibilidade dos cálculos no que diz respeito às variações nos fluxos medidos, tal informação é obtida pelos elementos da matriz solução.

$$\frac{dv_c}{dv_m} = -(G'_c)^{\#} G'_m \quad (22)$$

A Equação (22) mostra a sensibilidade dos fluxos calculados a pequenas perturbações nas medidas (STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU, NIELSEN, 1998). Uma das vantagens dessa análise quando usada para otimizar o modelo de fluxos metabólicos é o cálculo dos valores marginais dos metabólitos intermediários. O valor marginal se refere à sensibilidade da função objetivo para mudança em uma variável.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DAS FONTES DE CARBONO E DE NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE ALGINATO

Com o objetivo de avaliar o efeito da concentração de glicerol e de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  em cada ensaio, os dados experimentais obtidos foram plotados para as concentrações de glicerol, nitrogênio, biomassa e produto nas concentrações iniciais de substrato de  $20 \text{ g.L}^{-1}$  e  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 6),  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato e  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 7),  $20 \text{ g.L}^{-1}$  e  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 8),  $20 \text{ g.L}^{-1}$  e  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 9),  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato e  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 10),  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato e  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 11),  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato e  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 12),  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato e  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 13),  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato e  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 14),  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato e  $1,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 15),  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato e  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 16) e  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de substrato e  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 17).

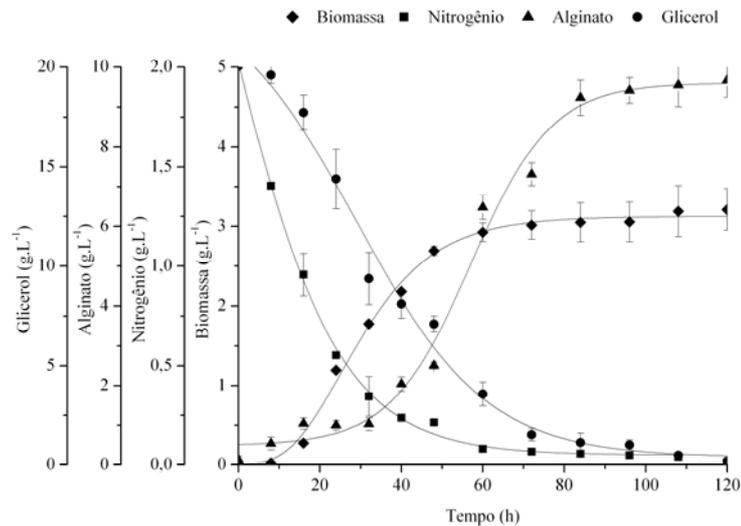


Figura 6 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (♦) e formação de alginato (▲), quando utilizado  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol e  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

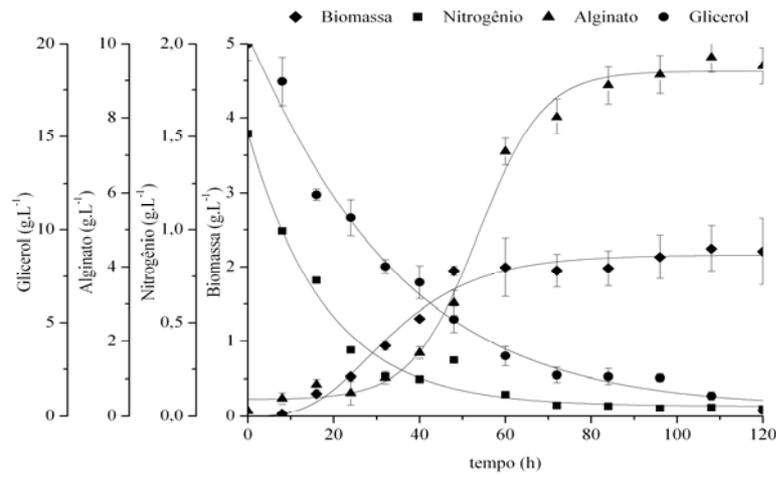


Figura 7 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 1,5 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

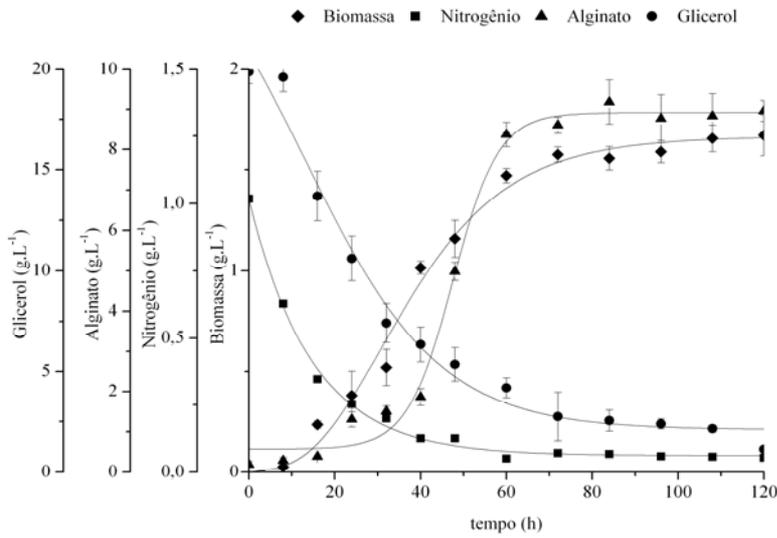
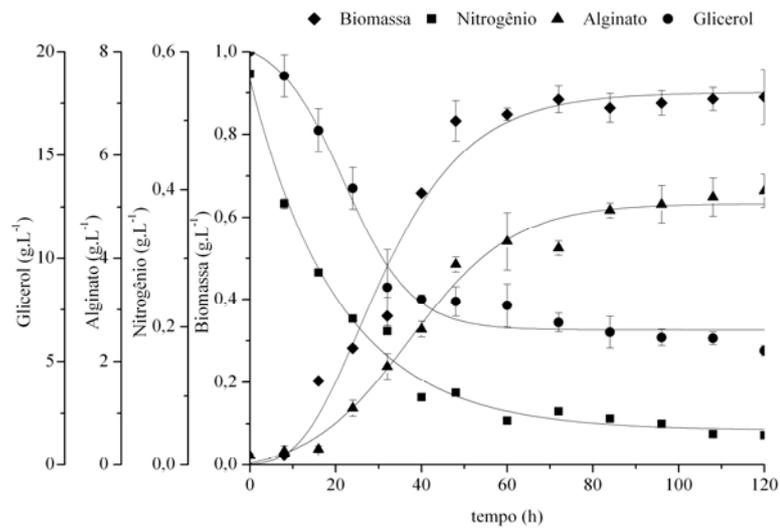


Figura 8 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 1,0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



**Figura 9** Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (♦) e formação de alginato (▲), quando utilizado 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

O aumento na concentração de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tem efeito positivo sobre a produção de alginato, elevando sua produção máxima de 5,31 g.L<sup>-1</sup>, na presença de 0,5 de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 9), para 10 g.L<sup>-1</sup>, na presença de 2,0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 6).

No entanto, a elevação da concentração de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> causou um declínio no crescimento celular, reduzindo a concentração celular de 3,2 g.L<sup>-1</sup> na presença de 2,0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 6), para 0,9 g.L<sup>-1</sup> na presença de 0,5 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 9).

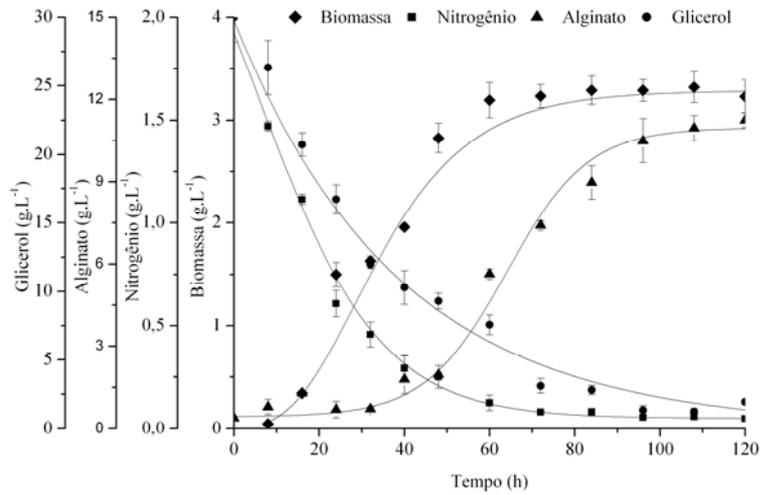


Figura 10 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 30 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 2,0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

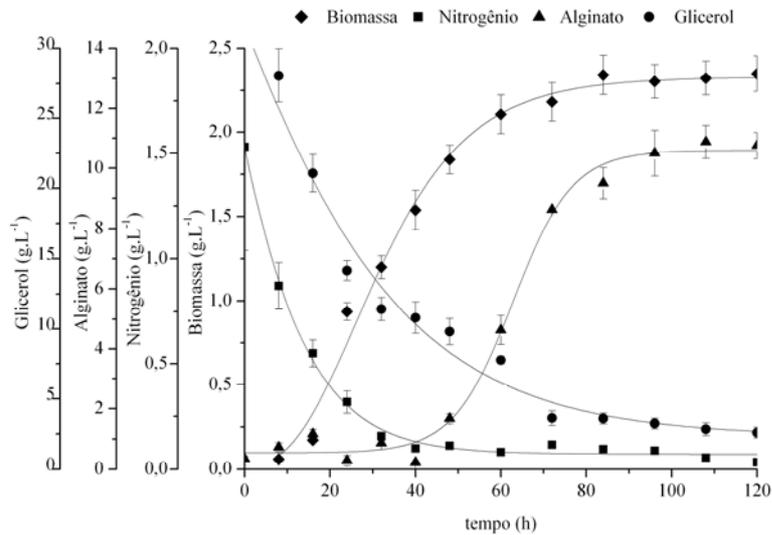
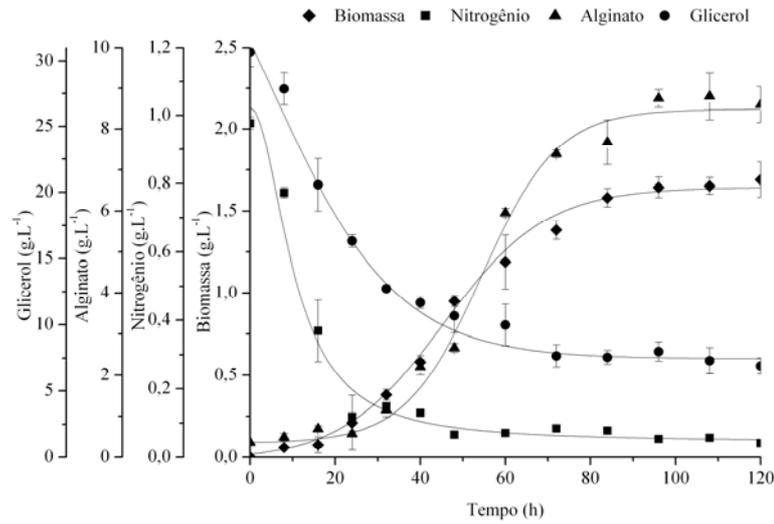
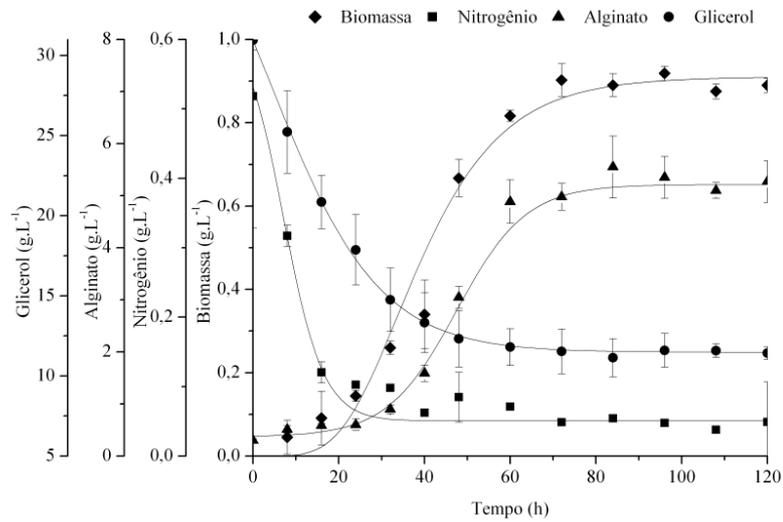


Figura 11 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 30 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 1,5 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



**Figura 12** Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 30 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 1,0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

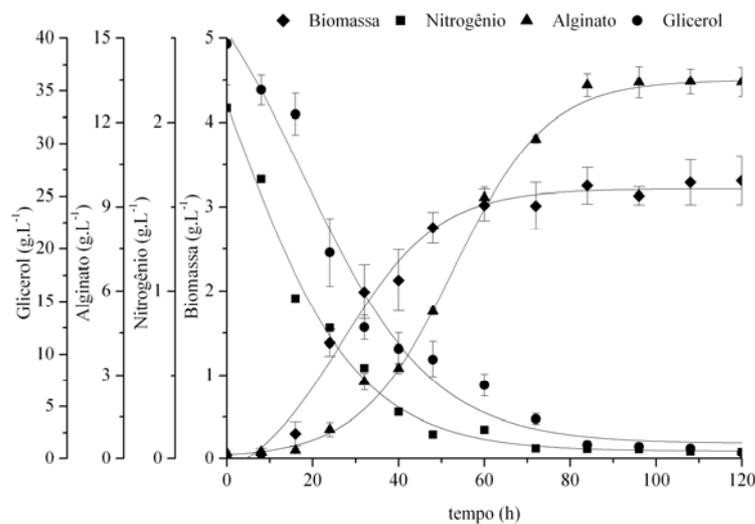


**Figura 13** Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 30 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

De modo geral, o aumento na concentração inicial de glicerol retardou o início da produção de alginato e aumentou a sua produção se comparado com os ensaios com 20 g.L<sup>-1</sup> de concentração inicial de glicerol. A concentração final de alginato, obtida utilizando 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, foi de 9,67 g.L<sup>-1</sup>. Aumentando essa concentração de glicerol para 30 g.L<sup>-1</sup>, a concentração final de alginato obtida foi de 11,25 g.L<sup>-1</sup>.

