

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE GLUTATIONA POR
SACCHAROMYCES CEREVISIAE ATCC 7754 EM MEIOS
PROTÉICOS DE BAIXO CUSTO

César Augusto Piedrahíta-Aguirre

Engenheiro de Alimentos

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

Orientador

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para a
obtenção do título de Mestre em Engenharia de
Alimentos

Campinas
2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

P595e Piedrahíta-Aguirre, César Augusto
Estudo da produção de glutathione por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 em meios protéicos de baixo custo / César Augusto Piedrahíta-Aguirre. -- Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Glutathione. 2. *Saccharomyces cerevisiae*. 3. Fermentação submersa. I. Alegre, Ranulfo Monte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Study of the production of glutathione from *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 in protein systems of low cost

Palavras-chave em inglês (Keywords): Glutathione, *Saccharomyces cerevisiae*, Submerged fermentation

Titulação: Mestre em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora: Ranulfo Monte Alegre
Reinaldo Gaspar Bastos
Romildo Martins Sampaio
Mauricio Rigo

Programa de Pós Graduação: Programa em Engenharia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador – FEA / Unicamp

Prof. Dr. Reinaldo Gaspar Bastos
Unicentro

Prof. Dr. Maurício Rigo
Unicentro

Prof. Dr. Romildo Martins Sampaio
FEB

A mi familia José Ariosto, Amparo y Tatiana por apoyarme y siempre estar a mi lado en todo momento.

À Andrea por aparecer em minha vida quando mais precisava.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e minha irmã, pela vida, amor e apoio financeiro.

A unicamp, uma instituição pública de qualidade

Ao professor Ranulfo Monte Alegre pela amizade, dedicação e compreensão.

A todo o pessoal do Laboratório de Tratamento de Resíduos: Claudinha, Bia, Gabrielão, Oswaldo, Lucielen, Tatiane, Jaqueline e Dona Maria.

Aos amigos da república Cangaceira, Romildão, Marquinhos e Rodrigo.

Aos amigos Olga, Hector, Hugo, Margarita e July.

RESUMO

A glutathiona ou GSH (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) é um tripeptídeo sintetizado através de consecutivas reações enzimáticas. O qual possui várias funções metabólicas nas células, sendo que a principal é antioxidante. Alterações na concentração deste tripeptídeo têm sido observadas em pacientes com doenças, tais como, intoxicações com metais pesados, diabetes, processos inflamatórios no pulmão, doenças coronarianas, câncer e estados de imunodeficiência. É utilizada nas indústrias farmacêutica, de cosméticos e de alimentos. Os métodos químicos e enzimáticos de produção possuem várias desvantagens, desta forma a produção industrial é feita por fermentação, sendo utilizados principalmente as leveduras. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estudar a composição do meio de cultura para produção de glutathiona por *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 em frascos Erlenmeyer utilizando fontes alternativas mais econômicas e produtivas de carbono, nitrogênio e aminoácidos. Para se estudar a influência das variáveis concentrações de glicose, água de maceração de milho, extrato de levedura, lecitina e proteína de soro de leite, empregou-se um planejamento fatorial fracionado (2^{5-1}) totalizando 19 experimentos. Os ensaios foram realizados com pH inicial 5,0, temperatura 20°C, agitação 300 rpm e tempo de fermentação de 96 h. O melhor rendimento equivalente a 264,49 mg GSH/L foi obtido em 96h de fermentação, com um meio contendo 54 g/L de glicose, 50 g/L água de maceração de milho, 50g/L extrato de levedura, 6 mM de lecitina e 50 g/L de proteína de soro. Após verificar-se que nenhuma variável era estatisticamente significativa e, devido aos custos do extrato de levedura, empregou-se outros dois planejamentos Plackett-Burman 12 (PB-12) sequenciais. No primeiro adicionou-se a variável $MgSO_4$ e analisou-se os efeitos da composição do meio na concentração celular, obtendo-se na melhor condição uma concentração celular de 23,33 g/L e um rendimento de 278,42 mg/L de GSH com concentração de 90 g/L de glicose, 50 g/L de água de maceração de milho, 10 g/L de extrato de levedura, 5 mM de lecitina, 50 g/L de proteína de soro de leite e 10 g/L de $MgSO_4$. Para o segundo planejamento PB-12 decidiu-se observar os efeitos das variáveis nos níveis experimentais mais baixos e fixou-se à proteína de soro de leite em 30 g/L, atingindo-se produção de 166,84 mg/L de GSH e 18,75 g/L de biomassa com meio de composição de 60 g/L de glicose, 30 g/L de água de maceração de milho, 4 g/L extrato de levedura, 0,5 mM de lecitina e 2 g/L de $MgSO_4$. Nas condições deste trabalho, não se otimizou o meio de fermentação mas atingiu-se o objetivo de obter boa quantidade de GSH com o meio fermentativo de baixo custo.

ABSTRACT

Glutathione or GSH (Lγ-glutamyl-L-cysteinylglycine) is a tripeptide synthesized through consecutive enzymatic reactions. Besides being a main antioxidant, it has several other metabolic functions. Changes in its concentration have been observed in patients who suffered from poisoning with heavy metals, diabetes, inflammatory processes in the lung, coronary diseases, cancer and states of immunodeficiency. It is used in the pharmaceutical, cosmetic and food industry. Chemical and enzymatic production methods have several disadvantages, thus standard industrial production is done by means of fermentation by yeast. The objective of this work was to study the composition of a low cost culture medium for the production of glutathione by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 in bottles Erlenmeyer flask using alternative, more efficient sources of carbon, nitrogen and amino acids. To study the influence of variables such as glucose, water, corn steep liquor extract, yeast, lecithin and of whey protein, a fractional factorial design (2^{5-1}) was used totaling 19 experiments. The tests were performed at pH 5.0, 20°C, 300 rpm stirring and 96 h of fermentation. The higher yield equivalent to 264.49 GSH mg/L was obtained in 96 hours of fermentation, with a medium containing 54 g/L glucose, 50 g/L of water maceration of maize, 50 g/L yeast extract, 6 mM lecithin and 50 g/L whey protein. Based on the results it was verified that no variable was statistically significant and because of the cost of yeast extract, two other Plackett-Burman 12 (PB-12) sequential, plans were used to a the first plan, the variable MgSO_4 was added and the effects of the composition of the medium concentration in the cell, were verified. As a result an optimized condition could be concluded being a cell concentration of 23.33 g/L and an feed of 278.42 mg/L of GSH with concentration of 90 g/L glucose, 50 g/L of water maceration of maize, 10 g/L yeast extract-, 5 mM lecithin, 50 g/L of whey protein and 10 g/L of MgSO_4 . For the second PB-12 planning it was decided to observe the effects of experimental variables in the lower levels and fix the concentration of whey protein, 30 g/L, reaching a production of GSH of up to 166.84 mg/L and 18.75 g/L of biomass with a composition of 60 g/L glucose, 30 g/L of water maceration of corn, 4 g/L yeast extract, 0.5 mM lecithin and 2 g/L of MgSO_4 . The medium could not be optimized but the objective to obtain a reasonable amount of GSH utilizing a low cost culture medium was obtained.

SUMÁRIO

BANCA EXAMINADORA.....	II
<i>DEDICO</i>	III
AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT	VI
LISTA DE TABELAS	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Glutaciona	2
2.2 Produção de Glutaciona	9
2.2.1 Produção de Glutaciona por <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	14
2.2.2 Fermentação Utilizando Meios Protéicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Microrganismo	22
3.2 Preparo de Inóculo.....	22
3.3 Fermentações em Frascos Erlenmeyer	23
3.4 Estudo do Meio de Fermentação para a Obtenção de glutaciona	23
3.4.1 Seleção das Variáveis Importantes do Processo.	23
3.5 Metodologia Analítica	27
3.5.1 Determinação da Concentração de Biomassa	27
3.5.2 Determinação de pH.....	27
3.5.3 Precipitação da Proteína de Soro de Leite.....	27
3.5.4 Determinação da Concentração de Glutaciona	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-1}	29
4.1.1 Análise estatística dos resultados para GSH em 72 h	29
4.1.2 Interpretação dos resultados da fermentação em 96 h.....	31
4.2 Primeiro Planejamento Plackett-Burman de 12 Ensaios PB (12)	32
4.3 Segundo Planejamento Plackett-Burman de 12 Ensaios PB (12)	38

5.	CONCLUSÕES	42
6.	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	43
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
	APÊNDICE	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FÓRMULA ESTRUTURAL DA GLUTATIONA.....	2
FIGURA 2 – ESQUEMA DA BIOSÍNTESE DE GLUTATIONA	3
FIGURA 3 – METABOLISMO DA GLUTATIONA NAS LEVEDURAS (SHIMIZU <i>ET AL.</i> , 1991)	4
FIGURA 4 – PRODUÇÃO DE GLUTATIONA (MG/L) DURANTE O PLANEJAMENTO FATORIAL PB-12. (A) ENSAIOS 1 E 5 (B) ENSAIOS 6 A 10 (C) ENSAIOS 11 A 15.	33
FIGURA 5 – VALORES DE PH OBSERVADOS DURANTE AS 96 H DE FERMENTAÇÃO PARA O PRIMEIRO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN 12 (PB-12).	53
FIGURA 6 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO CELULAR OBSERVADOS DURANTE AS 96 H DE FERMENTAÇÃO PARA O PRIMEIRO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN 12 (PB-12).	54
FIGURA 7 – VALORES DE PH OBSERVADOS DURANTE AS 96 H DE FERMENTAÇÃO PARA O SEGUNDO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN 12 (PB-12). ENSAIOS DO 1 AO 15.	55
FIGURA 8 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO CELULAR OBSERVADOS DURANTE AS 96 H DE FERMENTAÇÃO PARA O SEGUNDO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN 12 (PB-12). ENSAIOS DO 1 AO 15.	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – COMPOSIÇÃO DO MEIO YM USADO NA MANUTENÇÃO DA CEPA E NO PREPARO DO INÓCULO DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ATCC 7754.	22
TABELA 2 – VARIÁVEIS E NÍVEIS UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{5-1}	23
TABELA 3 – MATRIZ DOS ENSAIOS GERADA PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO (FF) 2^{5-1}	24
TABELA 4 – VARIÁVEIS E NÍVEIS UTILIZADOS NO PRIMEIRO PLANEJAMENTO PB-12.	25
TABELA 5 – MATRIZ DOS ENSAIOS GERADA PARA O PRIMEIRO PB-12.....	25
TABELA 6 – MATRIZ DOS ENSAIOS GERADA PARA O SEGUNDO PB-12.	26
TABELA 7 – VARIÁVEIS E NÍVEIS UTILIZADOS NO SEGUNDO PLANEJAMENTO PB-12.	26
TABELA 8 – CONCENTRAÇÃO DA GLUTATIONA (MG/L) PRODUZIDA PELA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ATCC 7754 EM 72H E 96H DE FERMENTAÇÃO.	30
TABELA 9 – VALORES DOS EFEITOS PARA A GLUTATIONA PRODUZIDA PELA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ATCC 7754 PARA 72 H DE CULTIVO.....	31
TABELA 10 – VALORES DOS EFEITOS NO PLANEJAMENTO (FF) 2^{5-1} PARA A GLUTATIONA PRODUZIDA PELA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ATCC 7754 PARA 96 H DE FERMENTAÇÃO.....	32
TABELA 11 – CONCENTRAÇÕES DE GSH (MG/L) E MASSA CELULAR SECA (MCS) (G/L).	34
TABELA 12 – VALORES DOS EFEITOS NO PLANEJAMENTO PB-12 PARA A GLUTATIONA PRODUZIDA PELA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ATCC 7754 PARA 96 H DE FERMENTAÇÃO.....	36
TABELA 13 – VALORES DOS EFEITOS NO PLANEJAMENTO PB-12 PARA A BIOMASSA PRODUZIDA PARA 96 H DE FERMENTAÇÃO.....	37
TABELA 14 – CONCENTRAÇÕES DE GSH (MG/L) E MASSA CELULAR SECA (MCS) (G/L).	38

TABELA 15 – VALORES DOS EFEITOS NO PLANEJAMENTO PB-12 PARA PRODUÇÃO DE GLUTATIONA PELA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ATCC 7754 EM 96 H DE FERMENTAÇÃO.....	39
TABELA 16 – VALORES DOS EFEITOS NO PLANEJAMENTO PB-12 PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA PRODUZIDA PELA <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> ATCC 7754 EM 96 H DE FERMENTAÇÃO.	40
TABELA 17 – VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE GLUTATIONA OBSERVADOS DURANTE AS 96 H DE FERMENTAÇÃO PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{5-1}	51
TABELA 18 – VALORES DE PRODUTIVIDADE MÁXIMA E RENDIMENTO DE GLUTATIONA EM 24, 48, 72 E 96 H DE FERMENTAÇÃO PARA O PRIMEIRO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN 12 (PB-12).....	52
TABELA 19 – VALORES DE PRODUTIVIDADE MÁXIMA E RENDIMENTO DE GLUTATIONA EM 24, 48, 72 E 96 H DE FERMENTAÇÃO PARA O SEGUNDO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN 12 (PB-12).....	52

1. INTRODUÇÃO

O glutathion ou glutathione (GSH) é um tripeptídeo composto por ácido glutâmico, cisteína e glicina, sendo um composto sulfurado não protéico sintetizado por várias reações enzimáticas encontrado nas células de animais, vegetais e microrganismos (SCHMIDT e KONETZKA, 1986; SUZUKI *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2003; GOTOH *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2004; CHA *et al.*, 2004; WEN *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2005; WEN *et al.*, 2005; DONG *et al.*, 2007).

A principal característica da glutathione é seu alto poder antioxidante contra metais pesados, oxigênio e outros compostos oxidantes, Segundo ROLLINI e MANZONI (2006) este tripeptídeo pode ser considerado uma molécula de defesa e as alterações em sua quantidade no organismo é devido ao padecimento de doenças como câncer, diabetes, HIV, problemas coronários e intoxicações (ROTH *et al.* 2002).