A concentração inicial de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> apresentou o mesmo efeito observado nos ensaios utilizando 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol (Figuras 6, 7, 8 e 9), causando um declínio no crescimento celular, reduzido de 3,86 g.L<sup>-1</sup> na presença de 2,0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 10) para 1,89 na presença de 0,5 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 13).

Sobre a produção de alginato, o efeito do aumento da concentração inicial da fonte de nitrogênio foi positivo, elevando a produção de 5,27 g.L<sup>-1</sup>, na presença de 0,5 de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 10), para 11,25 g.L<sup>-1</sup>, na presença de 2,0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 13).



**Figura 14** Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (♦) e formação de alginato (▲), quando utilizado 40 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 2,0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

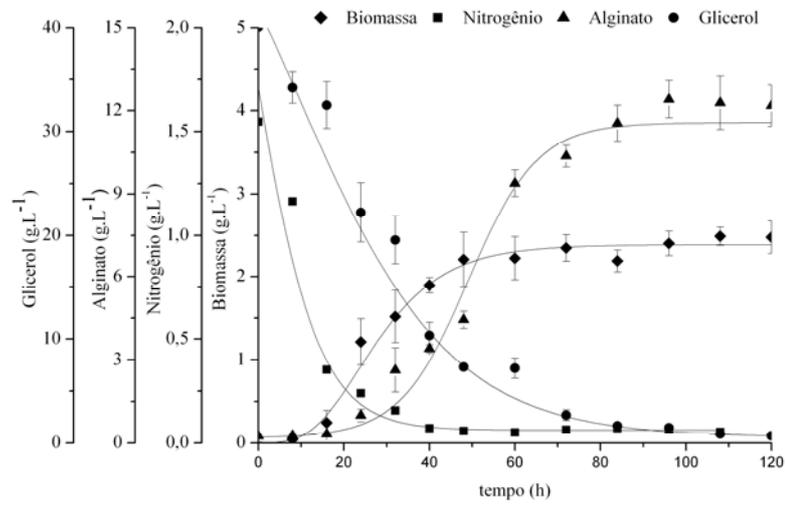


Figura 15 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 40 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 1,5 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

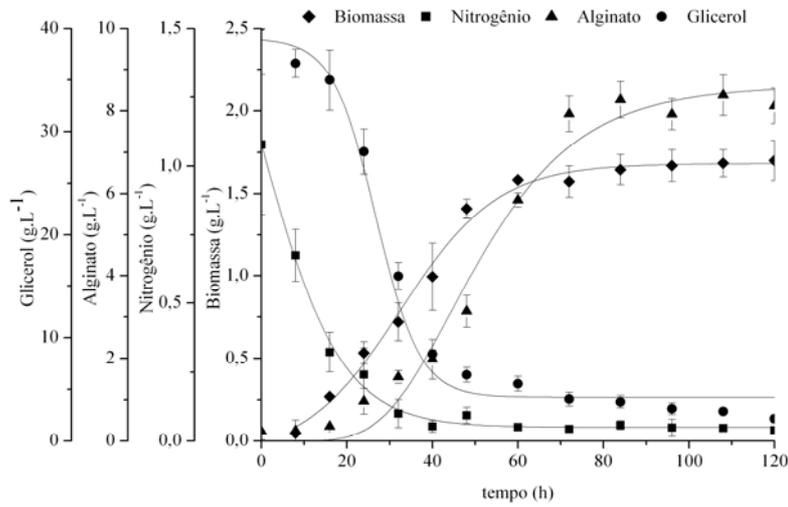
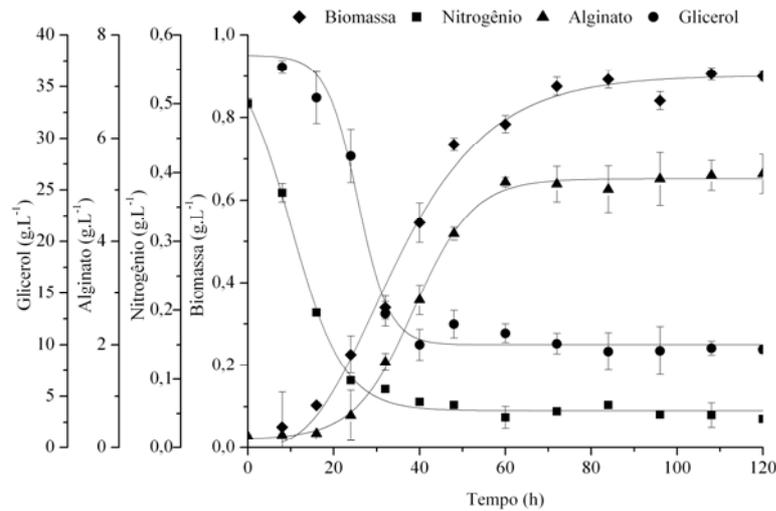


Figura 16 Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 40 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 1,0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



**Figura 17** Curvas de consumo de glicerol (●), consumo de nitrogênio (■), formação de biomassa (◆) e formação de alginato (▲), quando utilizado 40 g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

A utilização de 40 g.L<sup>-1</sup> de glicerol, provocou o aumento da produção de alginato, apresentando, nesses ensaios, concentração final máxima de alginato de 13,44 g.L<sup>-1</sup> (Figura 14), enquanto a concentração máxima de alginato obtida nos ensaios com 20 g.L<sup>-1</sup> de glicerol foi de 9,67 g.L<sup>-1</sup> (Figura 6) e de 11,25 g.L<sup>-1</sup>, com concentração de glicerol para 30 g.L<sup>-1</sup> (Figura 10).

Como o observado nos ensaios apresentados anteriormente, a concentração inicial de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> provocou um declínio no crescimento celular, reduzindo de 3,60 g.L<sup>-1</sup> na presença de 2,0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 14) para 1,13 na presença de 0,5 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 17), e um aumento da produção de alginato, elevando a produção de 5,31 g.L<sup>-1</sup>, na presença de 0,5 de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 17), para 13,44 g.L<sup>-1</sup>, na presença de 2,0 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 17).

Analisando as Figuras 6 a 17, observou-se que *Pseudomonas mendocina* sintetizou o alginato principalmente durante o final da fase exponencial e começo da fase estacionária de crescimento. A velocidade de produção de alginato não aumentou após o crescimento celular atingir a fase estacionária. Este comportamento foi reportado também por SENGHA *et al* (1989) utilizando glicose como fonte de carbono

para a produção de alginato por *P. mendocina* e por HORAN *et al* (1981) utilizando *A. vinelandii*.

O aumento da concentração de glicerol retardou o início da produção de alginato e diminuiu a sua produção de modo geral.

A diferença na variação de crescimento celular observado foi causada pela variação concentração inicial da fonte de nitrogênio. Pode-se observar que em todos os ensaios, o  $(\text{NH}_4)\text{SO}_2$  foi totalmente consumido.

Em ensaios com menores concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  houve uma quantidade elevada de glicerol residual, em média 30 %, como pode ser observado nas Figuras 9, 13 e 17 referentes aos experimentos com  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ . No ensaio com  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol e  $1,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Figura 12), um comportamento semelhante foi observado, com 23% de substrato não consumido.

#### 4.2 CÁLCULO DE PRODUTIVIDADE E RENDIMENTO

Ao final do experimento, a produtividade, rendimento de substrato em produto e o rendimento de biomassa em produto foram calculados conforme as Equações 1, 2 e 3. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 2.

Como pode ser observado na Tabela 2, as melhores produtividades foram obtidas quando as maiores concentrações de glicerol foram utilizadas. A concentração inicial de substrato parece exercer maior influência na produtividade do que a concentração inicial de nitrogênio, visto que as variações na produtividade foram maiores entre concentrações diferentes de glicerol e menores entre concentrações diferentes de nitrogênio em ensaios utilizando uma mesma concentração de glicerol.

Neste trabalho as maiores concentrações de alginato foram obtidas nas maiores concentrações de fonte de carbono, obtendo-se até  $13,44 \text{ g.L}^{-1}$  quando utilizado  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol e  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

**Tabela 2 Resultados obtidos para a produção de alginato por *P. mendocina* em cultivo de 120 horas.**

S (g.L <sup>-1</sup> )	N (g.L <sup>-1</sup> )	t (h)	C (g.L <sup>-1</sup> )	P (g.L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (gP.gS <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/X</sub> (gP.gX <sup>-1</sup> )
20	2,0	120	9,67 ± 0,54	0,08 ± 0,01	0,42 ± 0,04	2,97 ± 0,51
20	1,5	120	9,40 ± 0,63	0,08 ± 0,02	0,43 ± 0,07	4,19 ± 0,25
20	1,0	120	8,96 ± 0,30	0,07 ± 0,01	0,44 ± 0,02	5,25 ± 0,21
20	0,5	120	5,31 ± 0,56	0,04 ± 0,01	0,45 ± 0,03	5,70 ± 0,58
30	2,0	120	11,25 ± 1,15	0,09 ± 0,02	0,33 ± 0,03	3,36 ± 0,21
30	1,5	120	10,75 ± 0,51	0,09 ± 0,01	0,33 ± 0,02	4,43 ± 0,22
30	1,0	120	8,61 ± 0,70	0,07 ± 0,01	0,34 ± 0,01	4,88 ± 0,21
30	0,5	120	5,27 ± 0,32	0,04 ± 0,01	0,36 ± 0,01	5,58 ± 0,37
40	2,0	120	13,44 ± 1,04	0,11 ± 0,01	0,31 ± 0,01	4,00 ± 0,31
40	1,5	120	12,18 ± 0,65	0,10 ± 0,01	0,31 ± 0,02	4,81 ± 0,22
40	1,0	120	8,12 ± 0,94	0,07 ± 0,02	0,31 ± 0,01	4,64 ± 0,27
40	0,5	120	5,31 ± 0,73	0,05 ± 0,01	0,32 ± 0,03	5,59 ± 0,43

S = glicerol, N= (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, t= tempo, C= concentração de alginato, P = produtividade, Y<sub>P/S</sub>= rendimento de produto em relação ao substrato e Y<sub>P/X</sub>= rendimento de produto em relação à biomassa.

Os resultados obtidos neste trabalho foram comparados aos resultados reportados na literatura, e estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3 Comparação entre resultados reportados na literatura e resultados obtidos neste trabalho para concentração de biopolímero, fator de conversão de substrato em produto e fator de conversão de produto em relação à biomassa.**

Autor	Micro-organismo	S	C (g.L <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/S</sub> (gP.gS <sup>-1</sup> )	Y <sub>P/X</sub> (gP.gX <sup>-1</sup> )
TRUJILLO-ROLDÁN <i>et al.</i> , (2003)	<i>A. vinelandii</i>	sacarose	4,00	-	-
CHEN <i>et al.</i> (1985)	<i>A. vinelandii</i>	sacarose	6,22	0,31	-
HORAN <i>et al.</i> (1981)	<i>A. vinelandii</i>	sacarose	6,00	0,62	-
SENGHA <i>et al.</i> (1989)	<i>P. mendocina</i>	glicose	23,5	-	-
MÜLLER e MONTE ALEGRE (2007)	<i>P. mendocina</i>	glicose	12,3	0,45	-
BRIGIDO (2010)	<i>P. mendocina</i>	glicerol	11,72	0,35	-
PRIEGO-JIMENÉZ <i>et al.</i> (2005)	<i>A. vinelandii</i>	sacarose	-	-	2,6
DÍAZ-BARRERA <i>et al.</i> (2009)	<i>P. mendocina</i>	glicose	-	-	4,2
PARENTE <i>et al.</i> (1998)	<i>A. vinelandii</i>	glicose	-	0,23	1,5
Este Trabalho	<i>P. mendocina</i>	glicerol	13,44	0,45	5,7

S = fonte de carbono, C= concentração de alginato, YP/S= rendimento de produto em relação ao substrato e YP/X = rendimento de produto em relação à biomassa.

Na síntese de alginato por *Azotobacter vinelandii*, utilizando sacarose como fonte de carbono na concentração de 20g.L<sup>-1</sup>, foram observadas concentrações finais de 4,0 g.L<sup>-1</sup> (TRUJILLO-ROLDÁN *et al.*, 2003); 6,22 g.L<sup>-1</sup> (CHEN *et al.*, 1985) e 6,0 g.L<sup>-1</sup> (HORAN *et al.*, 1981).

SENGHA *et al.* (1989) obtiveram em seus estudos de síntese de alginato por *Pseudomonas mendocina* uma concentração de 23,5 g.L<sup>-1</sup>

do biopolímero ao final do cultivo. MÜLLER e MONTE ALEGRE (2007) obtiveram concentração final de  $12,3 \text{ g.L}^{-1}$  em experimentos com  $0,8 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  e  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose. Utilizando o mesmo micro-organismo BRIGIDO (2010) obteve concentração final de biopolímero de  $11,26$  utilizando  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose como fonte de carbono e  $11,72 \text{ g.L}^{-1}$  utilizando  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol.

Os rendimentos de alginato em relação à concentração de biomassa obtidos neste trabalho foram maiores para ensaios realizados com menores concentrações de nitrogênio, ou seja, ensaios que apresentaram os menores crescimentos celulares. Sendo que o maior rendimento obtido foi de  $5,70 \text{ gP.gX}^{-1}$ , nas concentrações de  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol e  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

Estudos realizados por PRIEGO-JIMENÉZ *et al.* (2005) sugerem que condições que levam a um menor crescimento coincidem com altos rendimentos de alginato em relação à biomassa ( $Y_{P/X}$ ), em seus estudos foram reportados rendimentos em biomassa ( $Y_{P/X}$ ) de  $2,6 \text{ gP.gX}^{-1}$ . Resultados similares foram reportados por SENGHA *et al.* (1989) para culturas de *Pseudomonas mendocina*. DÍAZ-BARRERA *et al.* (2009) reportaram um rendimento de produto em biomassa de  $4,2 \text{ gP.gX}^{-1}$  na produção de alginato por *Azotobacter vinelandii*. PARENTE *et al.* (1998), no entanto, reportaram rendimento de apenas  $1,5 \text{ g}$  de alginato/g de biomassa.

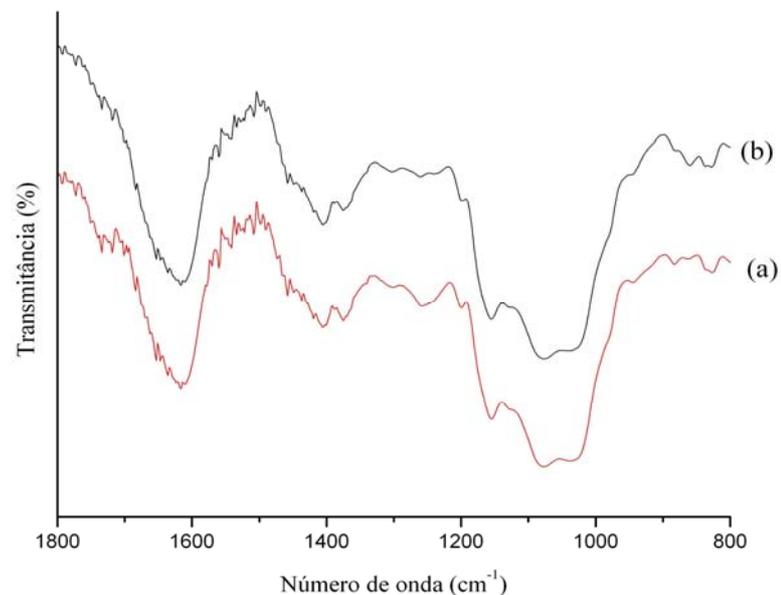
Assim como  $Y_{P/X}$ , o rendimento de produto em substrato ( $Y_{P/S}$ ) foi maior em concentrações menores de nitrogênio e de glicerol. Neste trabalho, o rendimento em substrato variou de  $0,31 \text{ gP.gS}^{-1}$  em culturas com maior crescimento celular ( $40 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol e  $2,0 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) a  $0,45 \text{ gP.gS}^{-1}$  em culturas com menor crescimento celular ( $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicerol e  $0,5 \text{ g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ).

Estudos reportados na literatura para a produção de alginato por *Pseudomonas mendocina*, indicam rendimentos de  $0,45 \text{ gP.gS}^{-1}$  utilizando  $20 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose como substrato (MÜLLER; MONTE ALEGRE, 2007) e  $0,33 \text{ gP.gS}^{-1}$  utilizando  $100 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose (BRIGIDO, 2010). Utilizando glicerol como fonte de carbono os valores reportados para o rendimento são de  $0,35 \text{ gP.gS}^{-1}$  utilizando concentração inicial de  $40 \text{ g.L}^{-1}$  (BRIGIDO, 2010). Na produção de alginato por *Azotobacter vinelandii* o rendimento reportado é de  $0,31 \text{ gP.gS}^{-1}$  obtido por CHEN *et al.*, (1985) e de  $0,23 \text{ gP.gS}^{-1}$  obtido em estudos de PARENTE *et al.* (1998). SENGHA *et al.* (1989) obtiveram um fator de conversão de glicose em alginato de  $0,62 \text{ gP.gS}^{-1}$  em culturas com menor crescimento celular e  $0,38 \text{ gP.gS}^{-1}$  em culturas com maior crescimento.

Os resultados deste trabalho demonstram que em condições que favorecem um baixo crescimento celular, *Pseudomonas mendocina* emprega a fonte de carbono principalmente na síntese de alginato. No entanto, apesar de apresentar os melhores rendimentos de produto em relação à biomassa e ao substrato, os ensaios que apresentaram menores crescimentos celulares apresentaram também uma baixa produtividade. Esse problema também foi observado por PRIEGO-JIMENEZ em seu estudo para síntese de alginato por *Azotobacter vinelandii*.

#### 4.3 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO (FTIR)

O alginato produzido por *P. mendocina*, utilizando glicerol como fonte de carbono, foi caracterizado por espectroscopia em Infravermelho (Figura 18). Amostras de alginato desacetilado também foram avaliadas. O espectro obtido foi similar aos apresentados por HACKING *et al.* (1983) e MÜLLER; MONTE ALEGRE (2007).



**Figura 18** Espectro de infravermelho para o alginato produzido por *Pseudomonas mendocina*. (a) alginato, (b) alginato desacetilado.

Os espectros apresentaram as bandas características de ácidos carboxílicos: banda intensa na região de  $1725 \pm 65 \text{ cm}^{-1}$  resultante da deformação axial da ligação C=O; banda de média intensidade na região de  $1395 \pm 55 \text{ cm}^{-1}$  resultante da deformação angular no plano do grupo OH...O. Esta banda pode se acoplar com a banda de deformação axial da ligação C-O, que resulta em uma banda de intensidade moderada na região de  $1250 \pm 80 \text{ cm}^{-1}$ ; Quando um ácido carboxílico transforma-se em carboxilato, as ligações C=O e C-O são substituídas por duas ligações equivalentes C-O, as quais são intermediárias em constante de força entre C=O e C-O. Portanto, o íon carboxilato apresenta duas bandas características, uma das quais é intensa, proveniente da deformação axial assimétrica da ligação C-O e aparece entre 1650 e  $1550 \text{ cm}^{-1}$ . A outra, mais fraca, é observada em torno de  $1400 \text{ cm}^{-1}$  e provém da deformação axial simétrica da ligação (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

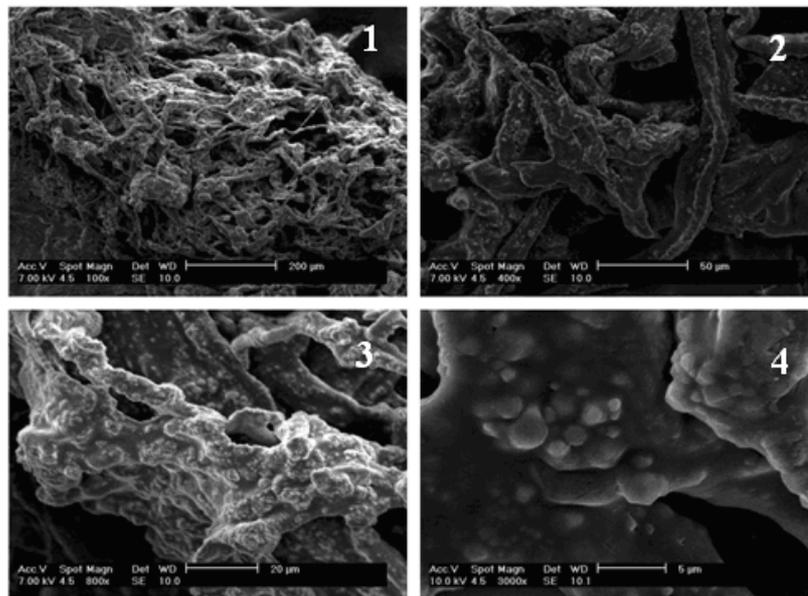
Os espectros dos dois materiais (Figura 18) diferem apenas pela presença de bandas de absorção nos comprimentos de onda de  $1720 \text{ cm}^{-1}$  e  $1257 \text{ cm}^{-1}$  que caracterizam o grupo acetil. Esse grupo está associado aos resíduos manurônicos do alginato sintetizado por micro-organismos e pode ser facilmente removido caso seja necessário.

#### 4.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para avaliação da morfologia do material produzido pelo micro-organismo, o meio de cultura foi centrifugado para separação das células e o sobrenadante contendo o biopolímero foi dialisado por 36 horas em uma solução de NaCl 0,05 M (12 horas) e água destilada (24 horas) para remoção dos sais tamponantes.

As micrografias eletrônicas de varredura são apresentadas na Figura 19, onde são identificadas quatro escalas de aumento diferentes.

As micrografias mostram detalhes da superfície, onde se observa uma estrutura fibrilar com poros irregulares. Nas micrografias também se pode observar, na imagem com o maior aumento, cristais na superfície do biopolímero, o que pode estar associado à presença de sais proveniente do processo de diálise.



**Figura 19** Micrografias de alginato produzido por *P. mendocina*, com aumento de: 1 – 100x, 2 – 400x, 3- 800x e 4 – 3000x.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DA MASSA MOLECULAR POR VISCOSIDADE INTRÍNSECA

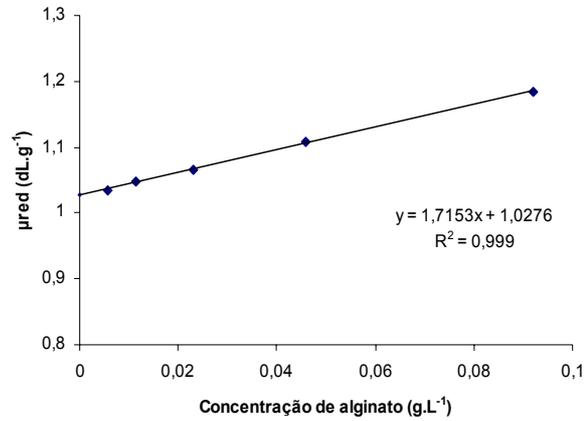
Alginato com elevada massa molecular pode ser vantajoso para o crescimento bacteriano em ambiente natural, onde a limitação de nutrientes é comum e apenas baixas velocidades específicas de crescimento são possíveis (PRIEGO-JIMENÉZ *et al.*, 2005).

A massa molecular afeta diretamente as propriedades reológicas do alginato, sendo um dos fatores que determinam a sua utilidade em indústrias farmacêutica ou de alimentos (GALINDO *et al.*, 2007). Alginatos bacterianos possuem uma maior massa molecular quando comparados com alginatos de algas, que variam entre 48 a 186 kg.mol<sup>-1</sup>. PEÑA *et al.* (2002) reportaram a produção de alginato com massa molecular de até 4000kg.mol<sup>-1</sup>, produzido por uma cepa mutante de *A. vinelandii*.