Este composto pode ser produzido por leveduras como a *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis* e bactérias como a *Escherichia coli* e *Phormidium lapideum*, sendo utilizado como antioxidante na indústria farmacêutica e cosmética, na indústria de laticínios evitando a sinérese em iogurtes e também na nutrição esportiva (WEI *et al.* 2003a; WEI *et al.* 2003b; BONISH *et al.* 2007).

Segundo, Wei *et al.* 2003a; Santos *et al.* 2007 e Zhang *et al.* 2007, geralmente a glutathione é produzida por meios sintéticos e uma quantidade reduzida de trabalhos aproveitam subprodutos ou produtos agroindústrias de baixo custo como a água de maceração de milho, lecitina e proteína de soro de leite. A escolha destes produtos como matéria-prima se deve a sua abundância no Brasil e por serem ricos em nutrientes.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar a produção da glutathione em meios protéicos de baixo custo utilizando planejamento experimental para avaliar a influência da composição do meio protéico no processo de síntese da glutathione e biomassa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 GLUTATIONA

O glutathion ou glutathione (GSH) é um tripeptídeo composto por ácido glutâmico, L-cisteína e glicina (Figura 1). Foi descoberta em um extrato etanólico de leveduras de panificação em 1888 e chamado de “philothion” (LI *et al.*, 2004), sendo renomeado e isolado pela primeira vez em 1921 por Hopkins, a partir de leveduras, fígado e músculo de animais (LIU *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2004).

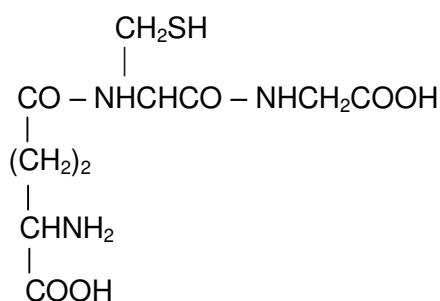


Figura 1 – Fórmula estrutural da glutathione.

A GSH é um composto sulfurado não protéico encontrado em grandes quantidades na maioria das células de plantas, animais e microrganismos, sendo sua principal função evitar a oxidação celular (SCHMIDT e KONETZKA, 1986; SUZUKI *et al.*, 1999; LI *et al.*, 2003; CHA *et al.*, 2004; GOTOH *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2004; WEN *et al.*, 2004; WEN *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005; DONG *et al.*, 2007).

As quantidades de GSH encontradas em alguns organismos são apresentadas a seguir:

- 3 a 7 mmoles/kg de *Saccharomyces cerevisiae* (BAUER, 1986);
- 1% do peso seco da *Saccharomyces cerevisiae* (ELSKENS *et al.*, 1991);
- 0,5 a 1% do peso seco de *Saccharomyces cerevisiae* (PENNINCKX, 2000);
- 0,5 a 10 mmol/L em células de mamíferos (ROVER Jr. *et al.*, 2001);
- concentrações de até 10 mM na maioria das células vivas de organismos procarióticos e eucarióticos (PENNINCKX, 2002);
- 0,1 a 1% em leveduras selvagens (LI *et al.*, 2004).

Algumas cepas de *Saccharomyces* e *Candida* foram submetidas a técnicas físicas e químicas para obter cepas mutantes e, com isso, o conteúdo de GSH chegou a 3-5% do peso seco (LI *et al.*, 2004).

A GSH é sintetizada através de consecutivas reações enzimáticas, catalisadas pela γ -glutamilcisteína sintetase (GSH I, EC 6.3.2.2) e glutathiona sintetase (GSH II, EC 6.3.2.3) a partir de ácido glutâmico, cisteína e glicina, na presença de ATP, que é desdobrado a ADP e fosfato para cada ligação peptídica produzida, conforme descrito na Figura 2 (BAUER, 1986; FAN *et al.*, 2004; GRANT *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2005; MURATA *et al.*, 1981; PENNINCKX, 2002).

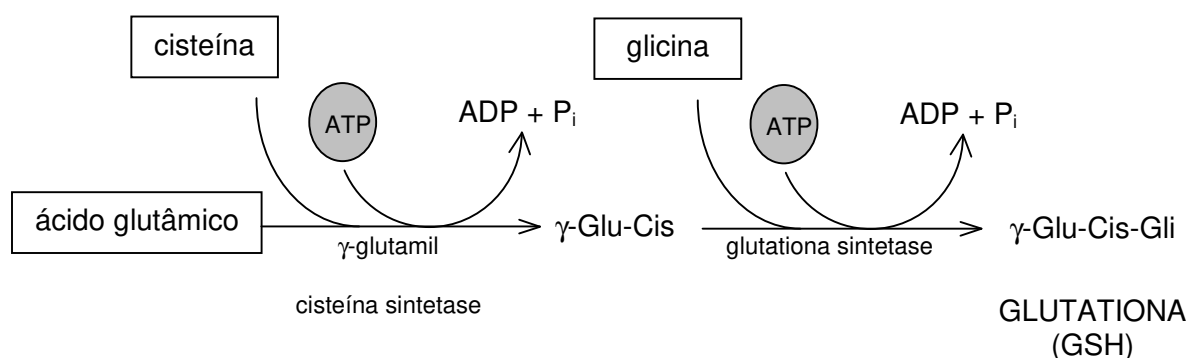


Figura 2 – Esquema da biossíntese de glutathiona

A Figura 3 apresenta o caminho metabólico da GSH nas leveduras. A glicose primeiramente é transformada em piruvato, que é transformado em acetil-CoA, participando assim do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) com liberação de energia. Para a formação da GSH, o ácido glutâmico provém do α -cetoglutarato, que é um composto do ciclo do TCA. Quando é fornecido à levedura um excesso de glicose ocorre a produção de etanol através do efeito Crabtree. Quando há quantidade insuficiente de glicose no meio, o etanol pode ser assimilado e a GSH produzida (SHIMIZU *et al.*, 1991).

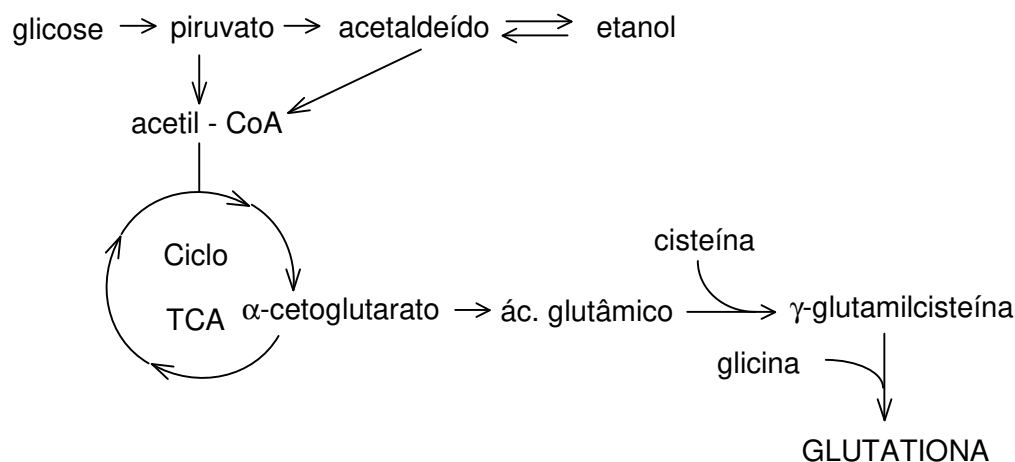


Figura 3 – Metabolismo da glutatona nas leveduras (SHIMIZU *et al.*, 1991)

Sakato e Tanaka (1992) relataram que a produção de GSH é linearmente dependente do tempo de consumo de etanol, pois não foi observado aumento nos níveis da GSH após acabar o etanol do meio. O conteúdo de GSH intracelular está relacionado com a morfologia celular e a presença de etanol exerce um papel importante na mudança destas características.

Wen *et al.* (2006) citaram que a concentração de etanol no meio tem grande efeito na concentração de GSH, sendo que altas concentrações inibem o crescimento celular.

Fahey *et al.* (1978) quantificaram a GSH em várias bactérias gram negativas e positivas. A GSH foi detectada em algumas bactérias gram-positivas e na maioria das gram-negativas. Dentre as gram-positivas, a que apresentou a maior concentração foi *Streptococcus lactis* (5 $\mu\text{mol/g}$), e dentre as gram-negativas a *Escherichia coli* (30 $\mu\text{mol/g}$) e *Alcaligenes faecalis* (23 $\mu\text{mol/g}$).

Grant *et al.* (1996) relataram que as exigências de GSH diferem para organismos eucarióticos e procarióticos. É um componente essencial para os processos metabólicos nas leveduras, o que não ocorre com as bactérias, nas quais não é um metabólito essencial. Stephen e Jamieson (1996) citaram que para a GSH da *Saccharomyces cerevisiae* é um importante antioxidante, enquanto que para a *Escherichia coli* é um antioxidante dispensável na sua composição. Li *et al.* (2005) citaram que a GSH é encontrada principalmente em

microrganismos eucarióticos e em bactérias gram-negativas e raramente em bactérias gram-positivas.

A biossíntese da GSH em seres humanos ocorre em todos os tipos de células, sendo o fígado o principal produtor e exportador. Estudo recente mostraram dados suficientes para afirmar que a cisteína é geralmente o aminoácido limitante na síntese de GSH em humanos, bem como em ratos, porcos e frangos (WU *et al.*, 2004).

Cerca de 90% da GSH é normalmente encontrada na forma reduzida (GSH), porém várias outras formas estão presentes nas células microbianas, nos tecidos e no plasma. A GSH oxidada (GSSG), formada pela oxidação da GSH, pode ser reduzida através da GSH redutase na presença de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato). Além do GSSG, a GSH pode ocorrer em outras formas, por exemplo, GS-S-CoA, CS-S-cis e GS-S-proteína que são formadas através de “glutathionilação” (LI *et al.*, 2004).

De forma complementar ao sistema de defesa enzimático, no qual participam enzimas, tais como a catalase e a superóxido dismutase, todas as células possuem um sistema de defesa não enzimático para proteger os constituintes celulares dos radicais livres e formas reativas do oxigênio e manter o potencial redox da célula (STEPHEN e JAMIESON, 1996).

A função mais importante da GSH é atuar como antioxidante contra os efeitos tóxicos do oxigênio e outros compostos oxidantes. A GSH não somente reage com o grupo $\text{OH}^{\cdot-1}$ produzindo H_2O , mas também serve como doador de elétrons para a enzima antioxidante, GSH peroxidase (FAN *et al.*, 2004). Está envolvida nos sistemas enzimáticos e não-enzimáticos de defesa contra espécies reativas do oxigênio, e também é um co-fator de enzimas envolvidas nos mecanismos antioxidantes de defesa (GRANT *et al.*, 1996). Devido a sua função antioxidante atua na proteção do DNA, proteínas e outras biomoléculas contra perdas por oxidação geradas, por exemplo, devido a espécies reativas do oxigênio (LI *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004). Sua função antioxidante está fortemente associada com o seu papel em manter o equilíbrio iônico das células, pois afeta amplamente as reações de oxidação e redução das células (SHIMIZU *et al.*, 1991; LIU *et al.*, 1999; WEI *et al.*, 2003a). Tem a capacidade de proteger as células, durante condições de estresse, mantendo as funções básicas da célula em condições normais (PENNINCKX, 2002; WEI *et al.*, 2003a; WEI *et al.*, 2003b). Nos tecidos vivos

desempenha um papel importante na biorredução, na proteção contra estresse oxidativo, na desintoxicação de metabólitos endógenos tóxicos e de oxoaldeídos endógenos, na atividade enzimática, na biorredução de drogas e no metabolismo do enxofre e nitrogênio (ELSKENS *et al.*, 1991; PENNINCKX, 2000; PENNINCKX, 2002; ROLLINI e MANZONI, 2006). Acredita-se também que possui função de estoque, como o glicogênio, trealose, polifosfatos e lipídios (ELSKENS *et al.*, 1991).

A função de proteção celular da GSH está associada a uma reação não específica que ocorre entre o grupo sulfidril da GSH e o oxidante, sendo que o produto reduzido resultante geralmente não é tóxico (SCHMIDT e KONETZKA, 1986). Além disso, possui importante papel nas funções imunes pela produção dos glóbulos brancos do sangue e é um dos agentes antiviróticos conhecidos mais potentes (LI *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004).

A GSH peroxidase, encontrada em muitos tecidos de origem animal, participa de um importante sistema de defesa enzimático que atua contra o aumento de radicais livres. Outra enzima que age conjuntamente é a GSH redutase. Esta enzima não age diretamente na remoção de espécies radicalares, porém é responsável pela regeneração da GSH a sua forma reduzida (GSH) na presença de NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo da GSH. Ela e as enzimas que fazem parte do ciclo catalítico deste peptídeo apresentam associações com alterações dos estados antioxidantes e com o aumento do estresse oxidativo. Estas alterações implicam em lesões de DNA, gerando processos pré-mutagênicos e podendo levar, em alguns casos, ao câncer. (ROVER Jr. *et al.*, 2001).

Devido à sua quantidade abundante na célula e à presença de grupos sulfidril ativos, qualquer mudança nos níveis de GSH ou na proporção GSH/GSSG (glutathiona/glutathiona oxidada) pode ser percebida pela célula e usada como sinal para ocorrer uma adaptação a uma situação de estresse (STEPHEN e JAMIESON, 1996).

Em particular, os problemas na síntese e metabolismo de GSH estão associados a algumas doenças, nas quais os seus níveis e das enzimas que atuam no seu metabolismo, podem ser bastante significativos no diagnóstico de alguns tipos de câncer, bem como em outras doenças relacionadas ao estresse oxidativo. As mudanças na concentração deste

tripeptídeo podem ser um indicador útil em certas desordens fisiológicas, como anemias causadas por infecção ou seguidas pela administração de algumas drogas oxidantes, no monitoramento da eficácia de alguns tratamentos usando N-acetil-L-cisteína (NAC) durante o metabolismo do paracetamol, no tratamento de pacientes com artrite reumatóide e na investigação do estresse oxidativo do miocárdio. Há alguns anos, foi reportada a diminuição dos níveis da GSH em hemácias e plasma de pessoas infectadas com o vírus da imunodeficiência (HIV-1), associado à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (ROVER Jr. *et al.*, 2001).

Em humanos, sua deficiência está ligada ao envelhecimento e várias doenças: infecção por HIV, cirrose hepática, doenças pulmonares, gastro-intestinais, inflamação no pâncreas, diabetes e doenças neurodegenerativas (LI *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004). A concentração de GSH em células cancerígenas chega a ser de 5 a 50 vezes maior que em células normais (ROTH *et al.*, 2002). Os estudos de Reiners *et al.* (1991) demonstraram que o conteúdo de GSH nos tecidos diminuiu drasticamente durante o desenvolvimento e progressão de tumor de pele.

Sakato e Tanaka (1992) citaram que a GSH tem importantes aplicações no tratamento de doenças do fígado, enquanto Liu *et al.* (1999) e Shimizu *et al.* (1991) relataram que, além da utilização no tratamento de doenças do fígado, pode ser usada como purificador de toxinas.

A GSH pode ser usada como uma fonte endógena de enxofre na levedura *S. cerevisiae* (ELSKENS, 1991; GHARIEB e GADD, 2004; PENNINCKX, 2000) e de nitrogênio (GHARIEB e GADD, 2004). A maior parte do excesso de enxofre é incorporada na GSH como nutriente na presença de sulfato (PENNINCKX, 2000).

Gharieb e Gadd (2004) citaram que a GSH desempenha uma função de proteção da célula contra biocidas e certos íons metálicos. É um tripeptídeo importante no acúmulo e desintoxicação de Cd (cádmio) e Se (selênio). Porém, com outros íons mostrou independência à tolerância na *S. cerevisiae*. Dentre estes íons pode-se citar: Te (telúrio), Zn (zinco), Co (cobalto), Cu (cobre), Mn (manganês), Ni (níquel) e Cr (cromo).

Por ser considerada uma poderosa, versátil e importante molécula de defesa, é usada “contra” o envelhecimento e como importante droga no tratamento de numerosas doenças, tais como infecções HIV, cirrose hepática e inflamações no pâncreas (ROLLINI e MANZONI, 2006).

O stress causa aumento no consumo de energia nas leveduras, que induz mudanças no metabolismo e acúmulo de algumas moléculas protetoras. A trealose e a GSH são exemplos destas moléculas protetoras produzidas pela *S. cerevisiae* sobre condições de estresse, tais como, redução de nutrientes, choque osmótico e aumento da temperatura (DONG *et al.*, 2007).

Vários estudos sobre a produção de GSH têm sido feitos com células animais, bactérias e leveduras (LI *et al.*, 1998). A descoberta de mais funções e propriedades da GSH tem aumentado o interesse e a demanda comercial das indústrias de aditivos para alimentos, de terapêuticos, farmacêutica, de nutrição esportiva e de cosméticos (LI *et al.*, 1998; LI *et al.*, 2004; NIE *et al.*, 2005; WEI *et al.*, 2003a; WEI *et al.*, 2003b).

Zhang *et al.* (2007) citaram que a GSH é amplamente usada como um composto na indústria farmacêutica e tem potencial para ser usada nas indústrias de aditivos para alimentos e indústrias de cosméticos.

Maccarone *et al.* (1985) estudaram a estabilidade de antocianinas em suco de laranja através da adição de antioxidantes. A GSH foi utilizada como antioxidante para reduzir a oxidação química e enzimática. Foi observado que a GSH, em conjunto com ácido tartárico, é capaz de estabilizar a cor, sendo que o melhor resultado foi observado quando a amostra foi pasteurizada e adicionada a 100 mL de suco 250 mg de ácido tartárico e 100 mg de GSH.

A GSH desempenha um papel no desenvolvimento do “flavor” no queijo. Desta forma o seu acúmulo e a hidrólise por bactérias ácido lácticas são de grande interesse. Estudos anteriores mostraram que a adição de GSH durante a produção de queijo aumenta o crescimento das bactérias, a proteólise, a estabilidade e atividade das esterases, a formação de metanetiol e sulfito de hidrogênio, além de aumentar o desenvolvimento das características do “flavor” do queijo Cheddar (FERNÁNDES e STEELE, 1993; WIEDERHOLT e STEELE, 1994). O mecanismo pelo qual a GSH influencia o desenvolvimento do “flavor” é desconhecido, entretanto algumas possibilidades podem ser citadas: 1) contribuição para a formação de potencial redox baixo; 2) estabilização das enzimas; 3) atuação como cofactor para as enzimas; 4) ação como um precursor para os compostos sulfurados do “flavor”, tais como, metanetiol e sulfito de hidrogênio (WIEDERHOLT e STEELE, 1994).

A levedura *S. cerevisiae* possui membrana celular contendo duas camadas de fosfolípidios, e somente moléculas pequenas (O_2 , CO_2 , H_2O) conseguem passar através da membrana livremente. Em geral, a GSH não pode ser excretada no meio a partir de células vivas. A excreção somente pode ser provocada através da ruptura da membrana celular (WEI *et al.*, 2003b).

Gotoh *et al.* (2004) estudaram a separação de GSH de seus aminoácidos (cisteína, glicina e ácido glutâmico) através de nanofiltração e os resultados mostraram que é possível realizar a separação através deste método durante a síntese enzimática da GSH.

2.2 PRODUÇÃO DE GLUTATIONA

As pesquisas com a produção enzimática e por fermentação da GSH foram mais intensas entre 1976 e 1985 no Japão. E a produção e comercialização por fermentação com leveduras começaram no início dos anos 80. Desde então, o número de patentes da produção de GSH diminuiu drasticamente. A produção enzimática não tem sido empregada devido aos altos custos de produção (LI *et al.*, 2004).

A produção de GSH pode ser realizada por métodos químicos, reações enzimáticas e através de fermentação por microrganismos (WEN *et al.*, 2004). Alguns métodos químicos e enzimáticos têm sido estudados para a produção de GSH. Entretanto, o método enzimático não tem aplicação prática, pois as enzimas envolvidas requerem ATP para realizar as suas reações e um sistema de regeneração para desempenho favorável. Na síntese química ocorre o envolvimento de um grupo sulfidril altamente suscetível à oxidação, além da adição do peptídeo γ -glutamil que também dificulta a síntese (GOTOH *et al.*, 2004).

A GSH pode ser produzida a partir de microrganismos tais como a cianobactéria *Phormidium lapideum* (SAWA, *et al.*, 1986) e a bactéria *Escherichia coli* (LI *et al.*, 1998; MURATA *et al.*, 1980; SCHMIDT e KONETZKA, 1986). Algumas espécies de leveduras têm habilidade de acumular GSH nas células. A fermentação com leveduras é um método eficiente para produzir GSH comercialmente, bem como para a aplicação prática do processo (WEN *et al.*, 2004; WEN *et al.*, 2005). Desta forma para a produção comercial são utilizadas cepas de

Saccharomyces cerevisiae e *Candida* (ALFAFARA *et al.*, 1992a; ALFAFARA *et al.*, 1992b; GOTOH *et al.*, 2004; LI *et al.*, 2004; WEI, *et al.*, 2003a; WEI, *et al.*, 2003b).

Wen *et al.* (2005) concluíram que a produção de GSH por fermentação pode ser dividida em três fases. Na fase I (0-8 h) ocorre o consumo de glicose e produção de etanol, os níveis de glicose diminuem gradualmente, enquanto a concentração de etanol e de GSH aumentam. Na fase II (8-14 h) acontece a utilização do etanol, o crescimento celular acontece de forma mais lenta e o etanol é utilizado como fonte de carbono para o crescimento celular e síntese de GSH. Na fase III (14-24 h) ocorre a chamada fase estacionária, a glicose e o etanol são consumidos e as células param de crescer. A GSH é acumulada nas fases II e III.

Izawa *et al.* (1995), avaliando a adaptação da *S. cerevisiae* S288C ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio, observaram que os níveis de GSH encontrados durante a fase estacionária (6,89 $\mu\text{mol/g}_{\text{célula}}$) foram aproximadamente três vezes maiores do que na

Foram encontradas maiores concentrações de GSH na *Escherichia coli* quando ela foi cultivada em condições aeróbias do que no cultivo em condições anaeróbias. Os maiores valores foram observados durante a fase estacionária (FAHEY *et al.*, 1978).

Um fator limitante para o acúmulo de GSH na célula é o oxigênio dissolvido (OD). Nas células de leveduras a síntese deste tripeptídeo requer a participação de moléculas de ATP. Altos níveis de OD são favoráveis para a produção de ATP e regeneração do ADP a ATP, favorecendo assim a produção de GSH. Durante a fermentação, a formação de etanol é indesejada, pois não favorece o crescimento celular. Os fatores mais importantes que afetam uma fermentação batelada alimentada são o acúmulo de etanol e a concentração de oxigênio no meio de fermentação. Valores de μ (velocidade específica de crescimento) relativamente baixos, nutrientes em quantidade suficiente e altas concentrações de OD são necessárias para evitar o acúmulo de etanol e fazer com que sejam alcançados altos níveis de concentração celular e de GSH (LIN *et al.*, 2004).

Na cianobactéria *Phormidium lapideum*, Sawa *et al.* (1986) observaram que 20% da GSH é encontrada na forma intracelular e 80% é excretada para fora da célula.

Nas leveduras, a GSH encontra-se no interior da célula; desta forma o aumento da produção pode ocorrer de duas formas: aumentando amplamente a concentração celular obtida ou promovendo o aumento do conteúdo intracelular (WEN *et al.*, 2004; WEN *et al.*, 2006). Comparativamente é mais fácil aumentar a concentração celular através das tecnologias de fermentação desenvolvidas, do que aumentar o conteúdo intracelular de GSH. Porém, a segunda opção é mais atrativa, porque além de aumentar a produção de GSH pode ocorrer a facilitação nas etapas de “downstream” (WEN *et al.*, 2004). A excreção da GSH no meio é uma etapa a mais durante o processo de produção. Para isto, devem ser estudadas formas de aumentar os níveis de GSH extracelular, mas poucos trabalhos têm sido realizados neste sentido (WEI *et al.*, 2003b).

A fermentação de batelada alimentada é um dos métodos mais eficientes para alcançar altos níveis de densidade celular com leveduras. Entretanto, a velocidade específica de crescimento (μ) durante a batelada alimentada deve ser cuidadosamente controlada para evitar um declínio do conteúdo intracelular da GSH (LI *et al.*, 2004).

De acordo com Tadayuki *et al.* (1985), citado por Wei *et al.* (2003a), o crescimento celular, a formação de GSH e o seu conteúdo intracelular são influenciados pela temperatura. Em geral a temperatura ótima para o crescimento celular e produção de GSH são diferentes. Wei *et al.* (2003a) estudaram os efeitos da temperatura na fermentação em batelada usando *Candida utilis* WSH 02-08. A máxima produção de GSH ocorreu a 26°C, mas o crescimento celular mais pronunciado foi a 30°C. Como as temperaturas necessárias para obter os máximos valores de concentração celular e de GSH são diferentes, utilizou-se uma estratégia de manter a temperatura a 30°C nas primeiras 8 h e depois diminuir para 26°C a fim de aumentar a produção de GSH. Nestas condições foi alcançada a maior concentração de GSH, equivalente a (385 mg/L).

Fernandes e Steele (1993) citaram que o tipo de meio de crescimento afeta a concentração do conteúdo intracelular da GSH, mas não a sua presença ou ausência.

Li *et al.* (2003) avaliaram o conteúdo de GSH em várias subespécies e cepas de *Lactococcus lactis*. Para tal, foram utilizadas condições aeróbias e anaeróbias de crescimento e dois meios de crescimento: meio M17 rico em aminoácidos e meio CDM (chemically defined

medium). A GSH não foi detectada nas 21 cepas quando utilizado o meio CDM e nem sempre o acúmulo de GSH estava relacionado com a aeração.

Li *et al.* (2005), utilizando *Lactococcus lactis* NZ 9000 modificada geneticamente, avaliaram a produção de GSH em dois meios de cultura, M17 e CDM (meio definido previamente por Li *et al.*, 2003). Foi observado que no meio M17 a concentração de GSH produzida foi oito vezes maior que no meio CDM. Isto indicou que a composição do meio de cultura pode afetar bastante a produção de GSH. Os três aminoácidos precursores da GSH (ácido glutâmico, cisteína e glicina) foram adicionados em combinações diferentes, para aumentar a concentração de GSH utilizando o meio CDM. Nos ensaios que a cisteína foi adicionada, ocorreu aumento da atividade da enzima GSH sintetase, promovendo o aumento da conversão do γ -glutamilcisteína em GSH. Porém, o mecanismo pelo qual ocorre este fato não foi elucidado. A cisteína é um aminoácido fundamental para a síntese da GSH e a manutenção de seus níveis celulares depende da sua disponibilidade e do transporte deste aminoácido até as células.

Liu *et al.* (2004) relataram que a biossíntese de GSH requer além de ATP, os três aminoácidos precursores. Sem a suplementação destes aminoácidos no meio, as concentrações intracelulares serão mantidas nos seus níveis fisiológicos e a síntese de GSH pode ser inibida.