Neste trabalho a massa molecular foi determinada por viscosidade intrínseca, que é a propriedade característica de uma única macromolécula em um dado solvente. É uma medida do volume

hidrodinâmico ocupado pelo polímero e depende principalmente da massa molecular ( $M_M$ ), rigidez da cadeia e qualidade do solvente.

A viscosidade cinemática foi determinada em viscosímetro capilar *Cannon-Fenske*, utilizando capilar nº 75, com constante de calibração  $c = 0,008 \text{ cS.s}^{-1}$ . As viscosidades cinemáticas, dinâmicas, reduzidas e intrínseca foram calculadas seguindo as Equações 5 a 8. A curva de viscosidade reduzida versus a concentração de alginato é apresentada na Figura 20.



**Figura 20** Efeito da concentração de alginato na viscosidade reduzida ( $\mu_{red}$ ) a  $25^\circ\text{C}$  em dispersões de  $0,1 \text{ M NaCl}$ .

Com os dados obtidos  $[\mu]$  é possível, a partir da Equação 4, calcular a massa molecular para o alginato.

**Tabela 4** Massa molecular do alginato nas diferentes concentrações de glicerol e nitrogênio.

Glicerol (g.L <sup>-1</sup> )	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Massa Molecular (kg.mol <sup>-1</sup> )
20	2,0	228,00
	1,5	233,06
	1,0	183,06
	0,5	176,51
30	2,0	212,52
	1,5	203,60
	1,0	181,27
	0,5	167,88
40	2,0	251,63
	1,5	229,13
	1,0	235,20
	0,5	160,74

Como se pode observar na Tabela 4, alginato com maior massa molecular foi obtido quando utilizada as maiores concentrações de glicerol (40 g.L<sup>-1</sup>) e de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2,0 g.L<sup>-1</sup>). Em todos os ensaios as menores massas moleculares foram obtidas em concentrações menores de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 g.L<sup>-1</sup>).

DÍAZ-BARRERA *et al.* (2009) investigaram a influência da agitação e da transferência de oxigênio e na massa molecular de alginato produzido por *Azotobacter vinelandii.*, obtendo, à uma velocidade de crescimento constante, grandes variações na massa molecular que variou de 860 a 1690kg.mol<sup>-1</sup>.

PRIEGO-JIMENÉZ *et al.* (2005) também sugerem que uma baixa velocidade de crescimento celular ( $\mu < 0.1 \text{ h}^{-1}$ ) resulta em alginato com alta massa molecular, obtendo um aumento de 300 kg.mol<sup>-1</sup> para 1300 kg.mol<sup>-1</sup> diminuindo a velocidade de crescimento de 0,09 para 0,03h<sup>-1</sup>.

TRUJILLO-ROLDAN *et al.* (2003) obtiveram alginatos com 905 kg.mol<sup>-1</sup> produzidos por *Azotobacter vinelandii.*

Na Tabela 5, foram comparados os valores obtidos neste trabalho e os apresentados na literatura.

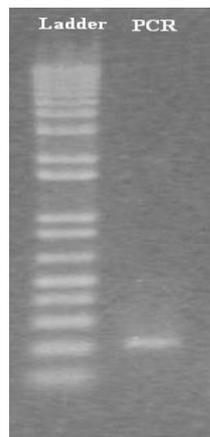
**Tabela 5 Valores obtidos na literatura e neste trabalho para a massa molecular (kg.mol<sup>-1</sup>).**

<b>Autor</b>	<b>Massa Molecular (kg.mol<sup>-1</sup>)</b>
DÍAZ-BARRERA <i>et al.</i> (2009)	860 a 1690
PRIEGO-JIMENÉZ <i>et al.</i> (2005)	300 a 1300
TRUJILLO-ROLDAN <i>et al.</i> (2003)	905
Este trabalho	161 a 252

Neste trabalho foram obtidas massas moleculares que variaram de 161 a 252kg.mol<sup>-1</sup>. Foram obtidos alginatos com baixa massa molecular quando comparados com aqueles obtidos por DÍAZ-BARRERA *et al.* (2009), PRIEGO-JIMENÉZ *et al.* (2005) e TRUJILLO-ROLDAN *et al.* (2003). DÍAZ-BARRERA *et al.* obtiveram um aumento significativo da massa molecular (aumentou de 850 para 1690 kg.mol<sup>-1</sup>) quando aumentou a velocidade de agitação de 300 rpm para 400rpm. A baixa massa molecular obtida neste trabalho pode ter ocorrido pela baixa velocidade de agitação (240rpm).

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA *Pseudomonas mendocina*

Para a caracterização molecular da *P. mendocina* foi realizado inicialmente a extração do DNA do micro-organismo, seguido de PCR para a amplificação do gene 16S rDNA. Na Figura 21, observa-se a foto do gel corrido. Na primeira coluna tem-se o DNA de referência (*ladder*), de peso molecular conhecido. Na segunda coluna, observa-se o produto de PCR com amplificação de segmentos de aproximadamente 200 pares de base do gene 16S rDNA extraído.



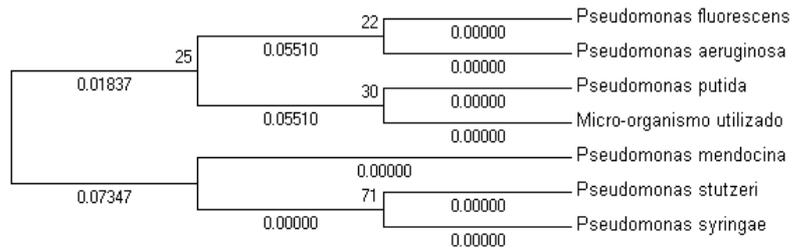
**Figura 21** Eletroforese em gel de agarose 1%, primeira banda – ladder, segunda banda – Produto de PCR.

As amostras de produto de PCR foram enviadas para o sequenciamento. A sequência obtida foi visualizada no programa *Chromas Lite* versão 2.01 e está apresentada no Anexo 7.2. Para o sequenciamento um marcador fluorescente é ligado a um *primer*, cada um com cor diferente para cada término de cadeia, por exemplo, verde para término em adenina, vermelho para timina. Assim cada nucleotídeo é representado por uma cor e determinado pela intensidade fluorescente.

A homologia das sequências de 16S rDNA foi determinada pela sua comparação com as sequências depositadas no banco de dados GenBank, no site NCBI (National Center for Biotechnology Information), pelo método BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

As sequências obtidas nessas consultas foram selecionadas e alinhadas por meio do programa MEGA 5 (TAMURA *et. al.*, 2011). As matrizes de distâncias foram calculadas segundo JUNKES e CANTOR (1969), e árvores de distâncias filogenéticas pela topologia do vizinho mais próximo (*neighbor-joining*) como descrito por SAITOU e NEI (1987).

A sequência obtida para o micro-organismo é do gênero *Pseudomonas*, sendo próxima a *Pseudomonas putida*, como pode ser observado na Figura 22. E apresentou 90% de identidade com a *Pseudomonas mendocina*.



**Figura 22** Árvore filogenética, construída por meio do programa *MEGA5*. Os valores expressos na árvore, nos nós internos, se referem aos valores de *Bootstrap*, em 100 réplicas.

A árvore filogenética representa as relações evolutivas entre grupos de organismos, e pode ser utilizada em diversas aplicações da biologia molecular. Uma árvore filogenética é composta de nós internos, que representam as unidades ancestrais, e nós terminais, que são as unidades taxonômicas operacionais, além de ramos, que representam o número de mudanças que ocorrem em relação ao último nó (FUTUYMA, 1992). Os valores expressos na árvore, nos nós internos, se referem aos valores de *Bootstrap*, cujo cálculo permite a obtenção de um parâmetro que reflita a robustez da análise filogenética produzida. O *Bootstrap* consiste no número de ocorrência deste nó interno em 100 réplicas, e é gerado a partir da criação de vários conjuntos de sequências (NEI; KUMAR, 2000).

#### 4.7 FLUXO METABÓLICO

##### 4.7.1 Construção da rede metabólica

A rede metabólica para utilização de glicerol como fonte de carbono por *P. mendocina* para produção de alginato foi elaborada a partir de dados da literatura e esquematizada na Figura 23. Na rede considerou-se a via de gliconeogênese, ciclo do ácido cítrico (TCA), via Entner-Doudoroff, via da formação de biomassa e a via de produção de polimanuronato.

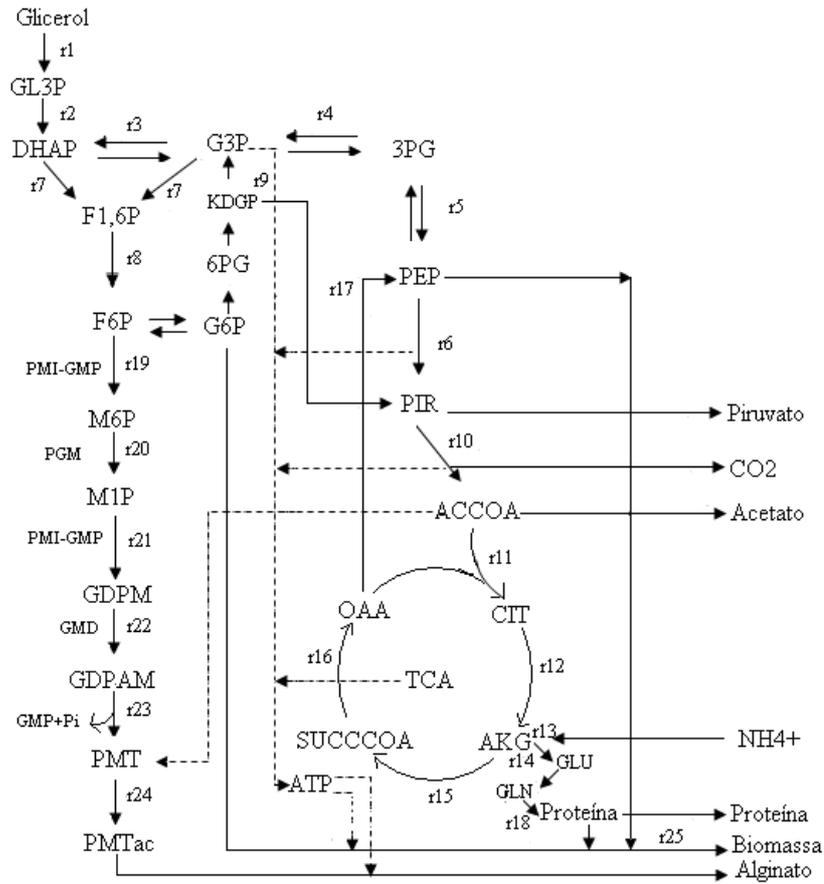


Figura 23 Via metabólica da produção de alginato por *P. mendocina*.

A primeira etapa para a utilização da fonte de carbono é a conversão deste substrato a gliceraldeído-3-fosfato, sendo possível a entrada deste composto na via de Entner-Doudoroff, rota alternativa à glicólise para a oxidação do substrato até o ácido pirúvico. O glicerol é inicialmente convertido a glicerol-3-fosfato. A enzima glicerol-3-fosfato desidrogenase converte este composto para dihidroxiacetona fosfato (DHAP) que é imediatamente convertida a gliceraldeído 3-fosfato. Os compostos gliceraldeído-3-fosfato e diidroxiacetona fosfato são isômeros e estão em equilíbrio. No entanto, como o gliceraldeído-3-fosfato é continuamente utilizado na próxima etapa da via, toda

dihidroxiacetona fosfato é convertida a gliceraldeído-3-fosfato. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003)

A enzima gliceraldeído-3-P-desidrogenase catalisa a reação seguinte liberando como produtos NADH + H<sup>+</sup> e ácido 1,3-difosfoglicérico. O grupo fosforil do ácido 3-fosfoglicérico é transferido da posição 3 para a posição 2 na reação chamada fosfogliceromutase. Uma molécula de água é então removida pela enzima enolase formando o fosfoenolpiruvato (PEP). O grupo fosforil é transferido para ADP pela enzima piruvato quinase. Em reação irreversível o PEP é convertido a piruvato, último metabólito da glicólise. (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003)

O piruvato é convertido irreversivelmente a acetil-CoA pelo complexo enzimático. Em aeróbios, a maior parte do piruvato entra (via acetil-CoA) no ciclo do ácido cítrico (ciclo TCA). O ciclo inicia-se com a condensação do oxalacetato com a acetil-CoA para formar citrato, que é conseqüentemente convertido em seu isômero isocitrato. O ciclo termina com o oxalacetato, o qual é substrato da via da gliconeogênese (ELLIOT; ELLIOT, 1997).