Nie *et al.* (2005) citaram que a síntese de GSH é essencial para o crescimento celular em condições de estresse. Se a levedura for submetida a tais condições a produção de GSH deve aumentar. Foram feitas fermentações utilizando *Candida utilis* WSH-02-08 e o efeito que o estresse, através do pH baixo e da adição de glicose durante a fermentação causam na célula foram estudados. Foi utilizado um fermentador de 7 L, com aeração de 5 L/min, agitação 300 rpm e 10% de inóculo. Paralelamente, foram realizados experimentos com controle de pH. Pôde-se verificar que a concentração de GSH foi maior nos ensaios com controle de pH (332 mg/L) do que nos sem controle de pH (171 mg/L). Quando as células foram submetidas a pH baixo ocorreu a excreção da GSH para o meio e este fato é importante, pois simplifica os processos de extração do produto. A maior concentração de GSH (737,1 mg/L) foi observada no ensaio que o pH foi mantido em 5,5 por 24 h, após este período foi diminuído para 1,2 durante 3 h e em 27 h de fermentação foi adicionado 30 g/L glicose e o pH elevado para 5,5.

Ohwada e Sagisaka (1990) observaram aumento nos níveis de GSH quando as células de *Escherichia coli* foram submetidas a estresse osmótico, através da adição de NaCl ou sacarose. Os níveis de GSH aumentaram 2,5 vezes com a sacarose (0,51 M) e 4 vezes com o NaCl (0,1-0,4 M). Com concentrações de NaCl superiores a 0,6 M, a GSH foi excretada da célula para o meio. No ensaio em que foram adicionados aminoácidos (cisteína, ácido glutâmico e glicina) foi obtida uma concentração de GSH 10 vezes maior que nos ensaios sem a adição.

As enzimas envolvidas na síntese da GSH utilizam magnésio e potássio como cofatores, sendo que as quantidades destes elementos encontradas nas células de leveduras são aproximadamente 1,9 e 0,1% (peso seco), respectivamente. Porém, Bauer (1986) não observou aumento na produção de GSH quando estes minerais foram adicionados ao meio de cultivo.

Murata *et al.* (1980) estudaram o processo de produção de GSH em coluna através da imobilização de *Escherichia coli* em gel de carragena. O reator era composto por dois sistemas reacionais: no primeiro, a produção de GSH foi catalisada pela enzima GSH sintetase e no segundo o ATP consumido na produção de GSH foi regenerado. O tempo de vida útil da coluna foi de oito dias.

Li *et al.* (1998) estudaram a produção de GSH por *Escherichia coli* WSH-KE1 modificada geneticamente. Foram feitas fermentações em batelada alimentada em fermentador de 2 L, com meio contendo extrato de levedura, glicose, sais minerais e os aminoácidos ácido glutâmico, glicina e cisteína, sendo estudadas três estratégias de alimentação de nutrientes. A adição de aminoácidos no começo da fermentação inibiu o crescimento do microrganismo, porém quando esta mistura foi adicionada após 12 h de fermentação as concentrações celular e GSH foram maiores. Os mesmos autores observaram que a adição de glicose durante o processo de batelada alimentada pode aumentar os níveis de GSH intracelular e a concentração celular. Os melhores valores de concentração celular (80 g/L), produtividade (3,2 g/L.h) e concentração de GSH (880 mg/L) foram observados no ensaio com alimentação na fase exponencial.

Rollini *et al.* (2005) investigaram o acúmulo de GSH em leveduras do gênero *Candida* (13 cepas) e *Pichia* (11 cepas), cujas fermentações foram conduzidas em meio suplementado com diferentes fontes de carbono, metanol, etanol e glicose. A maior concentração celular foi evidenciada com glicose (9,9 g/L *Candida nemodendra*) e etanol (9,7 g/L *Pichia pastoris*), enquanto que os menores valores foram observados com etanol (menor que 4,0 g/L para 80% das cepas de *Candida* e 40% de *Pichia*). Entretanto as porcentagens de GSH foram maiores utilizando metanol como fonte de carbono, 3,9 e 3,5% para *Candida pini* e *Pichia philodendri*, respectivamente.

2.2.1 Produção de Glutathione por *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é conhecida por desenvolver diferentes mecanismos adaptativos, com intuito de sobreviver mesmo em condições de estresse, sendo que as mais comuns incluem choques de pH e temperatura, estresse oxidativo, choque osmótico e os produtos de fermentação tóxicos, principalmente o etanol (PENNINCKX, 2000).

Murata *et al.* (1981) estudaram a produção de GSH utilizando células imobilizadas de *S. cerevisiae* IFO 2044 em gel de poliácridamida e compararam com células não imobilizadas. As melhores condições foram: glicose 0,5 M, tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0), cloreto de magnésio 0,02 M e 0,025 M de cada um dos três aminoácidos precursores. Nas células imobilizadas a GSH foi excretada no meio, enquanto nas células não imobilizadas a GSH foi acumulada na célula. As maiores concentrações de GSH foram encontradas após 24 h de incubação com as células imobilizadas.

Bauer (1986) verificou que utilizando *S. cerevisiae* para produção de GSH as temperaturas nas quais foram obtidas a mínima e a máxima produção foram 26°C e 28,8°C, respectivamente. Altas concentrações de GSH foram observadas quando se aumentou o nível dos aminoácidos cisteína e ácido glutâmico no meio de cultivo.

Shimizu *et al.* (1991) estudaram a otimização da produção de GSH através do controle da velocidade específica de crescimento (μ) em fermentação em batelada alimentada, utilizando *S. cerevisiae* KY5711. Os autores relataram que a produtividade de GSH depende do

tipo de fonte de carbono utilizada. Da mesma forma, o valor máximo de μ coincide com o máximo ρ_G (velocidade específica de produção de GSH) que decresce quando há produção de etanol ou quando a concentração de glicose presente é muito alta. Para valores de $\mu \leq 0,3 \text{ h}^{-1}$ o conteúdo de GSH é constante e para valores de μ maiores que $0,3 \text{ h}^{-1}$ o conteúdo de GSH diminui.

Sakato e Tanaka (1992) avaliaram o processo de fermentação em batelada alimentada para obtenção de GSH em fermentador de 30 L. O microrganismo utilizado foi *S. cerevisiae* KY 6186 e as condições da fermentação foram: pH 5,1, temperatura de 30°C, aeração de 11 L/min e 350 rpm. O meio usado para a alimentação foi melaço de cana de açúcar (100 g/L), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (2,5 g/L) e KH_2PO_4 (2,5 g/L). Os resultados mostraram um aumento de cerca de 40% na concentração de GSH quando comparado com o processo convencional.

Alfara *et al.* (1992a) estudaram o efeito da adição de 7,4 mM de cisteína, glicina e ácido glutâmico na produção de GSH utilizando *S. cerevisiae* KY5711 em frascos Erlenmeyer. Foi utilizada glicose (10 g/L), temperatura de 30°C e pH_{inicial} 5,0. Em todos os ensaios, após 6 h de fermentação, a glicose foi completamente consumida e após este período o crescimento celular pode ter ocorrido devido ao consumo do etanol. Nos ensaios com adição de cisteína foram obtidas concentrações maiores de GSH e não foi observado crescimento celular na segunda fase (fase de consumo do etanol), o que indicou que este foi o aminoácido “chave” durante a síntese da GSH e que a cisteína pode inibir de alguma forma a assimilação do etanol. Não há uma explicação de como a cisteína pode inibir a assimilação do etanol e a forma como ela atua na síntese da GSH é aparentemente complexa, pois foi observado que o seu modo de atuação é diferente de como um precursor atua. Quando a concentração inicial de cisteína foi de 2 a 3 mM foram obtidas 7 mg_{GSH}/g_{célula}/h de GSH e concentrações maiores não promoveram aumento do produto.

Alfara *et al.* (1992a) analisaram a produção de GSH com *S. cerevisiae* KY5711 e para tal utilizaram temperatura de 30°C e pH controlado em 5,4. Durante a fermentação, a concentração de cisteína foi mantida em 3 mM através de alimentação constante, porém foi verificado que houve declínio nos valores da velocidade específica de crescimento e velocidade de produção de GSH após longos períodos de exposição à cisteína. O máximo conteúdo intracelular foi de 12-14 mg_{GSH}/g_{célula}. Quando a alimentação de cisteína foi feita em pontos

isolados durante a fermentação os resultados foram melhores que com a alimentação constante (aproximadamente 22 mg_{GSH}/g_{célula}). Uma das opções para aumentar a produção seria dividir a fermentação em duas etapas: crescimento celular e produção de GSH.

Liu *et al.* (1999), estudaram a otimização do meio da cultura para produção de GSH utilizando *S. cerevisiae* ATCC 7754. As fermentações foram conduzidas em frascos de Hinton (50 mL) contendo 10 mL de meio, a 30°C, 150 rpm e 4% de inóculo. Várias fontes de carbono, nitrogênio e sais foram testadas para determinar os melhores componentes, tanto para a produção de GSH como para produção de células. A maior concentração de GSH (115,28 mg/L) foi obtida com o meio contendo 5,20% de glicose, 4,84% de peptona e 1,16% de sulfato de magnésio. A maior concentração celular (9,45 g/L) foi obtida com o meio composto por 8,45% de glicose, 8,86% de peptona e 1,63% de sulfato de magnésio.

Wei *et al.* (2003b) avaliaram o efeito da adição de surfactantes durante a produção de GSH por *S. cerevisiae* WSH-J701. As fermentações foram feitas em frascos Erlenmeyer e as condições de cultivo foram pH_{inicial} 5,0, 30 g/L de glicose, 200 rpm e 1% de inóculo. Após 32 h de cultivo a concentração de GSH foi de 64,7 mg/L e a produção de GSH foi associada ao crescimento celular. Em relação à adição de surfactantes, somente quando baixas concentrações foram adicionadas ao meio ocorreu aumento da quantidade de GSH total e sua excreção para o meio extracelular. Este fato ocorreu quando as concentrações de sulfato de sódio dodecil estavam entre 0,001 e 0,1 g/L, brometo de cetiltrimetilamonio entre 0,001 e 0,01 g/L e éter lauril polioxietileno entre 0,01 e 5,0 g/L.

Cha *et al.* (2004) estudaram a influência da adição de aminoácidos, sais, fonte de carbono e nitrogênio na produção de GSH por *S. cerevisiae* FF-8. Foram feitas fermentações em frascos Erlenmeyer a 30°C e 100 rpm por 72 h. Várias fontes de carbono foram testadas (glicose, galactose, frutose, lactose, maltose e sacarose) e o melhor resultado (57,6 mg/L) foi conseguido com glicose. Em relação à fonte de nitrogênio, foram testadas dez e o melhor resultado, 88,4 mg/L, foi encontrado quando utilizado extrato de levedura. Dentre todos os sais testados, o único que inibiu a produção de GSH foi o FeSO₄, e o melhor resultado foi com KH₂PO₄ (144,8 mg/L). Em relação aos aminoácidos, a maior concentração de GSH (204 mg/L) foi obtida quando a L-cisteína foi adicionada. O meio de cultivo com melhor resultado continha: glicose 3%, extrato de levedura 3%, KH₂PO₄ 0,06% e L-cisteína 0,06%.

Fan *et al.* (2004) utilizaram a *Escherichia coli* modificada geneticamente através da inserção de um gene da *S. cerevisiae* YSG-26 para a produção de GSH. O maior conteúdo de GSH foi de 13,1 mg_{GSH}/g_{célula} obtido em meio YEPD após 36 h e 28°C.

Lin *et al.* (2004) analisaram a produção de S-adenosil-L-metionina e GSH através de fermentação em batelada alimentada e obtiveram 0,81 g/L de GSH e concentração celular de 105 g/L. Para tal, utilizaram *S. cerevisiae* ZJUS1 e as condições de cultivo foram: concentração inicial de glicose de 10 g/L, concentração de glicose na alimentação de 800 g/L, velocidade específica de crescimento (μ) mantida em 0,13 h⁻¹, pH controlado em 5,0 e temperatura de 28°C.

Liu *et al.* (2004) utilizaram *S. cerevisiae* proveniente de indústria cervejeira para a produção de GSH. Foram feitas fermentações em frascos Erlenmeyer (500 mL) e em fermentador de 15 L. Nos frascos as condições de cultivo foram 28°C, 180-190 rpm por 24 h e foram testados os efeitos da concentração de glicose e do volume de meio. As maiores concentrações (10 mg_{GSH}/g_{célula}) foram obtidas com 10 g/L de glicose e com 10 mL de meio. No fermentador as condições foram 500 rpm, 28°C, sendo testada a vazão de ar. A maior concentração (18 mg_{GSH}/g_{célula}) foi obtida com 3,0 vvm.

Wen *et al.* (2004) estudaram a adição de aminoácidos na produção de GSH por *S. cerevisiae* T65. As condições utilizadas nos frascos Erlenmeyer foram: 30°C, 20% (v/v) de inóculo e 180 rpm por 24 h. Vários aminoácidos foram testados bem como diferentes estratégias para adição destes. O melhor resultado (153,2 mg/L) foi obtido quando 2 mM de cisteína foram adicionados após 2 h de fermentação e em 7 h foram adicionados 10 mM de ácido glutâmico, 10 mM de glicina e 10 mM de serina. No fermentador de 5 L foram feitas fermentações de batelada alimentada, sendo adicionada solução de vários nutrientes e glicose (60 g/L). Após 6 h de cultivo foram adicionados 2 mM de cisteína e em 35 h de fermentação 10 mM de ácido glutâmico, 10 mM de glicina e 10 mM de serina. Após 44 h de incubação foram obtidas as maiores concentrações celulares e de GSH, sendo estas 133 g/L e 1875 mg/L, respectivamente.

Wen *et al.* (2005) estudaram a otimização da composição de aminoácidos adicionados durante a fermentação para produção de GSH. Foi utilizada *S. cerevisiae* T65 e dois tipos de biorreatores (frascos Erlenmeyer e fermentador de 5 L). Nos frascos Erlenmeyer as condições de agitação, temperatura e tempo foram: 180 rpm, 30°C e 24h, respectivamente. Através de planejamento experimental foi observado que os aminoácidos devem ser adicionados em duas etapas: 2 mM de cisteína após 2 h de fermentação e após 7 h, 10 mM de ácido glutâmico, 18 mM de glicina e 3,35 mM de cisteína. O conteúdo de GSH em massa celular chegou a 1,836%. No fermentador, o pH foi controlado em 5,5 e a temperatura em 30°C. Na fermentação sem adição de aminoácidos a concentração de GSH foi de 170,14 mg/L, enquanto que com a adição de aminoácidos (2 mM após 6 h e 10 mM de ácido glutâmico, 18 mM de glicina e 3,35 mM de cisteína após 12 h) alcançou 329,3 mg/L.

Rollini e Manzoni (2006) avaliaram a influência de alguns parâmetros de fermentação na produção de GSH por *S. cerevisiae* CBS 117. Os parâmetros estudados foram a temperatura (24 ou 30°C), sulfato de amônio (1 ou 5 g/L), sulfato de magnésio (0,2 ou 1,2 g/L) e concentração de açúcar de beterraba (20 ou 80 g/L). As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyer com pH_{inicial} de 5,8, 10% de inóculo e 200 rpm por 24 h. A maior porcentagem de GSH, 1,85% em peso seco, foi observado no ensaio a 24°C com 5 g/L sulfato de amônio, 0,2 g/L sulfato de magnésio e 20 g/L de açúcar. Não foi detectada GSH no sobrenadante das culturas, o que comprovou a sua natureza intracelular. As condições de fermentação que favoreceram o crescimento celular não corresponderam às condições do maior acúmulo de GSH nas células.

Wen *et al.* (2006) maximizaram a produção de GSH em fermentação de batelada alimentada através da adição de glicose e aminoácidos em fermentador de 5 L. Foi utilizada uma cepa de *S. cerevisiae* T65, o pH foi mantido em 5,5 e a temperatura a 30°C. Foram feitas três fermentações controlando por monitoramento dos níveis de etanol no meio e a glicose foi adicionada de acordo com estes níveis. Na primeira os níveis foram mantidos altos (até 7,7%), na segunda entre 1,16 e 2,2% e na terceira entre 0,08 e 0,65%. Verificou-se que os níveis mais baixos favoreceram a produção de GSH. Desta forma foi feita mais uma fermentação mantendo os níveis de etanol baixos e adicionando de aminoácidos (glicina, cisteína e ácido glutâmico) nos tempos de 24, 44 e 56 h. O melhor resultado foi de 2190 mg/L após 60 h de fermentação.

Dong *et al.* (2007) avaliaram o efeito das altas pressões no acúmulo de GSH e trealose em *S. cerevisiae*. O meio de cultivo continha, dentre outros nutrientes, 30 g/L de glicose, concentração de inóculo de 10% (v/v), fermentador de 300 mL (contendo 150 mL de meio) no reator pressurizado, pH_{inicial} 6,0 e temperatura de 30°C. O tempo de cultivo foi de 36 h, sendo que pressões de 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 MPa foram aplicadas por 2 h. Numa etapa posterior pressões de 0,1; 0,5; 1,0 e 1,5 MPa foram aplicadas por tempos de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 e 10 h. A concentração celular apresentou uma dependência com a pressão, sendo que com o aumento da pressão foi observada uma redução das taxas de crescimento. O crescimento celular começou a diminuir após 26 h de cultivo. A morfologia da levedura mudou significativamente com o aumento da pressão comparando-se com os cultivos a pressão atmosférica. O melhor resultado foi observado com pressão de 1,0 MPa por 6 h, permitindo a obtenção de uma concentração de GSH de 103 mg_{GSH}/g_{cél}, valor este 68,8% maior em relação ao cultivo a pressão atmosférica.

Wang *et al.* (2007) utilizando *S. cerevisiae* G14 avaliaram a produção de GSH em frascos Erlenmeyer (250 mL) e em fermentador de 5 L. Nos frascos foram avaliadas as quantidades de aminoácidos adicionados (glicina, ácido glutâmico e cisteína), sendo observado que a maior concentração (530 mg/L) foi obtido na fermentação feita com 4 mM de cada um dos três aminoácidos. No fermentador foi estudado o controle da adição de glicose de acordo com a concentração de etanol e o quociente de respiração, bem como o efeito da adição dos aminoácidos em diferentes tempos de fermentação (0, 16, 32 e 48 h). A adição de glicose iniciou após 10 h de fermentação e no ensaio sem adição de aminoácidos foram obtidas 1620 mg/L de GSH após 52 h de cultivo. No ensaio com adição dos aminoácidos após 32 h de fermentação, a concentração máxima de GSH foi de 2020 mg/L após 38 h de cultivo.

Zhang *et al.* (2007) otimizaram o meio de cultivo para a produção de GSH utilizando *S. cerevisiae* T65. Os ensaios foram feitos em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 25 mL de meio. As condições de cultivo foram 30°C, 180 rpm, 24 h e 20% de inóculo. O meio otimizado continha: glicose (70 g/L), extrato de levedura (3 g/L), peptona (5 g/L), extrato de malte (70 g/L), melaço (20 g/L), MgSO₄ (5,6 g/L), ZnSO₄ (16 mg/L), (NH₄)₂HPO₄ (7 g/L) e tiamina (0,2 mg/L). A concentração de glutatona chegou a 74,6 mg/L, que foi 1,81 vezes maior que o ensaio controle.

2.2.2 Fermentação Utilizando Meios Protéicos

Nos últimos anos houve um incremento na procura de meios fermentativos mais econômicos e ricos em nutrientes para utilização em escala industrial, na produção de uma grande variedade de substâncias tais como solventes (PAREKH *et al.*, 1999), enzimas (LIMA *et al.*, 2005), antibióticos (YANG, 2001) e peptídeos (VERSTRAETE *et al.*, 2003). Dentre essas fontes nutricionais pode-se citar a proteína do soro de leite e a água de maceração de milho.

Verstraete *et al.* (2003) estudaram a produção de peptídeos que possuem atividade inibitória da enzima angiotensin-I-converting (ACE), causadora da hipertensão em seres humanos. Essa enzima, por sua vez, é obtida por fermentação das proteínas do soro de leite e grão de bico com a cultura mista de *Lactobacillus helveticus* e *Saccharomyces Cerevisiae*. O efeito sinérgico destes microrganismos é freqüentemente aproveitado na produção de alimentos funcionais (ABUBAKAR, 1998; GOBBETTI *et al.*, 2000; VILJOEN, 2001)..

Segundo Verstraete *et al.* (2003) e Walker (1998) as *Saccharomyces cerevisiae* não possuem proteases e peptidases extracelulares que permitem o rompimento das proteínas mais complexas no meio fermentativo. Essa característica é particularmente tecno-funcional, uma vez que facilita a degradação das proteínas complexas pela liberação destas proteases depois da lise celular (MEISEL e BOCKELMANN, 1999).

O poder proteolítico da *Saccharomyces cerevisiae* é equiparável ao do *Lactobacillus helveticus*, mas não influi na hidrólise de proteínas já que as proteases desta levedura ajudam na síntese de pequenos peptídeos e aminoácidos livres no meio fermentativo (VERSTRAETE *et al.*, 2003; WALKER, 1998), o que poderia ajudar na síntese de outras biomoléculas.

Didelot *et al.* (2006) estudaram a produção de peptídeos por fermentação aeróbia e anaeróbia a partir das proteínas do soro de leite (α - lactoalbumina e β - lactoglobulinas) utilizando *Candida parapsilosis* e *Lactobacillus paracasei*. Durante a fermentação foi observada queda no pH devido à presença de ácido láctico, que ativou as proteases liberadas pela *Candida parapsilosis* e hidrolisaram as α -lactoalbumina, aumentando a produção de peptídeos em valores de pH 3,5 e tempo de fermentação de 96 h.

A água de maceração de milho representa uma fonte rica e econômica de vitaminas, sais e aminoácidos o que favorece sua utilização nos processos de biotransformação. Segundo Lee *et al.* (2003a), a produção de ácido succínico por *Manheimia succiniciproducens* com água de maceração de milho foi de 4,2 g/L, a mesma obtida tendo triptona como fonte protéica.

Argawal *et al.* (2006) estudaram o efeito da água de maceração de milho como única fonte de nitrogênio na produção de ácido succínico por *Escherichia coli*. Obteve-se um baixo crescimento do microrganismo e baixa produção deste composto na fermentação que utilizou unicamente o subproduto de milho, sendo que a adição de extrato de levedura elevou de maneira significativa o crescimento da *E. coli* e produção do ácido succínico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado para produção de glutathiona (GSH) foi a *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754, obtido junto à Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello (Campinas-SP). Para a manutenção da cepa foi usado ágar inclinado com o meio YM (yeast extract – malt extract) e os tubos foram mantidos sob refrigeração (4°C). A Tabela 1 apresenta a composição do meio YM.

Tabela 1 – Composição do meio YM usado na manutenção da cepa e no preparo do inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754.

Composto	Concentração (g/L)
Glicose	10,0
Peptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
Extrato de malte	3,0
Ágar	20,0

3.2 PREPARO DE INÓCULO

A fermentação para a obtenção do inóculo foi feita em shaker (Marconi, mod. MA 830), sendo utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio YM sem ágar (Tabela 1), esterilizados a 121°C por 15 min. As condições de cultivo para o preparo do inóculo foram 30°C e 150 rpm por 24 h. A concentração celular do inóculo em massa seca variou entre 1,4 e 1,5 g/L.

3.3 FERMENTAÇÕES EM FRASCOS ERLLENMEYER

As fermentações foram realizadas em shaker (Marconi, mod. MA 830) sendo utilizados frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio de fermentação (30 mL de meio protéico + 17,5 mL de solução de glicose + 2,5 mL de inóculo). Antes da esterilização o pH do meio foi ajustado para 5,0 com NaOH 2 N sendo esterilizados o meio protéico e a glicose em separado para evitar caramelização. O processo fermentativo se desenvolveu a 20°C e 300 rpm durante 96 h e as amostras foram retiradas no intervalo de 0, 24, 48, 72 e 96 h.

3.4 ESTUDO DO MEIO DE FERMENTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DE GLUTATIONA

Para avaliação das variáveis que formam parte do processo fermentativo foi empregado um planejamento fatorial através do planejamento experimental. Para a análise dos dados dos planejamentos fatoriais fracionados foi utilizado o programa STATISTICA versão 5.0.

3.4.1 Seleção das Variáveis Importantes do Processo.

Numa primeira parte do trabalho foi realizado um delineamento fatorial fracionado (FF) 2^{5-1} com triplicata no ponto central, sendo estudadas as seguintes variáveis: de concentração de: glicose (GLI), de água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL), lecitina (LEC) e proteína de soro de queijo (PS). Nas tabelas 2 e 3 são mostrados os níveis experimentais das variáveis independentes e a matriz com os valores codificados para cada variável do planejamento fatorial fracionado.

Tabela 2 – Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

Variáveis / Níveis	-1	0	+1
Glicose (g/L)	10	54	98
AMM (g/L)	10	50	90
EL. (g/L)	10	50	90
LEC (mM)	3	6	9
PS (g/L)	10	50	90

** EL- extrato de levedura; LEC- lecitina; PS-proteína de soro de queijo; AMM- Água de maceração de milho.

Tabela 3 – Matriz dos ensaios gerada para o planejamento fatorial fracionado (FF) 2^{5-1} .

Ensaio	Glicose	AMM	EL	LEC	PS
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1
12	1	1	-1	1	-1
13	-1	-1	1	1	1
14	1	-1	1	1	-1
15	-1	1	1	1	-1
16	1	1	1	1	1
17	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0

** EL- extrato de levedura; LEC- lecitina; PS-proteína de soro de queijo; AMM- Água de maceração de milho.

Com base na análise dos resultados do FF, verificou-se a necessidade de se realizar outro planejamento para redefinir as variáveis e seus níveis de estudo. Devido a este fato, foi feito um segundo delineamento Plackett-Burman (PB-12) neste adicionou-se uma nova variável, a concentração de $MgSO_4$, passando de 5 para 6 o número de variáveis estudadas, totalizando 15 ensaios, dos quais 12 foram ensaios distintos e três pontos centrais. É importante ressaltar que durante a realização dos próximos planejamentos foi considerado os valores da concentração celular obtida, a fim de analisar sua relação com a produção da glutatona. Nas tabelas 4 e 5 são apresentados os ensaios gerados pelo delineamento PB-12 e os níveis estudados.

Tabela 4 – Variáveis e níveis utilizados no primeiro planejamento PB-12.

Variáveis / Níveis	-1	0	+1
Glicose (g/L)	30	60	90
AMM (g/L)	30	60	90
EL (g/L)	1	5,5	10
LEC (mM)	2	3,5	5
PS (g/L)	10	30	50
MgSO ₄ (g/L)	2	6	10

** EL- extrato de levedura; LEC- lecitina; PS-proteína de soro de queijo; AMM- Água de maceração de milho.

Tabela 5 – Matriz dos ensaios gerada para o primeiro PB-12.

Ensaios	Glicose	AMM	EL	LEC	PS	MgSO₄
1	1	-1	1	-1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1	-1
3	-1	1	1	-1	1	-1
4	1	-1	1	1	-1	1
5	1	1	-1	1	1	-1
6	1	1	1	-1	1	1
7	-1	1	1	1	-1	1
8	-1	-1	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1	1	1
10	1	-1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0

** EL- extrato de levedura; LEC- lecitina; PS-proteína de soro de queijo; AMM- Água de maceração de milho.

Em seguida foi realizado outro planejamento (PB-12) com 5 variáveis para determinar o grau de inferência estatística na obtenção do tripeptídeo. Os valores codificados do planejamento e os níveis experimentais das variáveis podem ser encontrados nas tabelas 6 e 7.

Tabela 6 – Matriz dos ensaios gerada para o segundo PB-12.

Ensaio	Glicose	AMM	EL	LEC	MgSO ₄
1	1	-1	1	-1	-1
2	1	1	-1	1	-1
3	-1	1	1	-1	1
4	1	-1	1	1	-1
5	1	1	-1	1	1
6	1	1	1	-1	1
7	-1	1	1	1	-1
8	-1	-1	1	1	1
9	-1	-1	-1	1	1
10	1	-1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	-1	-1
12	-1	-1	-1	-1	-1
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0

** EL - extrato de levedura; LEC - lecitina; PS - proteína de soro de queijo; AMM - Água de maceração de milho.

Tabela 7 – Variáveis e níveis utilizados no segundo planejamento PB-12.