Uma vez formado o PEP, as reações da glicólise são reversíveis até que seja alcançada a frutose 1,6-difosfato. A conversão a frutose 1,6-difosfato ocorre pela reação livremente reversível da aldolase, onde as moléculas de dihidroxiacetona fosfato e gliceraldeído-3-fosfato resultam em uma molécula de frutose 1,6-difosfato (ELLIOT; ELLIOT, 1997). A ação da enzima frutose 1,6-difosfatase leva à formação da frutose 6-fosfato, composto precursor da síntese do alginato.

A fosfomanose isomerase/guanosina-difosfomanose pirofosforilase (PMI-GMP) é uma proteína bifuncional que atua catalisando a primeira e terceira etapas da síntese de alginato. A reação PMI retira a frutose 6-fosfato da via central do metabolismo, levando ao primeiro intermediário da síntese, a manose 6-fosfato. Fosfomanose mutase catalisa a segunda etapa, resultando em manose 1-fosfato. A atividade da GMP, com auxílio de GTP, converte manose 1-fosfato para GDP-manose. A enzima favorece a reação inversa, mas, devido à eficiente remoção da GDP-manose na próxima etapa, a via procede na direção do alginato. A reação quase irreversível de oxidação da GDP-manose para ácido GDP-manurônico envolve a enzima guanosina-difosfomanose desidrogenase, e o produto da reação é o precursor imediato da polimerização (REHM; VALLA, 1997).

O próximo passo na síntese do alginato envolve a transferência do precursor ácido GDP-manurônico através da membrana citoplasmática e a polimerização dos monômeros para polimanurato

(REMMINGHORST; REHM, 2006). A síntese do ácido GDP-manurônico é bastante conhecida. No entanto, pouco se conhece sobre o processo de polimerização (REHM; VALLA, 1997).

O conjunto de reações consideradas no desenvolvimento da via metabólica e utilizado para os cálculos dos fluxos intracelulares, e as enzimas envolvidas em cada reação são apresentados nos Anexos 7.3 e 7.4

#### 4.7.2 Construção da matriz estequiométrica

Para a construção da matriz estequiométrica (G), todos os metabólitos presentes na via metabólica foram identificados e colocados, sem repetições na primeira linha de uma planilha eletrônica. Cada reação, formulada a partir da rede metabólica, foi criada colocando-se os índices estequiométricos abaixo de cada metabólito e zeros nas demais posições. A matriz estequiométrica estruturada para o conjunto de reações está apresentada no Anexo 7.5.

#### 4.7.3 Cálculo das velocidades extracelulares

Os dados de concentração celular, glicerol, nitrogênio e de alginato, obtidos experimentalmente pelos métodos detalhados nos itens 3.3.1, 3.3.2, 3.3.3 e 3.3.4, foram plotados e submetidos à análise de regressão sigmoideal utilizando-se o programa *Origin 8.0*. A curva de crescimento celular foi ajustada ao modelo de Gompertz, e as curvas de consumo de glicerol, nitrogênio e formação de alginato foram ajustadas ao modelo de Boltzmann.

As velocidades específicas foram calculadas para o tempo de 20 horas, durante a fase exponencial de crescimento celular, e para o tempo de 80 horas de cultivo, durante a fase estacionária. Os valores obtidos são reportados na Tabela 6.

Pela Tabela 6, observou-se que a maior velocidade de formação de produto ocorreu em menores concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , no tempo de 20 horas. Neste tempo foi observada também a maior velocidade de consumo de glicerol.

As velocidades extracelulares  $v_S$ ,  $v_N$ ,  $v_P$  e  $v_X$ , correspondem às velocidades  $v_1$  ( $v_S$ ),  $v_{13}$  ( $v_N$ ),  $v_{24}$  ( $v_P$ ) e  $v_{25}$  ( $v_X$ ) da via metabólica.

**Tabela 6 Velocidades de conversões de metabólitos extracelulares para 20 e 80 horas de cultivo em experimentos com concentração inicial de 40g.L<sup>-1</sup>.**

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	vS	vN (mmol.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	vX	vP
2,0	20	4,99	0,46	2,45	0,97
	80	0,15	0	0	0,04
1,5	20	5,51	0,52	2,75	0,90
	80	0,28	0	0	0,09
1,0	20	7,73	0,44	3,11	1,13
	80	0,18	0	0	0,01
0,5	20	10,94	0,32	4,07	1,85
	80	0,01	0,004	0	0,03

vS é a velocidade de consumo de glicerol, vN é a velocidade de consumo de nitrogênio, vX a velocidade de formação de biomassa e vP a velocidade de formação de produto.

#### 4.7.4 Estimativa das velocidades intracelulares

Com o objetivo de analisar os fluxos metabólicos obtidos pelo modelo foram realizados diferentes tipos de simulações. Ao estudar o metabolismo de *Pseudomonas mendocina* variando-se as concentrações iniciais de fonte de carbono e nitrogênio foram identificados quais os fluxos mostraram mudanças significativas ao direcionar o metabolismo para o crescimento celular ou para produção de alginato. Diante da melhor condição de produção de alginato obtida neste trabalho (concentração inicial de 40 g.L<sup>-1</sup> de glicerol) foi realizado um estudo mais detalhado da distribuição dos fluxos intracelulares, identificando os fluxos mais importantes.

A partir da matriz estequiométrica construída com as equações de balanço material das reações presentes na via metabólica, e com as velocidades medidas experimentalmente, realizou-se os cálculos de fluxos intracelulares.

As velocidades dos fluxos intracelulares foram calculadas com o algoritmo apresentado no Anexo 7.6, utilizando-se o programa *MATLAB*, para os ensaios realizados com concentração inicial de 40 g.L<sup>-1</sup> de glicerol. Os valores obtidos para o tempo de 20 horas estão apresentados na Tabela 7, e para o tempo de 80 horas na Tabela 8.

**Tabela 7** Velocidades calculadas para os metabólitos intracelulares, no tempo de 20 horas, em ensaios com concentrações de 2,0; 1,5; 1,0 e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 40 g.L<sup>-1</sup> de glicerol.

Velocidades Calculadas (mmol.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )			
	2,0	1,5	1,0	0,5
v2	4,9900	5,5100	7,7300	10,9400
v3	4,4766	5,0297	7,1426	9,9901
v4	-0,6433	-0,5294	-0,8049	-1,6137
v5	-0,6433	-0,5294	-0,8049	-1,6137
v6	-0,6433	-0,5294	-0,8049	-1,6137
v7	0,5134	0,4803	0,5874	0,9499
v8	0,5134	0,4803	0,5874	0,9499
v9	-4,6064	-5,0789	-7,3600	-10,6539
v10	0,3593	0,3553	0,3927	0,5519
v11	-0,9937	-0,8973	-1,1675	-2,0268
v12	-0,6344	-0,5420	-0,7748	-1,4749
v14	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v15	-0,8472	-0,8165	-0,9464	-1,4265
v16	-0,1109	-0,1310	-0,1008	-0,1452
v17	1,0026	0,8848	1,1976	2,1656
v18	0,2144	0,1765	0,2683	0,5379
v19	0,3710	0,3449	0,4264	0,6986
v20	0,3710	0,3449	0,4264	0,6986
v21	0,3710	0,3449	0,4264	0,6986
v22	0,7420	0,6899	0,8529	1,3972
v23	0,2226	0,2070	0,2559	0,4191

**Tabela 8** Velocidades calculadas para os metabólitos intracelulares, no tempo de 80 horas, em ensaios com concentrações de 2,0; 1,5; 1,0 e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 40 g.L<sup>-1</sup> de glicerol.

Velocidades Calculadas (mmol.g <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )			
	2,0	1,5	1,0	0,5
v2	0,1500	0,2800	0,1800	0,1200
v3	0,1409	0,2796	0,1758	0,1113
v4	-0,0030	-0,0001	-0,0014	-0,0139
v5	-0,0030	-0,0001	-0,0014	-0,0139
V6	-0,0030	-0,0001	-0,0014	-0,0139
v7	0,0091	0,0004	0,0042	0,0087
V8	0,0091	0,0004	0,0042	0,0087
v9	-0,1348	-0,2793	-0,1729	-0,1165
v10	0,0086	0,0004	0,0040	0,0053
v11	-0,0139	-0,0007	-0,0065	-0,0182
v13	-0,0053	-0,0003	-0,0025	-0,0129
v14	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v15	-0,0138	-0,0008	-0,0083	-0,0174
v16	-0,0051	-0,0002	-0,0024	-0,0072
v17	0,0116	0,0006	0,0054	0,0192
v18	0,0010	0,0000	0,0005	0,0046
v19	0,0063	0,0003	0,0030	0,0064
v20	0,0063	0,0003	0,0030	0,0064
v21	0,0063	0,0003	0,0030	0,0064
v22	0,0127	0,0006	0,0059	0,0128
v23	0,0038	0,0002	0,0018	0,0038

Com o objetivo de obter melhores estimativas para os fluxos medidos e não medidos, adaptando-os melhor aos balanços de massa e reduzindo os erros experimentais, uma reconciliação estatística das medidas foi implementada, como descrita por STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU, NIELSEN (1998). Primeiramente, calculou-se o “rank” da matriz de redundância, obtendo-se quatro equações linearmente

independentes e, portanto, grau de liberdade quatro na distribuição  $\chi^2$ . Assim, os modelos foram aceitos para todos os valores de  $h_e \leq 9,49$  ( $\chi^2_{95\%}$ ). Os valores da função teste ( $h_e$ ) estão apresentados na Tabela 9.

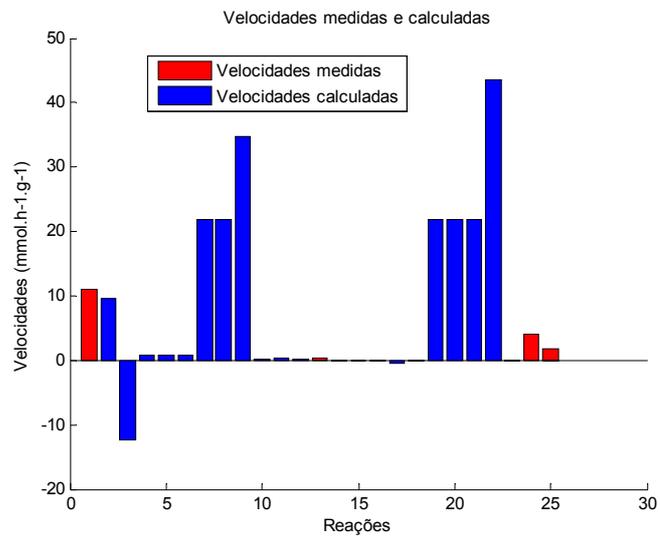
**Tabela 9 Valores obtidos para a função teste ( $h_e$ ).**

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (g.L <sup>-1</sup> )	Tempo (h)	$h_e$
2,0	20	3,8209
	80	7,4849
1,5	20	7,4797
	80	0,8009
1,0	20	7,6495
	80	0,8714
0,5	20	0,3294
	80	5,4711

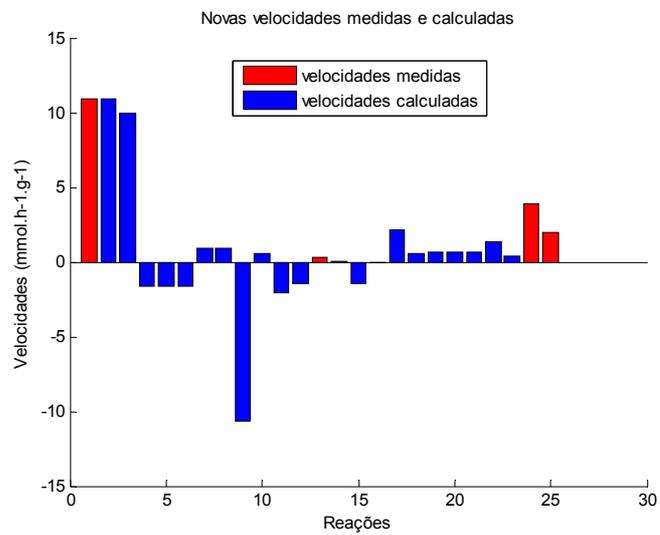
As maiores velocidades, observadas na Tabela 7 (20 horas de cultivo) e na Tabela 8 (após 80 horas de cultivo), foram as velocidades das reações relacionadas à conversão de glicerol 3-fosfato a Dihidroxiacetona fosfato (v2) e à formação de piruvato através da via Entner-Doudoroff ou KDGP (v9).