Variáveis / Níveis	-1	0	+1
Glicose (g/L)	60	90	120
AMM (g/L)	30	50	70
EL. (g/L)	0	2	4
LEC (mM)	0	0,25	0,5
MgSO ₄ (g/L)	0	1	2

** EL - extrato de levedura; LEC - lecitina; PS - proteína de soro de queijo; AMM - Água de maceração de milho.

3.5 METODOLOGIA ANALÍTICA

3.5.1 Determinação da Concentração de Biomassa

Alíquotas de 5 mL foram centrifugadas a 4016 rpm por 20 min; o sobrenadante foi descartado e a biomassa lavada com água destilada. Esta operação era repetida duas vezes, seguida de secagem em estufa a vácuo a 60 °C até peso constante, sendo determinada a quantidade de massa celular por método gravimétrico.

3.5.2 Determinação de pH

A determinação de pH de cada amostra foi feita através de medida direta por potenciômetro Digimed (Mod. DM 20 μ P).

3.5.3 Precipitação da Proteína de Soro de Leite

O soro de queijo desidratado (ALIBRA Ingredientes Ltda., Campinas, SP) antes de ser usado passou por um processo de extração de proteína. A solução de soro de queijo com 15% (p/v) foi acidificada até pH 4,3 e aquecida até ebulição, resfriada e filtrada, descartando-se o sobrenadante (OGRODOWSKI, 2006).

3.5.4 Determinação da Concentração de Glutathiona

Para a determinação de GSH foi utilizado o método de Owens e Belcher (1965). O meio fermentado foi centrifugado e o sobrenadante separado das células. Uma solução de etanol 40% (v/v) foi adicionada às células e feita a extração por 2 h a 30°C. Em 0,5 mL de amostra foram adicionados 1,5 mL de tampão fosfato de potássio (0,5 M; pH 8,0) e 0,03 mL de DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid). Após 3 min de reação foi feita a leitura em espectrofotômetro HACH (Mod. DR/4000U) a 412 nm. Paralelamente foi feito o branco da reação utilizando a solução de etanol 40% (v/v). A quantidade de GSH foi calculada através de uma curva padrão, sendo utilizada L-glutathiona reduzida (Fluka, Japão). Os resultados foram expressos em mg/L.

A solução de GSH foi preparada dissolvendo-se 0,01 g em HCl 0,01 N (resfriado) até o volume de 100 mL. Para o preparo da solução de DTNB, 0,396 g deste reagente e 0,15 g de NaHCO_3 foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0). O volume foi ajustado para 100 mL e a solução mantida congelada até o momento do uso.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram definidas as variáveis mais significativas do processo para a produção de glutathiona (GSH) e biomassa, utilizando ferramentas estatísticas como planejamento fatorial fracionado e Plackett Burman, conforme delineamento experimental apresentado nas Tabelas 3, 5 e 6.

4.1 PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONADO 2^{5-1}

4.1.1 Análise estatística dos resultados para GSH em 72 h

O planejamento fatorial fracionado (2^{5-1}) foi utilizado para avaliar as variáveis glicose (GLI), água de maceração de milho (AMM), extrato de levedura (EL), lecitina (LEC) e proteína de soro de queijo (PS) obtendo como resposta a produção de GSH em 72 e 96 h.

Os resultados apresentados na Tabela 8 mostram que, tanto para 72 h como para 96h de fermentação, as concentrações de glutathiona atingiram valores máximos nos pontos centrais para 96 h, apresentando os seguintes valores: 264,49 mg/L, 238,31 mg/L e 235,06 mg/L em 96h de fermentação e 192,89 mg/L, 176,22 mg/L e 180,56 mg/L para 72 h de fermentação. Observou-se que de 72 h para 96 h, com exceção dos ensaios 3, 4, 5 e 13, nos demais ensaios ocorreu aumento na produção de glutathiona, destacando-se o incremento de aproximadamente 61% observado no ensaio 8. A Tabela 17 do apêndice mostra os dados de concentração de GSH durante toda a fermentação

A Tabela 9 apresenta os valores dos efeitos estimados das variáveis estudadas para obtenção de glutathiona para o tempo de 72 h de fermentação. Os parâmetros com asterisco são estatisticamente significativos ao intervalo de 90% de confiança, que foi escolhido por se tratar de um processo de seleção de variáveis.

Tabela 8 – Concentração da glutatona (mg/L) produzida pela *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 em 72h e 96h de fermentação.

Ensaio	72 h	96 h
1	101,77	107,86
2	177,19	192,43
3	119,36	40,80
4	164,27	137,17
5	177,13	139,60
6	81,30	100,71
7	104,59	137,93
8	94,16	151,40
9	68,33	77,06
10	138,46	189,01
11	110,91	129,94
12	107,63	135,42
13	144,93	127,35
14	141,96	175,76
15	131,69	166,02
16	102,53	157,57
17	192,89	264,49
18	176,22	238,31
19	180,56	235,06

Tabela 9 – Valores dos efeitos para a glutathiona produzida pela *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 para 72 h de cultivo.

Fator**	Efeito	Erro Padrão	t (12)	p
Média*	122,89	8,74	14,06	0,00
Curvatura*	120,67	44,01	2,74	0,02
Glicose (g/L)	6,10	17,49	0,35	0,73
AMM (g/L)	-11,99	17,49	-0,69	0,51
EL (g/L)	-1,20	17,49	-0,07	0,95
LEC (mM)	-9,17	17,49	-0,52	0,61
PS (g/L)	-8,59	17,49	-0,49	0,63

$R^2 = 0,41837$.

* Fatores estatisticamente significativos (90% de confiança)

** EL - extrato de levedura; LEC - lecitina; PS - proteína de soro de queijo; AMM - Água de maceração de milho.

Analisando-se os resultados da Tabela 9, que estão sob a forma de efeitos estatísticos, observa-se que todas as variáveis não apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p < 0,10$), para o qual se teve que comprovar a curvatura devido a que a maior produção se obteve nos pontos centrais.

Apesar de nenhuma variável ser estatisticamente significativa verificou-se um incremento na produção de glutathiona quando comparado com o encontrado por SANTOS *et al.* (2007).

4.1.2 Interpretação dos resultados da fermentação em 96 h

A Tabela 10, apresentada abaixo, informa os valores dos efeitos estimados das variáveis estudadas para o tempo de 96 h de fermentação. Os parâmetros com asterisco são estatisticamente significativos ao nível de 90% de confiança.

Tabela 10 – Valores dos efeitos no planejamento (FF) 2^{5-1} para a glutathiona produzida pela *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 para 96 h de fermentação.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t (12)	P
Média*	135,38	8,94	15,14	0,00
Curvatura*	221,15	44,99	4,91	0,00
Glicose (g/L)*	39,11	17,88	2,19	0,05
AMM (g/L)	-6,70	17,88	-0,37	0,71
EL (g/L)	18,33	17,88	1,02	0,32
LEC (mM)	18,77	17,88	1,05	0,31
PS (g/L)	1,13	17,88	0,06	0,95

$R^2 = 0,72256$

* Fatores estatisticamente significativos (90% de confiança)

** EL - extrato de levedura; LEC - lecitina; PS - proteína de soro de queijo; AMM - Água de maceração de milho

De acordo com a Tabela 10, a produção de GSH foi afetada somente pela concentração de glicose ($p=0,05$), que levou a uma maior produção deste composto com o aumento foi significativo, apesar de ter apresentado melhor resultado no ponto central 0, que corresponde a uma concentração inicial de 54 g/L, mesmo resultado alcançado por SANTOS *et al.* (2007).

Portanto, para o planejamento Plackett-Burman (PB-12), na seqüência do trabalho, os níveis da glicose foram aumentados e o das outras variáveis reduzidas para melhorar a viabilidade econômica pelo custo elevado do extrato de levedura e evitar a saturação do meio. Foi adicionada, ainda, a variável $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, devido a sua influência no desenvolvimento celular e na síntese de GSH observada no trabalho de ZHANG *et al.* (2007).

4.2 PRIMEIRO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN DE 12 ENSAIOS PB (12)

Após o planejamento fatorial fracionado (FF), considerou-se procedente realizar um planejamento Plackett Burman de 12 ensaios + 3 pontos centrais (Tabela 4), no qual os níveis das variáveis glicose, água de maceração de milho, extrato de levedura, lecitina e proteína de soro de leite e concentração de $MgSO_4$ foram redefinidos após a realização do planejamento

fatorial fracionado, que demonstrou que com a exceção da glicose e do MgSO_4 os demais níveis dos nutrientes deveriam ser reduzidos.

Os resultados obtidos nos ensaios de 1 ao 15 para produção de GSH e massa celular estão apresentados na Tabela 11 e na Figura 4, que mostram as concentrações em relação ao tempo de fermentação.

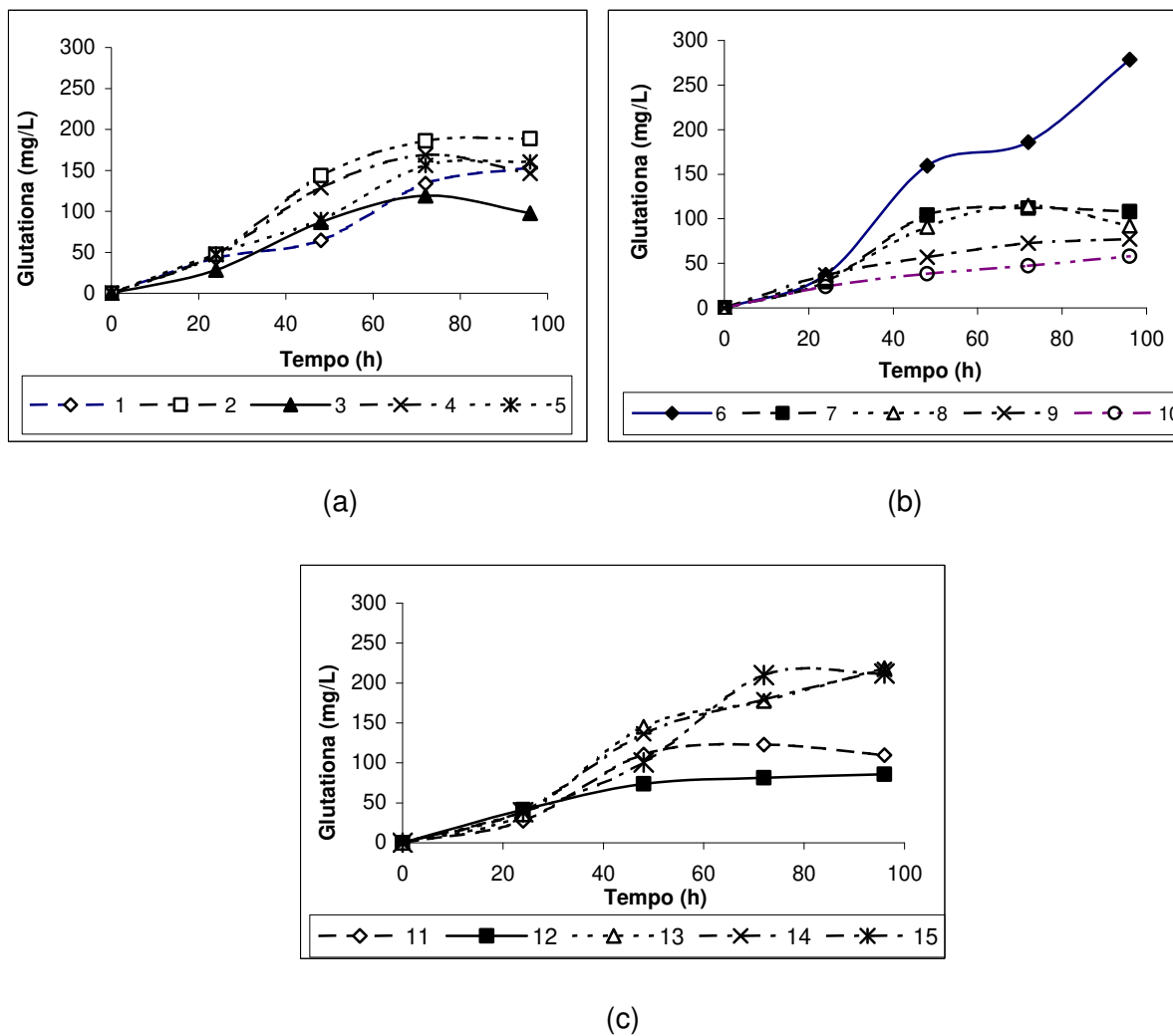


Figura 4 – Produção de glutathione (mg/L) durante o planejamento fatorial PB-12. (a) ensaios 1 e 5 (b) ensaios 6 a 10 (c) ensaios 11 a 15.

Ao se analisar a Figura 4 nota-se que, conforme a composição dos meios de cultivo foi variada, as quantidades de GSH alteraram de 47,05 mg/L a 209,85 mg/L e de 77,19 mg/L a 278,42 mg/L em 72 e 96 h, respectivamente. Nesse estudo de seleção dos componentes do meio de cultivo, o incremento na quantidade de GSH de 72 para 96 h para o meio 6 foi de 50%, o maior observado nesses ensaios, representando um incremento de 80% em relação ao trabalho de SANTOS *et al.* (2007) e de 37% em respeito ao encontrado por CHA *et al.* (2004).

Tabela 11 – Concentrações de GSH (mg/L) e massa celular seca (MCS) (g/L).

Ensaio	24h		48h		72h		96h	
	GSH	MCS	GSH	MCS	GSH	MCS	GSH	MCS
1	42,72	13,79	64,70	15,90	134,00	21,53	153,24	20,17
2	47,34	16,93	143,55	19,62	186,02	18,63	188,65	23,81
3	28,41	17,35	86,75	21,48	118,92	18,63	97,54	24,05
4	47,16	14,35	128,60	14,75	168,68	20,81	146,25	19,61
5	47,89	23,41	89,94	26,95	156,12	27,77	160,28	27,4
6	37,05	17,71	159,49	23,01	185,85	24,27	278,42	23,33
7	29,26	11,13	103,92	14,23	111,81	18,91	108,01	18,87
8	33,35	15,15	90,92	17,95	114,75	17,51	92,21	16,59
9	36,84	16,81	56,97	17,89	72,66	18,11	77,19	18,91
10	23,89	11,87	38,27	12,83	47,05	16,36	58,01	16,15
11	27,59	10,50	110,40	13,41	122,84	14,69	109,61	14,89
12	41,34	7,22	73,77	8,45	81,36	9,58	85,83	9,47
13	35,56	18,51	145,27	20,97	177,68	25,41	218,45	23,93
14	39,97	19,16	136,26	22,87	179,15	24,53	217,14	23,29
15	38,46	18,67	100,66	21,99	209,85	26,21	211,83	23,81

Os resultados apresentados na Tabela 11 e nas figuras 5 e 6 (apêndice) mostram que até o tempo 24 h a levedura encontrava-se na fase exponencial de crescimento. Após este período até 72 h, nos ensaios com maior produção do tripeptídeo, a levedura encontrava-se na fase estacionária, como observado na maioria dos ensaios e como observaram Wen *et al.* (2005), que ao estudarem a produção de GSH pela *S. cerevisiae* T65, verificaram que esta produz e armazena o GSH depois de 24h, quando entra na fase estacionária.

As leveduras produzem GSH para reagir contra os agentes oxidantes presentes ou liberados ao meio na fase de crescimento, tendo a capacidade de assimilar peptídeos e aminoácidos que utilizam para reparar danos celulares e sintetizar novas substâncias (WITTRUP e BANNISTER, 2000).

Entretanto, nos ensaios 6, 13, 14 e 15 o aumento da produção de glutatona ocorreu entre as 72 e 96 h durante a fase de morte celular, como verificado na Tabela 11, possivelmente devido à liberação das endoproteínases da *Saccharomyces cerevisiae* por lise celular, que hidrolisam as proteínas e pequenos peptídeos liberando aminoácidos no meio como observaram Meisel & Bockelmann (1999) e Verstraete *et al.* (2003). Isto pode ser verificado através da queda do pH pela liberação de aminoácidos como mostra a FIGURA 5 de pH e o gráfico 6 de concentração celular apresentado no apêndice.

Cha *et al.* (2004) estudaram a otimização do meio para a produção de glutatona utilizando *S. cerevisiae* FF-8 e obtiveram o máximo de 200,4 mg GSH/L e 8,28 g/L de massa celular em 72h utilizando 3% de glicose, 3% extrato de levedura, 0,06% KH_2PO_4 e 0,06% de cisteína. Entretanto, no Laboratório de Tratamento de Resíduos (FEA-UNICAMP) estudou-se o efeito de outras fontes protéicas (AMM e proteína de soro de queijo), obtendo 209,85 mg/L de GSH e 26,21 g/L de biomassa no ensaio 15 em 72h e 278,42 mg/L de GSH e 23,33 g/L de biomassa no ensaio 6 em 96h.

A diferença na produção de biomassa e GSH deste trabalho comparado com os trabalhos de CHA *et al.* (2004), no qual obteve 8,28 g/L de massa celular seca e 204 mg/L de GSH, e de SANTOS *et al.* (2007), que obteve 154,5 mg/L de GSH e 9,1g/L de massa celular seca, se deve ao estímulo no crescimento celular pelo meio de cultura formulado, ao invés do aumento no conteúdo intracelular observado nos trabalhos anteriores, como no de Wen *et al.* (2004), que, por meio do fornecimento de aminoácidos e fontes alternativas de nitrogênio, aumentaram o conteúdo de glutatona com uma baixa concentração celular.

Os valores de produtividade máxima e rendimento de glutatona se encontram na Tabela 18 (apêndice) e mostram que a máxima produtividade foi atingida em 96 h pelo meio 6, que foi de 2,90 mg/L.h.

A partir dos resultados experimentais (Tabela 11) foram calculados os efeitos das variáveis apresentados na Tabela 12. O aumento do nível da glicose de 30 a 90 g/L e da água de maceração de milho de 10 a 50 g/L apresentou um aumento significativo na produção de GSH; no entanto, as concentrações de EL, LEC, PS e MgSO_4 não foram estatisticamente significativas na faixa estudada.

Os resultados da análise estatística são apresentados nas Tabelas 12 e 13, onde são apresentados os valores dos efeitos estimados pela comprovação da curvatura tanto para a concentração de glutathione como para a de massa celular seca.

Tabela 12 – Valores dos efeitos no planejamento PB-12 para a glutathione produzida pela *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 para 96 h de fermentação.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t (7)	p
Média*	129,60	12,85	10,09	0,00
Curvatura*	172,41	57,45	3,00	0,02
Glicose (g/L)*	69,08	25,69	2,69	0,03
AMM (g/L)*	54,96	25,69	2,14	0,07
EL (g/L)	32,68	25,69	1,27	0,24
LEC (mM)	-1,68	25,69	-0,07	0,95
PS (g/L)	-4,66	25,69	-0,18	0,86
MgSO_4 (g/L)	-0,04	25,69	0,00	1,00

$R^2 = 0,76247$

* Fatores estatisticamente significativos (90% de confiança)

** EL - extrato de levedura; LEC - lecitina; PS - proteína de soro de queijo; AMM - Água de maceração de milho

Na Tabela 13 estão os efeitos das variáveis no crescimento celular da levedura. Observa-se que, assim como verificado em 72 h na Tabela 11, a glicose e a AMM apresentam o efeito mais significativo quando passam de 30 a 90 g/L e de 10 a 50 g/L, respectivamente, como no ensaio 6. Na Tabela 11 pode-se verificar que todos os ensaios realizados a baixas concentrações destas variáveis mostraram baixa produção de biomassa e que no ponto central as condições foram adequadas, uma vez que a quantidade de biomassa e GSH produzidas foram elevadas.

Tabela 13 – Valores dos efeitos no planejamento PB-12 para a biomassa produzida para 96 h de fermentação.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t (7)	p
Média*	19,09	0,59	32,56	0
Curvatura*	9,18	2,62	3,50	0,01
Glicose (g/L)*	4,78	1,17	4,08	0,00
AMM (g/L)*	4,94	1,17	4,21	0,00
EL (g/L)	1,44	1,17	1,23	0,26
LEC (mM)*	3,02	1,17	2,58	0,04
PS (g/L)*	3,12	1,17	2,66	0,03
MgSO ₄ (g/L)	-1,32	1,17	-1,12	0,30

R² = 0,90013

* Fatores estatisticamente significativos (90% de confiança)

** EL - extrato de levedura; LEC - lecitina; PS - proteína de soro de queijo; AMM - Água de maceração de milho

A proteína de soro (PS), por sua vez, favoreceu o crescimento da levedura, mas não apresentou efeito significativo ($p=0,86$) na síntese de GSH. Sendo assim, nos ensaios que se seguiram, a concentração da PS foi fixada em 30 g/L, concentração dos pontos centrais.

A lecitina por sua vez, apresentou efeito significativo na obtenção de biomassa, possivelmente, como discutiu Duarte *et al.* (1996), porque a lecitina apresenta um efeito protetor de levedura frente ao etanol pelo enriquecimento lipídico da membrana plasmática, evitando inibição do crescimento celular, apesar de seu efeito na concentração de glutatona não ter sido estatisticamente significativo.

O MgSO₄ e o extrato de levedura não apresentaram efeito significativo nas faixas estudadas, possivelmente pela presença de compostos sulfurosos e magnésio na água de maceração de milho, já que o excesso de SO₄⁻² é incorporado pela levedura na produção de GSH e o magnésio como cofactor. Portanto, decidiu-se estudar uma nova faixa dos componentes do meio de fermentação à exceção da proteína do soro de queijo.

4.3 SEGUNDO PLANEJAMENTO PLACKETT-BURMAN DE 12 ENSAIOS PB (12)

Dando continuidade ao estudo da seleção do meio de produção, foi realizado outro planejamento Plackett-Burman (PB-12), com as mesmas variáveis a exceção da proteína de soro de queijo que foi retirada para avaliar sua interação em concentrações baixas, incluindo meio isento deste componente.

Os resultados das fermentações em 72 e 96 h, para este planejamento, estão listados na Tabela 14. A análise do planejamento foi realizada no tempo de fermentação de 96 h, sendo que esses resultados variaram de 33,2 mg/L a 166,84 mg/L para a concentração de GSH e de 13,96 g/L a 31,52 g/L para o teor de biomassa.

Tabela 14 – Concentrações de GSH (mg/L) e massa celular seca (MCS) (g/L).

Ensaio	24h		48h		72h		96h	
	GSH	MCS	GSH	MCS	GSH	MCS	GSH	MCS
1	69,13	22,47	68,21	21,05	72,67	19,97	120,51	18,53
2	35,80	24,81	69,93	25,75	75,45	26,51	147,90	27,50
3	54,80	21,27	195,39	23,67	183,63	27,20	140,12	25,53
4	65,74	22,17	91,78	20,03	81,73	20,60	73,95	19,96
5	53,94	29,15	102,68	26,87	180,63	20,60	149,74	19,52
6	58,68	24,67	61,29	28,38	123,95	30,06	164,82	31,52
7	36,45	27,51	50,00	27,26	85,40	30,64	96,31	29,88
8	50,42	19,79	85,16	19,65	154,89	19,08	166,84	18,75
9	55,90	15,09	58,27	13,22	54,21	15,10	33,20	14,89
10	55,37	16,97	53,55	14,22	52,22	15,73	36,51	13,96
11	44,95	12,90	85,59	20,67	176,76	23,52	125,23	21,85
12	63,21	19,85	63,11	11,16	58,94	23,52	41,59	17,61
13	74,89	16,65	174,44	18,57	179,31	20,18	97,66	19,93
14	70,52	18,79	161,63	19,98	166,57	20,35	106,36	20,03
15	68,32	20,51	170,58	19,29	172,45	21,25	101,83	19,86

Os níveis de concentração da glicose estudados no meio de fermentação foram deslocados para valores superiores e para o resto dos nutrientes, para os níveis inferiores conforme indicou a análise das respostas do primeiro planejamento Plackett-Burman. Esses resultados são apresentados na Tabela 15.

Analisando-se os efeitos estatísticos da Tabela 15, observa-se que, com exceção da água de maceração de milho, todas as outras variáveis não apresentaram efeito significativo ($p < 0,1$). Todavia, o extrato de levedura por seu p-valor estar perto do valor de significância e por sua importância nutricional, pode ser levado em conta como variável significativa.

Tabela 15 – Valores dos efeitos no planejamento PB-12 para produção de glutatona pela *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 em 96 h de fermentação.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t (8)	P
Média*	108,06	11,13	9,71	0,00
Curvatura*	-12,22	49,79	-0,25	0,81
Glicose (g/L)	15,02	22,27	0,67	0,52
AMM (g/L)*	58,59	22,27	2,63	0,03
EL (g/L)	38,06	22,27	1,71	0,13
LEC (mM)	6,53	22,27	0,29	0,78
MgSO ₄ (g/L)	14,29	22,27	0,64	0,54

$R^2 = 0,57579$

* Fatores estatisticamente significativos (90% de confiança)

** EL- extrato de levedura; LEC- lecitina; AMM- Água de maceração de mil

Os valores de produtividade máxima e rendimento de glutatona são mostrados na Tabela 19 (apêndice). O valor máximo obtido foi 4,07 mg/L.h em 48 h no meio 3.

Tabela 16 – Valores dos efeitos no planejamento PB-12 para produção de biomassa produzida pela *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 em 96 h de fermentação.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t (8)	p
Média*	20,54	1,08	18,97	0
Curvatura	-1,20	4,84	-0,25	0,81
Glicose (g/L)	2,58	2,17	1,19	0,27
AMM (g/L)*	10,85	2,17	5,01	0,00
EL (g/L)*	6,97	2,17	3,22	0,01
LEC (mM)	-1,92	2,17	-0,89	0,40
MgSO ₄ (g/L)*	-4,03	2,17	-1,86	0,10

$R^2 = 0,83743$

* Fatores estatisticamente significativos (90% de confiança)

** EL - extrato de levedura; LEC - lecitina; PS - proteína de soro de queijo; AMM - Água de maceração de milho

A água de maceração de milho foi a única variável que apresentou significância ($p < 0,1$), apresentando o melhor resultado para a concentração de GSH no nível superior, seguida do extrato de levedura também no mesmo nível, enquanto o MgSO₄ indicou que um incremento na concentração do MgSO₄ leva um decréscimo na concentração celular. Portanto se poderia suprimir este sal já que não tem nenhum efeito na síntese de GSH, e na e na formação de biomassa sua presença leva a um decréscimo na concentração. O resultado contrariaria o relato de Zhang *et al.* (2007), possivelmente por que AMM fornece alguns minerais e vitaminas que substituem o magnésio como cofator.

A maior produção de GSH obtida neste planejamento foi 166,84 mg/L, o que representa redução de 40% quando comparado ao ensaio de maior produção do planejamento anterior (278,42 mg/L). A biomassa mostrou redução do 20% passando de 23,23 g/L a 18,75 g/L, o que mostra o efeito sinérgico entre AMM e extrato de levedura como reportou (ARGAWAL *et al.* (2006), LEE *et al.* (2000)). Entretanto a tendência reportada no planejamento anterior PB-12 de lise celular, queda de pH e incremento de GSH foi observada neste planejamento, como pode ser visto nos gráficos das figuras 7 (pH) e 8 (concentração celular) apresentados no apêndice.