As velocidades v11 a v17, que indicam o fluxo de carbono no ciclo TCA, no tempo de 20 horas, foram maiores em concentrações menores da fonte de nitrogênio. De maneira similar, as velocidades de formação de precursores da síntese de alginato (v19 a v23), foram maiores nos ensaios com concentração de 0,5g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no tempo relativo à fase exponencial de crescimento celular (20 horas) do que as velocidades para as mesmas reações nos ensaios com maiores concentrações iniciais de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Os fluxos extracelulares e intracelulares, obtidos quando realizados ensaios com 40g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 0,5g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (condições onde obteve-se os melhores rendimentos em produção de alginato) para o tempo de 20 horas de cultivo estão apresentados na Figura 24 e para o tempo de 80 horas, na Figura 25.

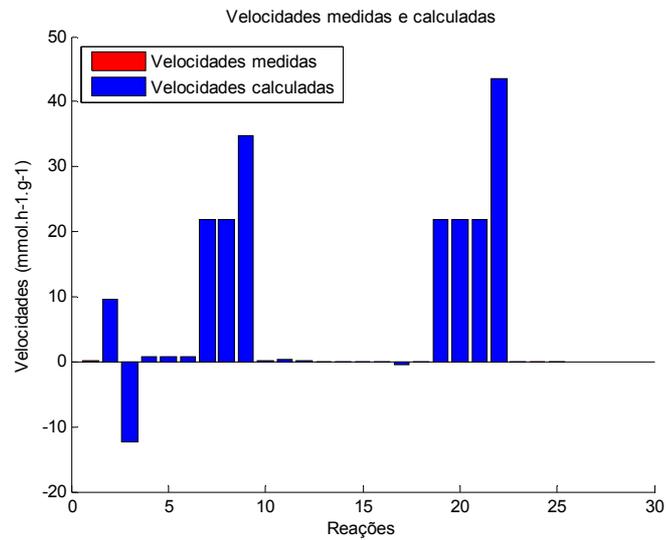


(a)

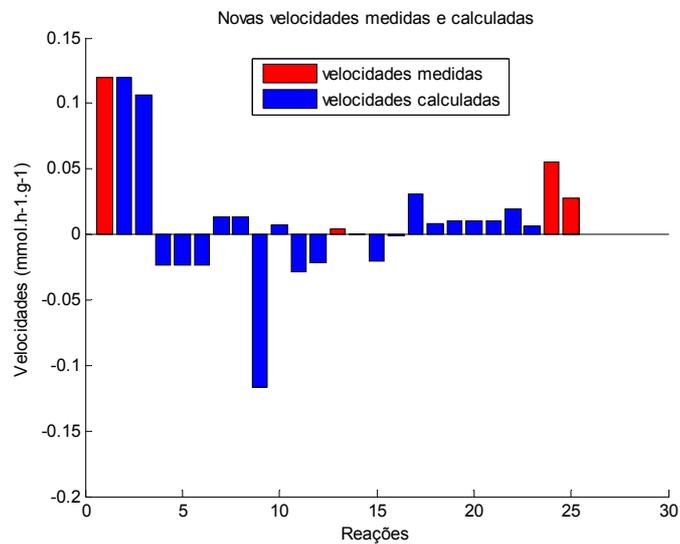


(b)

Figura 24 Fluxos obtidos para a rede de reações quando utilizado 40g.L<sup>-1</sup> de glicerol e 0,5 g.L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, para 20 horas de cultivo. (a) Velocidades obtidas por balanço de massa simples para a rede de reações em estudo. (b) Velocidades obtidas após o melhoramento estatístico.



(a)



(b)

Figura 25 Fluxos obtidos para a rede de reações quando utilizado  $40\text{g.L}^{-1}$  de glicerol e  $0,5\text{g.L}^{-1}$  de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , para 80 horas de cultivo. (a) Fluxos obtidos por balanço de massa simples para a rede de reações em estudo. (b) Fluxos obtidos após o melhoramento estatístico.

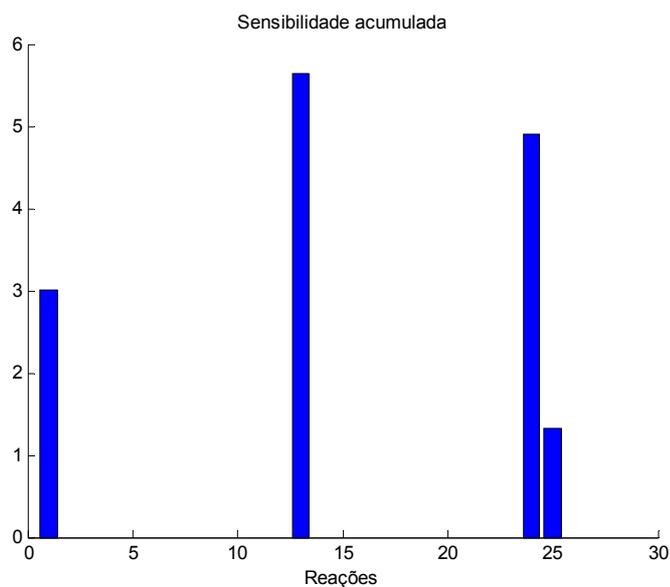
#### 4.7.5 Análise de sensibilidade

Neste trabalho, o número condicional foi calculado segundo a equação (18) e o valor obtido foi de  $C=14,60$ , indicando que a matriz estequiométrica está bem condicionada. Para uma matriz estequiométrica ser considerada bem condicionada, o número condicional deve estar entre 1 e 100 (STEPHANOPOULOS, ARISTIDOU, NIELSEN 1998).

Na Tabela 10 estão apresentados os valores das sensibilidades dos fluxos calculados em relação a variações nos fluxos medidos, determinadas pela Equação 22. Os valores “Acumulados” são os somatórios dos módulos das sensibilidades, que indicam os fluxos cuja variação tem maior impacto sobre toda a via metabólica.

**Tabela 10 Sensibilidade dos fluxos calculados em relação a variações nos fluxos medidos.**

	vS	vN	vX	vP
v2	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v3	1,0000	0,0000	0,1786	0,1300
v4	0,0000	0,7692	0,4487	0,0538
v5	0,0000	0,7692	0,4487	0,0538
v6	0,0000	0,7692	0,4487	0,0538
v7	0,0000	0,0000	0,1786	0,1300
v8	0,0000	0,0000	0,1786	0,1300
v9	1,0000	0,7692	0,0916	0,2062
v10	0,0000	0,2308	0,1154	0,0138
v11	0,0000	0,3077	0,5128	0,0615
v12	0,0000	0,5385	0,3974	0,0477
v14	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
v15	0,0000	0,3077	0,3205	0,0385
v16	0,0000	0,3077	0,0128	0,0015
v17	0,0000	0,5385	0,5641	0,0677
v18	0,0000	0,3333	0,0000	0,3333
v19	0,0000	0,0000	0,1786	0,0000
v20	0,0000	0,0000	0,1786	0,0000
v21	0,0000	0,0000	0,1786	0,0000
v22	0,0000	0,0000	0,3571	0,0000
v23	0,0000	0,0000	0,1071	0,0000
<b>Acúmulo</b>	<b>3,0000</b>	<b>5,6410</b>	<b>4,8965</b>	<b>1,3218</b>



**Figura 26 Sensibilidade acumulada para todos os fluxos medidos.**

Pela Tabela 10 e pela Figura 26, pode-se observar que, analisando a sensibilidade de todo o sistema, a variação na concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (vN) é a que apresenta maior impacto sobre os fluxos calculados. A concentração celular também apresentou um elevado impacto sobre a via metabólica, quando comparado com os outros fluxos metabólicos medidos (vS e vP).



## 5 CONCLUSÕES

---

As melhores condições para o crescimento celular foram obtidas em ensaios utilizando maiores concentrações iniciais de fonte de carbono e de nitrogênio.

Para a produção de alginato, a maior concentração do biopolímero ( $13,44 \text{ g.L}^{-1}$ ) e produtividade ( $0,11 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ ) foram obtidas em ensaios utilizando maiores concentrações de glicerol e de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

No entanto, os melhores rendimentos ( $0,45 \text{ gP.gS}^{-1}$  e  $5,70 \text{ gP.gX}^{-1}$ ) foram obtidos para ensaios com os menores crescimentos celulares, sugerindo que *Pseudomonas mendocina*, em condições limitantes de crescimento, utiliza a fonte de carbono principalmente para o acúmulo do biopolímero. A baixa produtividade obtida nessas condições ainda deve ser avaliada.

O espectro do material sintetizado apresentou bandas de absorção nos comprimentos de onda de  $1720 \text{ cm}^{-1}$  e  $1257 \text{ cm}^{-1}$  que caracterizam o grupo acetil, e está associado aos resíduos manurônicos do alginato sintetizado por micro-organismos.

As micrografias eletrônicas de varredura mostraram uma estrutura fibrilar com poros irregulares e a presença de cristais na superfície do biopolímero, o que pode estar associado à presença de sais proveniente do processo de diálise.

O cálculo de massa molecular por viscosidade intrínseca indicou que o biopolímero produzido neste trabalho possui uma massa molecular máxima de  $252 \text{ kg.mol}^{-1}$ , inferior às obtidas por outros autores. A velocidade de agitação utilizada pode ter sido um dos fatores determinantes para que isto ocorresse.

A caracterização filogenética pelo sequenciamento do gene 16S rDNA do micro-organismo selecionado por resistência a carbecilina indicou uma semelhança de 90% com a *Pseudomonas mendocina*.

As velocidades medidas para o acúmulo de alginato foram maiores em ensaios com maiores concentrações de glicerol e menores concentrações de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Os fluxos intracelulares calculados mostraram, em todos os ensaios, uma maior velocidade do fluxo de carbono na via de Entner-Doudoroff, para a formação de piruvato.

Avaliando os valores para sensibilidades dos fluxos calculados em relação aos fluxos medidos, observou-se que as variações na concentração de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  são as que apresentam maior impacto sobre os fluxos calculados.

## **6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

ANDERSON, A.J.; HACKING, A.J.; DAWES, E.A. (1987) Alternative pathways for the biosynthesis of alginate from fructose and glucose in *Pseudomonas mendocina* and *Azotobacter vinelandii*. **Journal of General Microbiology**. 133: 1045-1052.

AUSUBEL, F. M. (1994) **Current protocols in molecular biology**. John Wiley & Sons.

BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. (2003) Methods in molecular biology. In: **PCR Protocols**, v. 226, 2<sup>a</sup>. ed. Humana Press Inc.

BOELS, I.C., KRANENBURG R., HUGENHOLTZ. J, KLEEREBEZEM M., VOS W.M. (2001) Sugar catabolism and its impact on the biosynthesis and engineering of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**. 11:723-732.

BRIGIDO, R. V. (2010) **Produção de alginato sintetizado por *Pseudomonas mendocina* em diferentes substratos**. 72f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CHEN, W. P.; CHEN, J. Y.; CHANG, S. C., SU, C. L. (1985) Bacterial alginate produced by a mutant of *Azotobacter vinelandii*. **Applied and Environmental Microbiology**, 49(3): 543-546.

CHI Z.; ZHAO S. (2003) Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. **Enzyme and Microbial Technology**. 33:206-211.

CLEMENTI, F.; MORESI, M.; PARENTE, E. (1999) Carbohydrate biotechnology protocols. In.: BUCKE, C. **Methods in Biotechnology**. Ed. Humana Press, Totowa, NJ.

DÍAZ-BARRERA, A.; SILVA, P.; ÁVALOS, R.; ACEVEDO, F. (2009). Alginate molecular mass produced by *Azotobacter vinelandii* in response to changes of the O<sub>2</sub> transfer rate in chemostat cultures. **Biotechnology Letters**, 31:825-829

DRAGET, K. I.; SKJÅK BRÆK, G., SMIDSRØD, O. (1994) Alginic acid gels: the effect of alginate chemical composition and molecular weight. **Carbohydrate Polymers**, v. 25, p 31-38.

DRAGET, K.; TAYLOR, C. (2009). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications - **Food Hydrocoll.** 23:251-256.

ELLIOT, W.H.; ELLIOT, D.C. (1997). **Biochemistry and Molecular Biology**. 1 ed. Oxford: Oxford Press. 437p.

ERTESVÅG, H; VALLA, S. (1998) Biosynthesis and applications of alginates. **Polymer Degradation and Stability**. 59:85-91.

ERTESVÅG, H; HØIDAL, H.K.; SCHJERVEN, H. SVANEM, B.I.G.; VALLA, S. (1999) Mannuronan C-5-Epimerases and Their Application for in Vitro and in Vivo Design of New Alginates Useful in Biotechnology. **Metabolic Engineering** 1:262\_269

FIALHO, A.M.; MARTINS, L.O.; DONVAL, M.L.; LEITÃO, J.H.; RIDOUT, M.J.; JAY, A.J.; MORRIS, V.J.; SÁ-CORREIA, I. (1999) Structures and properties of gellan polymers produced by *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461 from lactose compared with those produced from glucose and from cheese whey. **Applied and Environmental Microbiology**. 65(6):2485-2491.

FLORES CANDIA, J.L. (1998) **Metabolic flux distribution, modelling and process optimization of xanthan production**. 200f. Tese (Pós-Doutorado em Engenharia Bioquímica). Gesellschaft für Biotechnologische Forschung. Braunschweig, Alemanha.

FUTUYMA, D.J. (1992) **Biologia Evolutiva**. 2ª Ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética.

GACESA, P. (1998) Bacterial alginate biosynthesis – recent progress and future prospects. **Microbiology**. 144: 1133-1143.

GALINDO, E.; PEÑA, C. ; NÚÑEZ, C. ; SEGURA, D.; ESPÍN, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. **Microbial Cell Factories**. 6:1-16.

GARCIA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; ALCON, A. (2004). Chemical structured kinetic model for xanthan production. **Enzyme and Microbial Technology**, 35:284-292.

GIAVASIS, I.; HARVEY, L. M.; MCNEIL, B. (2000). Gellan gum. **Critical Reviews in Biotechnology**. 20:177-211.

GIMMESTAD, M.; STEIGEDAL, M.; ERTESVÅG, H; MORENO, S.; CHRISTENSEN, B.E.; ESPÍN, G.; VALLA, S. (2006) Identification and Characterization of an *Azotobacter vinelandii* Type I Secretion System Responsible for Export of the AlgE-Type Mannuronan C-5-Epimerases. **Journal of Bacteriology**. 188:5551-5560.

GIMMESTAD, M.; SLETTA, H.; ERTESVÅG, H.; BAKKEVIG, K.; JAIN, S; SUH, S.-j.; SKJÅK-BRÆK, G.; ELLINGSEN, T.E.; OHMAN, D.E.; VALLA, S.. (2003). The *Pseudomonas fluorescens* AlgG protein, but not its mannuronan C5-epimerase activity, is needed for alginate polymer formation. **Journal of Bacteriology**. 185:3515-23.

GONG, Z.; LIU, C.; FENG, E.; ZHANG, Q. (2009) Computational method for inferring objective function of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. **Computational Biology and Chemistry**. 33:1-6.

GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D.A.; SMITH, P.J.C.; THOM, D. (1973) Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg-box model. **FEBS Letters**. 32:195-198.

HACKING, A.J; TAYLOR, I.W.F; JARMAN, T.R; GOVAN, J.R.W. (1983) Alginate biosynthesis by *Pseudomonas mendocina*. **Journal of General Microbiology**. 129:3473-3480.

HAY, D. H.; REHMAN Z.; GHAFOR A.; RHEM B. H. A. (2010) Bacterial biosynthesis of alginates **Journal of Chemical Technology and Biotechnology** 85: 752–759.

HGCA. (2006) Disponível em: [http://hgca.com/document.aspx?fn=load&media\\_id=3605&publicationId=236](http://hgca.com/document.aspx?fn=load&media_id=3605&publicationId=236). Acesso: 13 de maio de 2010.

HORAN, N. J.; JARMAN, T. R.; DAWES, E. A. (1981) Effects of carbon source and inorganic phosphate concentration on the production of alginic acid by a mutant of *Azotobacter vinelandii* and on the enzymes involved in its biosynthesis. **Journal of General Microbiology**. 127:185-191.

JANDA, J.M; ABBOTT, S.L. (2007) 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls **Journal of Clinical Microbiology**. 45(9): 2761–2764.

JIN, H.; LEE, N. K.; SHIN, M. K.; KIM, S. K.; KAPLAN, D. L.; LEE, J. W. (2003) Production of gellan gum by *Sphingomonas paucimobilis* NK2000 with soybean pomace. **Biochemical Engineering Journal**. 16:357-360.

JUNKES, T. H.; CANTOR, C.R.. (1969) Evolution of protein molecules. In H.N. Munro (ed.) **Mammalian protein metabolism**. v.3. New York, N.Y: Academic Press. P.21-132.

KACHHAWA, D. K.; BHATTACHARJEE, P.; SINGHAL, R. S. (2003). Studies on downstream processing of pullulan. **Carbohydrate Polymers**. 52:25-28.

KALOGIANNIS, S.; IAKOVIDOU, G.; LIAKOPOULOU-KYRIAKIDES, M.; KYRIAKIDIS, D. A.; SKARACIS, G. N. (2003). Optimization of xanthan gum production by *Xanthomonas campestris* grown in molasses. **Process Biochemistry**. 39:249-256.

KLUMB, E. C.; CAVALCANTI JÚNIOR, G.B.. (2002) Avaliação dos métodos de detecção das alterações do gene e proteína P53 nas neoplasias linfóides. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**. 24(2):111-125

LAUNEY, B.; DOUBLIER, J.L.; CUVELIER, G. (1986) Flow properties of aqueous solutions and dispersions of polysaccharides, in **Functional Properties of Food Macromolecules** (Mitchell, J.R; Ledward, D.A., eds., Elsevier Applied Science, London, pp 1-78.

LYNN, AR; SOKATCH, JR. (1984) Incorporation of isotope from specifically labeled glucose into alginates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Azotobacter vinelandii*. **Journal of Bacteriology**. 158:1161–1162.

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F.; SAMBROOK, J. (1982) **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. 545 p.

MANO, E. B. (1985). **Introdução a polímeros**. Editora Edgard Bluche, São Paulo.

MAUGERI, F. (2001) Produção de Polissacarídeos. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. v. 3. Editora Edgard Blücher Ltda., São Paulo.

MAY, T. B.; CHAKRABARTY, A. M. (1994). *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. **Trends Microbiology**. 2(5):151-157.

MARTIN, L. O.; FIALHO, A. M.; RODRIGUES, P. L.; AS-CORREIA, I. (1996). Gellan gum production and activity of biosynthetic enzymes in *Sphingomonas paucimobilis* mucoid and non-mucoid variants. **Biotechnology and Applied Biochemistry**. 24(1)47-54.

MCNEIL, B.; KRISTIANSEN, B. (1990). Temperature effects on polysaccharide formation by *Aureobasidium pullulans* in stirred tanks. **Enzyme Microbiology and Biotechnology**. 12:521-526.

MENDES, E. **Uso Racional de Ferramentas de Engenharia Metabólica: Produção Bacteriana de Hidrogênio e de Violaceína**. 119f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

MOE S.T.; DRAGET K.I.; SKJÅK-BRÆK G.; SMIDSRØD O. (1995) Alginates. In: Stephen, A.M., Editor, **Food polysaccharides and their applications**, Marcel Dekker, New York, pp. 245–286.

MOREIRA, A. N.; PINO, F. A. B.; VENDRUSCOLO, C. T. (2003) Estudo da produção de biopolímeros via enzimática através da inativação e lise celular e com células viáveis de *Beijerinckia* sp. 7070. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 23(2):300-305.

MÜLLER, J. M. (1997) **Otimização da produção de alginato por *Pseudomonas mendocina* com planejamento fatorial**, Tese de Doutorado – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas.

MÜLLER, J. M.; MONTE ALEGRE, R. (2007). Alginate production by *P. mendocina* in a stirred draft fermenter. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 23: 691-695.

NASCIMENTO, A. A. C.; ESPREAFICO, E. M.; LARSON, M. L. P.; MONESI, N.; ROSSI, N. M. M.; RODRIGUES, V. (1999). **Tecnologia do DNA recombinante**. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo. 85 p. Apostila.

NCBI - NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 16 de maio de 2011.

NEI, M; KUMAR, S. (2000). **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York: Oxford University Press.

NITSCHKE, M.; RODRIGUES, V.; SCHINATTO, L. F. (2001) Formulação de meios de cultivo à base de soro de leite para a produção de goma xantana por *X. campestris* C<sub>7</sub>L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 21(1):82-85.

NUSSINOVITCH, A. (1997) **Hydrocolloid Applications: gum technology in the food and other industries**. Blackie Academic & Professional, London.

PACE, G. W. (1991) Polímeros Microbianos. In: BU'LOCK, J.& KRISTIANSEN, B. **Biotecnología Básica**. Editorial Acribia S.A., Zaragoza. 449-462.

PARENTE, E.; CRUDELE, M.A.; AQUINO, M.; CLEMENTI, F. (1998) Alginate production by *Azotobacter vinelandii* DSM576 in batch fermentation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 20:171–176.

PEÑA, C.; MIRANDA L.; SEGURA, D.; NUNEZ, C.; ESPÍN, G.; GALINDO, E. (2002). Alginate production by *Azotobacter vinelandii* mutants altered in poly-beta-hydroxybutyrate and alginate biosynthesis. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 29:209-213.

PRADELLA, J. G. C. (2006) **Biopolímeros e Intermediários Químicos**. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. Disponível em: <[http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06\\_biopolimeros.pdf](http://www.anbio.org.br/pdf/2/tr06_biopolimeros.pdf)>. Acesso em: 15 mar. 2010.

PRIEGO-JIMENÉZ, R.; PEÑA, C.; RAMÍREZ, O.T.; GALINDO, H. (2005) Specific growth rate determines the molecular mass of the alginate produced by *Azotobacter vinelandii*. **Biochemical Engineering Journal** 25:187–193.

REHM, B.H.A.(2010) Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. **Nature - Applied and industrial microbiology**.10:1038.

REHM, B.H.A.; VALLA, S. (1997) Bacterial alginates: biosynthesis and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**.. 48:281-288.

REMMINGHORST, U.; REHM, B.H.A. (2006) Bacterial alginates: from biosynthesis to applications. **Biotechnology Letters**. 28:1701–1712.

RIVALDI, J.D.; SARROUH, B.F.; FIORILO, R.; SILVA, S.S. (2007) Glicerol de biodiesel - Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel. **Biociência** 37:44-51.

ROSALAM, S.; ENGLAND, R. (2006) Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas campestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**. 39:197-207.

SABRA W.; ZENG A.P.; DECKWER W.D. (2001) Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 56:315–325.

SAITOU, N.; NEI, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**. 4(4):406-425.

SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A..(1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. **Science**, 239 (4839): 487–91.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T.. (1989) **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. vol. 3. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

SANDFORD, P. A. (1979) Exocellular microbial polysaccharides. **Advances in Carbohydrate, Chemistry and Biochemistry**. 36:265-313.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 74:5463-5467.

SANTOS, M., TEIXEIRA, J., RODRIGUES, A. (2000) Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B521(f). **Biochemical Engineering Journal**. 4:177-188.

SENGHA, S. S.; ANDERSON, A. J.; HACKING, A. J.; DAWES, E. A. (1989) The production of alginate by *Pseudomonas mendocina* in batch and continuous culture. **Journal of general microbiology**. 1135: 795-804.

SILVA, V.P.R.; CALIMAN, V.; SILVA, G.G. (2005) Polímeros com Condutividade Iônica; Desafios Fundamentais e Potencial Tecnológico. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 15, n. 4, p. 249-255.

SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C. (1962) Spectrometric identification of organic compounds. **Journal of Chemical Education**, 39 (11), 546.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.. (2007) **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Editora LTC, Rio de Janeiro.

SHAMALA, T. R.; PRASAD, M. S.. (1995) Preliminary studies on the production of high and low viscosity dextran by *Leuconostoc* spp. **Process Biochemistry**, 30:237-241.

SHINGEL, K. I. (2004). Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan. **Carbohydrate Research**. 339:447-460.

SKJÅK-BRÆK, G, GRASDALEM H, LARSEN L. (1986) Monomer sequence and acetylation pattern in some bacterial alginates. **Carbohydrate Research**. 154:239-250.

SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. (2001) **Biotecnología Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, SP, Ed. Edgard Blucher LTDA, vol. 2. 541p.

SMIDSRØD, O.; DRAGET, K.I. (1996) Chemistry and physical properties of alginates. **Carbohydrates in Europe**. 14:6-13.

STEPHANOPOULOS, G. N.; ARISTIDOU, A. A.; NIELSEN, J. (1998) **Metabolic engineering: principles and methodologies**. San Diego: Academic Press. xvii, 707 p

SUN, Y. Q; QI, W. T; TENG, H.; XIU, Z. L.; ZENG, A. P. (2008) Mathematical modeling of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*: Concerning enzyme-catalytic enzyme-catalytic reductive pathway and transport of glycerol and 1,3- propanediol across cell membrane. **Biochemical Engineering Journal**. 38:22-32.

SUTHERLAND, I. W. (1998) Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Trends Biotechnology**. 16:41-46.

SUTHERLAND, I. (2002) A sticky business: microbial polysaccharides: current products and future trends. **Microbiology Today**, [S.l.], 29: 70-71.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S.. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**. 10.1093-121.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. (2003) **Microbiologia**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed. 830 p.

TRUJILLO-ROLDÁN, M.A.; MORENO, S.; GALINDO, E.; ESPÍN, G. (2003) Alginate production by an *Azotobacter vinelandii* mutant unable to produce alginate lyase. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 60:733–737.

WESTERMEIER, R. (2005) **Electrophoresis in practice: a guide to methods and applications of DNA and protein separations**. Wiley-VCH.

WILLARD, H.; MERRITT, J. L.; DEAN, J. (1974) **Análise instrumental**. 2a ed., Lisboa: Fundação Calauste Gulbenkian. 986 p.

WOICIECHOWSKI, A. L. (2001) **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de xantana a partir de resíduos agroindustriais de café e de mandioca**. 100 f. Tese (Doutorado em Processos biotecnológicos) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

ZHANG, Q.; TENG, H.; SUN, Y.; XIU, Z.; ZENG, A. (2008) Metabolic flux and robustness analysis of glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 31:127-135.

7.1 CURVAS DE CALIBRAÇÃO

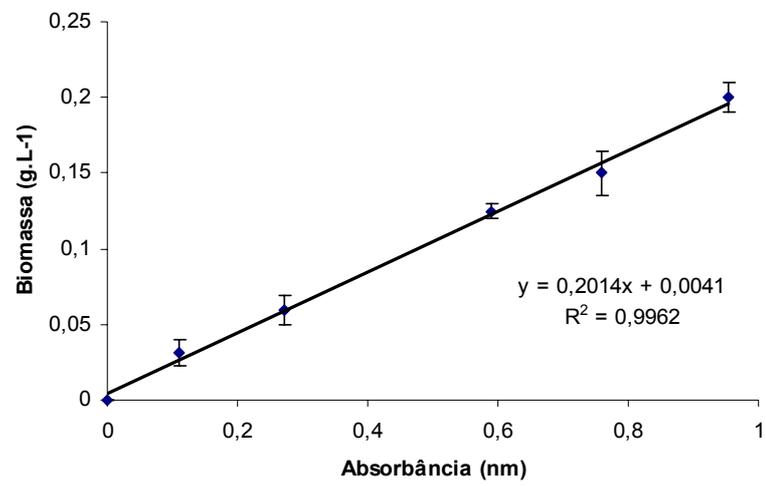


Figura 27 Curva de calibração para a Biomassa

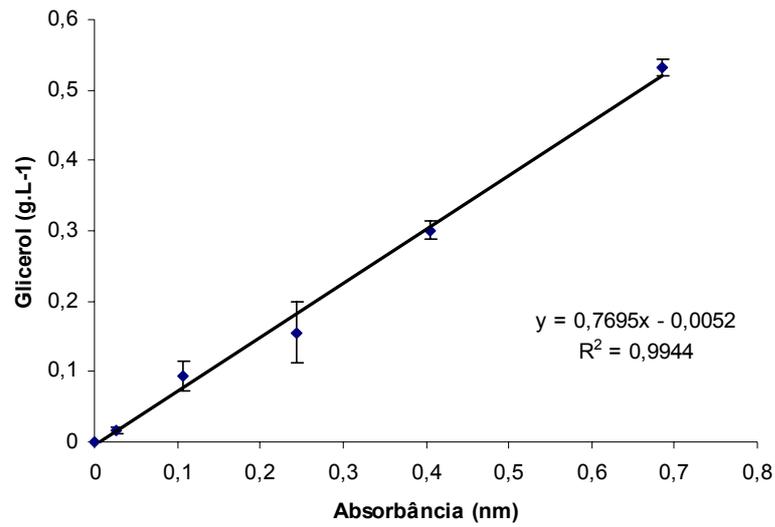


Figura 28 Curva de calibração para Glicerol

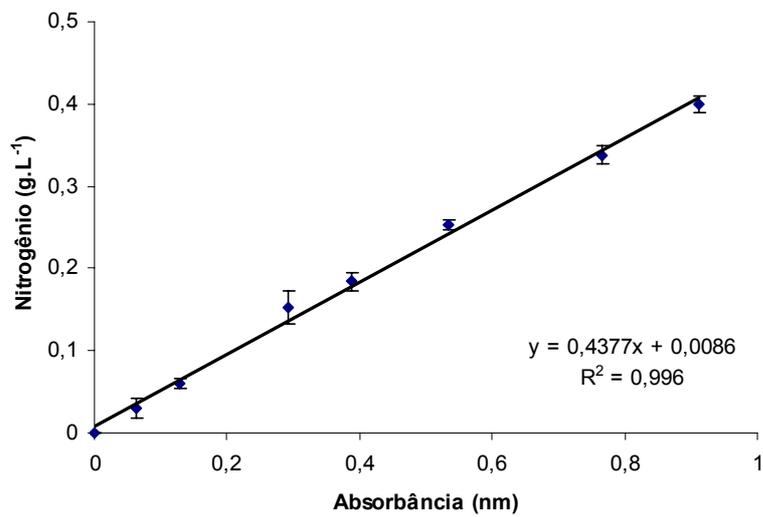


Figura 29 Curva de calibração para Nitrogênio

## 7.2 SEQUÊNCIA OBTIDA PELO SEQUENCIAMENTO DO 16SRDNA

AGTGCTTTACAACCATAAGGCCTTCTTCACACACGCGGCATG  
GCTGGATCAGGCTTGCGCCATTGTCCAATATTCCCCTACTGCT  
GCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGG  
CGGATCATCCTCTCAGACCCGCTACAGATCGTCGCCTTGGTAG  
GCCTTTACCCACCAACTAGCTAATCCGACTTAGGCTCATCTA  
TTAGCGCAAGGTCCGAAGATCCCCTGCTTTCTCCCGTAGGAC  
GTATGCGGTATTAGCATCCCTTTCGAGATGTTGTCCCCACTA  
ATAGGCAGATTCCCTAAGCATTACTCACCCGTCCGCCGCTAGG  
TCCAGTAGCAAGCTACCTTCCCCCGCTCGACTTGCATGTGTTA  
AGCCTGCCGCCAGCGTTCAAT



## 7.3 REAÇÕES METABÓLICAS

**Tabela 11** Reações metabólicas para a produção de alginato por *Pseudomonas mendocina*.

	Reação
r1	$GL + ATP \rightarrow GL3P + ADP$
r2	$GL3P + FAD \rightarrow DHAP + FADH_2$
r3	$DHAP \rightleftharpoons G3P$
r4	$G3P + PI + NAD^+ + ADP \rightarrow NADH + ATP + 3PG + H^+$
r5	$3PG \rightarrow PEP$
r6	$PEP + ADP \rightarrow PIR + ATP$
r7	$DHAP + G3P \rightarrow F1,6P$
r8	$F1,6P + H_2O \rightarrow F6P + PI$
r9	$KDGP \rightarrow G3P + PIR$
r10	$PIR + NAD^+ + COA \rightarrow ACCOA + NADH + CO_2 + H^+$
r11	$OAA + ACCOA \rightarrow CIT + COA$
r12	$CIT + NAD^+ \rightarrow AKG + NADH + CO_2 + H^+$
r13	$AKG + NH_4^+ + NADPH + H^+ \rightarrow GLU + NADP^+$
r14	$GLU + NH_4^+ + ATP \rightarrow GLN + ADP$
r15	$AKG + COA + NAD^+ \rightarrow SUCCOA + NADH + H^+ + CO_2$
r16	$SUCCOA + FAD + NAD^+ + ADP \rightarrow OAA + ATP + FADH_2 + NADH + H^+ + COA$
r17	$OAA \rightarrow PIR + CO_2$
r18	$GLN + NH_4^+ \rightarrow Proteína$
r19	$F6P \rightarrow M6P$
r20	$M6P \rightarrow M1P$
r21	$M1P + GTP \rightarrow GDPM + PI$
r22	$GDPM + NAD^+ \rightarrow GDPAM + NADH + H^+$
r23	$5 GDPAM + 5ATP \rightarrow PMT + ADP$
r24	$PMT + ACCOA + ATP \rightarrow ALG + ADP$
r25	$0,13 F6P + Prot + 0,12 ACCOA + 0,21 NADPH + H^+ + 0,98 ATP \rightarrow BIOMASSA + 0,98ADP + 0,21 NADP^+$



## 7.4 ENZIMAS ENVOLVIDAS NAS REAÇÕES

**Tabela 12 Enzimas envolvidas nas reações.**

Reação	Enzimas
r1	glicerol quinase
r2	glicerol-3-fosfato desidrogenase
r3	triose-fosfato isomerase
r4	triose-fosfato desidrogenase, fosfogliceromutase
r5	enolase
r6	piruvato quinase
r7	piruvato desidrogenase
r8	citrato sintase
r11	isocitrato desidrogenase
r12	$\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase
r14	Sucinato desidrogenase, fumarase, malato desidrogenase
r17	aldolase
r18	frutose 1,6-difosfatase
r19	Fosfomanose isomerase/guanosina-difosfomanose pirofosforilase (PMI-GMP)
r20	Fosfomanose mutase
r21	fosfomanose isomerase/guanosina-difosfomanose pirofosforilase (PMI-GMP)
r22	guanosina-difosfomanose desidrogenase
r23	epimerases, acetilases, liases
r24	epimerases, acetilases, liases



## 7.5 MATRIZ ESTEQUIOMÉTRICA

**Tabela 13 Matriz Estequiométrica**

	3PG	ACCOA	AKG	Biomassa	CIT	CO2	COA	DHAP	F1,6P	F6P	G3P	GDPAM	GDPM	GL
r1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1
r2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
r3	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	1	0	0	0
r4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0
r5	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r7	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	-1	0	0	0
r8	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	1	0	0	0	0
r9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
r10	0	1	0	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0
r11	0	-1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
r12	0	0	1	0	-1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
r13	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r15	0	0	-1	0	0	1	-1	0	0	0	0	0	0	0
r16	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
r17	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
r18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	0	0	0	0
r20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
r22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	-1	0
r23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-5	0	0
r24	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
r25	0	-0,12	0	1	0	0	0	0	0	-0,13	0	0	0	0



## 7.6 ALGORITMO UTILIZADO PARA O CÁLCULO DAS VELOCIDADES ESTIMADAS (STEPHANOPOULOS; ARISTIDOU, NIELSEN, 1998)

```

G; %matriz completa (medidos + calculados)

Gt=G';%matriz transposta

Gm = Gt(:, [1,13,24,25]); %matriz com velocidades medidas
Gc = Gt(:, [2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23]); %matriz com velocidades a serem calculadas

Gtm=Gm';
Gtc=Gc';

%vm = [vs;vn;vx;vp]
vm = [4.99; 0.46; 2.45; 0.17]; %especificar os valores obtidos experimentalmente
Pm = diag([0.5^2,0.05^2,0.2^2,0.002^2]);%respectivos erros

%calcular matriz redundância
R = (Gm-Gc*pinv(Gc)*Gm);

%rank da matriz redundância
rk = rank(R, 1e-10)

% Reduced redundancy matrix
sg = size(G);
K = [ones(1, rk), zeros(1, sg(2)-rk)];
Rred = K*R;

% reconciliação estatística

e = Rred*vm

Pe = Rred*Pm*Rred'

he=e'*inv(Pe)*e

%cálculo das novas velocidades

vmnew=(eye(size(Pm))-Pm*Rred'*inv(Pe)*Rred)*vm;
Pmnew=Pm - Pm*Rred'*inv(Pe)*Rred*Pm;

```

```

vcnew=-pinv(Gc)*Gm*vmnew
Pc=pinv(Gc)*Gm*Pmnew*Gm'*pinv(Gc)';

sqrt(diag(Pc));

%criação dos gráficos

figure
hold on
title('Velocidades medidas e calculadas')
bar(p,vm,'r')
bar(q,vc,'b')
ylabel('Velocidades (mmol.h-1.g-1)')
xlabel('Reações')
legend('Velocidades medidas','Velocidades calculadas',2)
hold off

figure
hold on
title('Novas velocidades medidas e calculadas')
bar(p',vmnew,'r')
bar(q',vcnew,'b')
ylabel('Velocidades (mmol.h-1.g-1)')
xlabel('Reações')
legend('velocidades medidas','velocidades calculadas',2)
hold off

Nc = null(G);
rank(Nc);
if rank(Nc)==0
answ = 'Solução única';
else
answ='Não é solução única';
end

% Análise de sensibilidade

C = norm(Gt)*norm(pinv(Gt));
sens = -pinv(Gc)*Gm
accum = sum(abs(sens))

p = [1,13,24,25];
q = [2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23]
;

```

```
figure
hold on
title('Sensibilidade acumulada')
xlabel('Reações')
bar(p,accum,'b')
hold off
pcs = 5;
pcs = find(q==pcs);
spec = abs(sens(pcs,:))
figure
hold on
title('Sensibilidades específicas')
bar(p,spec,'m')
ylabel('Valor marginal')
xlabel('Reações')
hold off
```