A glicose não mostrou significância estatística, podendo-se utilizar qualquer concentração entre 60 e 120 g/L, sendo esta faixa maior que os valores utilizados por Liu *et al.* (1999) e Wen *et al.* (2004), (6,27% e 32 g/L, respectivamente). Os meios desenvolvidos pelos autores anteriores são mais caros devido à adição de aminoácidos e fontes de nitrogênio mais complexas como peptona, ácido glutâmico, glicina e serina, enquanto o presente trabalho utilizou subprodutos e produtos agroindustriais de baixo custo como fontes nutricionais para a obtenção de GSH.

5. CONCLUSÕES

O cultivo de *Saccharomyces* enriquecido com fontes protéicas (água de maceração de milho e proteína de soro de queijo) permitiu aumentar a produção de glutatona, contudo apenas a água de maceração de milho apresentou efeito positivo.

A presença de extrato de levedura e lecitina em algumas concentrações estudadas foi estatisticamente significativa durante a produção de glutatona e de biomassa.

A presença de sulfato de magnésio foi estatisticamente significativa na produção de biomassa, porém apresentou um efeito negativo, ou seja, diminuindo as concentrações deste sal, leva a um aumento na concentração de biomassa. Em relação a produção de glutatona este sal não apresentou efeito estatisticamente significativo.

A maior concentração de glutatona obtida foi de 278,4 mg/L, após 96 h, no meio de fermentação que continha 90 g/L de glicose, 50 g/L de água de maceração de milho, 10 g/L de extrato de levedura, 5 mM de lecitina, 50 g/L de soro de queijo e 10 g/L de sulfato de magnésio.

No ensaio com 120 g/L de glicose, 70 g/L de água de maceração de milho, 4 g/L de extrato de levedura, 30 g/L de soro de queijo e 2 g/L de sulfato de magnésio foi encontrada a maior concentração de biomassa de 31,5 g/L após 96 h.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar a produção de glutathione por outras leveduras usando glicose, sacarose e melaço de cana como fontes de carbono;

- Estudar a produção de glutathione utilizando a proteína de soro de queijo tratada com protease;
- Obter cepas mutantes de leveduras para testar na produção de glutathione;
- Estudar a produção de glutathione em air-lift pressurizado e batelada alimentada.
- Realizar um delineamento composto central rotacional 2^3 com as variáveis: água de maceração de milho, glicose e extrato de levedura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUBAKAR, A.; SAITO, T.; KITAZAWA, H.; KAWAI, Y.; ITOH, T. Structural analysis antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. **Journal of Dairy Science**, v.81, n. 12, p. 3131-3138, 1998.
- ALFAFARA, C. G.; KANDA, A.; SHIOI, T.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S.; SUGA K. Effect of amino acids on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 538-540, 1992a.
- ALFAFARA, C.; MIURA, K.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S.; SUGA K. Cysteine addition strategy for maximum glutathione production in fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 141-146, 1992b.
- BAUER, W. A comparison between a conventional submerged culture fermenter and a new concept gas/solid fluid bed bioreactor for glutathione production. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 64, n. 4, p. 561-566, 1986.
- CHA, J.; PARK J.; JEON, B.; LEE, Y.; CHO, Y. Optimal fermentation conditions for enhanced glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae* FF-8. **The Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 51-55, 2004.
- DIDELOT, S.; BORDENAVE-JUCHEREAU, S.; ROSENFELD, E.; PIOT, J.; SANNIER, F. Peptides released from acid goat whey by a yeast-lactobacillus association isolated from cheese microflora. **Journal of Dairy Research**, v. 73, n.2, p. 163-170, 2006.
- DONG, Y.; YANG, Q.; JIA, S.; QIAO, C. Effects of high pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 2, p. 226-230, 2007
- DUARTE, M.; SERZEDELLO,A.; SERRA, G.; LEITE DE OLIVEIRA, M.; PONEZI, A.; SARTORATTO, A. Effect of lecithin and soy oil on the fermentative performance of *Saccharomyces uvarum* IZ 1904. **Revista de Microbiologia**, vol. 27, n. 4, p. 255-262, 1996.
- ELSKENS, M. T.; JASPERS, C. J.; PENNINGKX, M. J. Glutathione as an endogenous sulphur source in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v. 137, n. 3, p. 637-644, 1991.
- FAHEY, R. C.; BROWN, W. C.; ADAMS, W. B.; WORSHAM, M. B. Occurrence of glutathione in bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 133, n. 3, p. 1126-1129, 1978.

- FAN, X.; HE, X.; GUO, X.; QU, N.; WANG, C.; ZHANG, B. Increasing glutathione formation by functional expression of the γ -glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 5, p. 415-417, 2004.
- FERNÁNDES, L.; STEELE, J. L. Glutathione content of lactic acid bacteria. **Journal Dairy Science**, v. 76, n. 5, p. 1233-1242, 1993.
- GHARIEB, M. M.; GADD, G. M. Role of glutathione in detoxification of metal (loid)s by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biometals**, v. 17, n. 2, p. 183-188, 2004.
- GOBBETTI, M.; FERRANTI, P.; SMACCHI, E.; GOFFREDI, F.; ADDEO, F. Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* FT4. **Applied environmental microbiology**, v. 66 n. 9, p. 3898-3904.
- GOTOH, T.; IGUCHI, H.; KIKUCHI, K. Separation of glutathione and its related amino acids by nanofiltration. **Biochemical Engineering Journal**, v. 19, n. 2, p. 165-170, 2004.
- GRANT, C. M.; MacIVER, F. H.; DAWES, I. W. Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Genetics**, v. 29, n. 6, p. 511-515, 1996.
- IZAWA, S.; INOUE, Y.; KIMURA, A. Oxidative stress response in yeast: effect of glutathione on adaptation to hydrogen peroxide stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 368, n. 1, p. 73-76, 1995.
- LEE, P.C.; LEE, W.; LEE, S.; CHANG, H. Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and *succinic acid* production. **Process of Biotechnology**, v. 35, n. 1-2, p. 49-55, 2000a.
- LEE, P.C.; LEE, S.; HONG, S.; CHANG, H. Batch and continuous of *Manheimia succiniciproducens* MBEL 55E for the productions of succinic acid from whey and corn steep liquor. **Bioprocess and Biosystem Engineering**. v. 26, n. 1, p. 63-67, 2003a.
- LI, Y.; CHEN, J.; MAO, Y.; LUN, S.; KOO, Y. Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli*. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 709-714, 1998.
- LI, Y.; HUGENHOLTZ, J.; ABEE, T.; MOLENAAR, D. Glutathione protects *Lactococcus lactis* against oxidative stress. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 5739-5745, 2003.

- LI, Y.; HUGENHOLTZ, J.; SYBESMA, W.; ABEE, T.; MOLENAAR, D. Using *Lactococcus lactis* for glutathione overproduction. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, p. 83-90, 2005.
- LI, Y.; WEI, G.; CHEN, J. Glutathione: a review on biotechnological production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 66, n. 3, p. 233-242, 2004.
- LIMA, A.; NASCIMENTO, R.; BON, E.; COELHO, R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulose production using agro-industrial by products and its potential use in the detergent and textile industries. **Enzyme Microbial Technology** v. 37, n. 2, p. 272-277, 2005.
- LIN, J.; TIAN, J.; YOU, J.; JIN, Z.; XU, Z.; CEN, P. An effective strategy for the co-production of S-adenosyl-L-methionine and glutathione by fed-batch fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 1, p. 19-25, 2004.
- LIU, C.; HWANG, C.; LIAO, C. Medium optimization for glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 17-23, 1999.
- MACCARONE, E.; MACCARONE, A.; RAPISARDA, P. Stabilization of anthocyanins of blood orange fruit juice. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 4, p. 901-904, 1985.
- MEISEL, H. AND BOCKELMANN, W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-functional properties. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 76, n. 1-4, p. 207-215, 1999.
- MURATA, K.; TANI, K.; KATO, J.; CHIBATA, I. Glutathione production coupled with an ATP regeneration system. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 10, n. 1/2, p. 11-21, 1980.
- MURATA, K.; TANI, K.; KATO, J.; CHIBATA, I. Glutathione production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells containing an ATP regeneration system. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 72-77, 1981.
- NIE, W.; WEI, G.; DU, G.; LI, Y.; CHEN, J. Enhanced intracellular glutathione synthesis and excretion capability of *Candida utilis* by using a low pH-stress strategy. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 378-384, 2005.
- OGRODOWSKI, R. Produção de Biomassa a Partir do Soro de Queijo para Obtenção de Ribonucleotídeos. (Tese de Doutorado) – Faculdade de Engenharia de Alimentos (Unicamp), 2006.

- OHWADA, T.; SAGISAKA, S. An increase in levels of glutathione in *Escherichia coli* B caused by osmotic stress. **Agricultural Biological Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 3371-3372, 1990.
- OWENS, C. W. I.; BELCHER, R. V. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. **Biochemical Journal**, v. 94, n. 3, p. 705-711, 1965.
- PAREKH, M.; FORMANEK, J.; BLASCHEK, H. Pilot-scale production of butanol by *Clostridium beijerinckii* BA 101 using a low-cost fermentation medium based on corn steep water. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 2, p. 152-157, 1999.
- PENNINCKX, M. J. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stress. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9/10, p. 737-742, 2000.
- PENNINCKX, M. J. An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. **FEMS Yeast Research**, v. 2, n. 3, p. 295-305, 2002.
- REINERS, J. J.; KODARI, E.; CAPPEL, R. E.; GILBERT, H. F. Assessment of the antioxidant/prooxidant status of murine skin following topical treatment with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate and throughout the ontogeny of skin cancer. Part II: quantitation of glutathione and glutathione disulfide. **Carcinogenesis**, v. 12, n. 12, p. 2345-2352, 1991.
- ROLLINI, M.; MANZONI, M. Influence of different fermentation parameters on glutathione volumetric productivity by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p. 1501-1505, 2006.
- ROLLINI, M.; PAGANI, H.; RIBOLDI, S.; MANZONI, M. Influence of carbon source on glutathione accumulation in methylotrophic yeasts. **Annals of Microbiology**, v. 55, n. 3, p. 199-203, 2005.
- ROTH, E.; OEHLER, R.; MANHART, N.; EXNER, R.; WESSNER, B.; STRASSER, E.; SPITTLER, A. Regulative potential of glutamine – relation to glutathione metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 3, p. 217-221, 2002.
- ROVER Jr, L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathione associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.
- SAKATO, K.; TANAKA, H. Advanced control of glutathione fermentation process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 8, p. 904-912, 1992.

- SANTOS, L.; GONZALES, T.; UBEDA, B.; MONTE ALEGRE, R. Influence of culture conditions on glutathione production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 77, n. 4, p. 763-769, 2007.
- SAWA, Y.; SHINDO, H.; NISHIMURA, S.; OCHIAI, H. Photosynthetic glutathione production using intact cyanobacterial cells. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 50, n. 5, p. 1361-1363, 1986.
- SCHMIDT, M. G.; KONETZKA, W. A. Glutathione overproduction by selenite-resistant *Escherichia coli*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 10, p. 825-827, 1986.
- SHIMIZU, H.; ARAKI, K.; SHIOYA, S.; SUGA, K. Optimal production of glutathione by controlling the specific growth rate of yeast in fed-batch culture. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 38, n. 2, p. 196-205, 1991.
- STEPHEN, D. W. S.; JAMIESON, D. J. Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 141, n. 2/3, p. 207-212, 1996.
- SUZUKI, H.; HASHIMOTO, W.; KUMAGAI, H. Glutathione metabolism in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 6, n. 3, p. 175-184, 1999.
- VERSTRAETE, W.; VERMEIRSEN, V.; VAN CAMP, J.; DECROOS, K.; VAN WIJMELBEKE. The impact of fermentation and in vitro digestion on the formation of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity from pea and whey protein. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 2, p. 429-438, 2003.
- VILJOEN, B. The interaction between yeast and bacteria in dairy environments. **International journal of Food Microbiology**, v. 69, n. 1-2, p. 34-44, 2001.
- WALKER, G. Yeast physiology and biotechnology. **John Wiley & Sons, Ltda**, 1998.
- WANG, Z.; TAN, T.; SONG, J. Effect of amino acids addition and feedback control strategies on the high-cell-density cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* for glutathione production. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 1, p. 108-111, 2007.
- WEI, G.; LI, Y.; DU, G.; CHEN, J. Application of two-stage temperature control strategy for enhanced glutathione production in the batch fermentation by *Candida utilis*. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 11, p. 887-890, 2003a.
- WEI, G.; LI, Y.; DU, G.; CHEN, J. Effect of surfactants on extracellular accumulation of glutathione by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 8, p. 1133-1138, 2003b.

- WEN, S.; ZHANG, T.; TAN, T. Maximizing production of glutathione by amino acid modulation and high-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 2424-2428, 2006.
- WEN, S.; ZHANG, T.; TAN, T. Optimization of the amino acid composition in glutathione fermentation. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 11, p. 3474-3479, 2005.
- WEN, S.; ZHANG, T.; TAN, T. Utilization of amino acids to enhance glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 6-7, p. 501-507, 2004.
- WIEDERHOLT, K. M.; STEELE, J. L. Glutathione accumulation in Lactococci. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 5, p. 1183-1188, 1994.
- WITTRUP, K.; BANNISTER, S. Glutathione Excretion in Response to Heterologous Protein Secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 66, n. 4, p. 389-395, 2000.
- WU, G.; FANG, Y.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 3, p. 489-492, 2004.
- YANG, S.; LEE, C. Effect of culture media on protease and oxytetracycline productions with mycelium and protoplasts of *Streptomyces rimosus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 4, p. 403-410, 2001.
- ZHANG, T.; WEN, S.; TAN, T. Optimization of the medium for glutathione production in *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 454-458, 2007.

APÊNDICE

Tabela 17 – Valores de concentração de glutathiona observados durante as 96 h de fermentação para o planejamento fatorial fracionado 2^{5-1} .

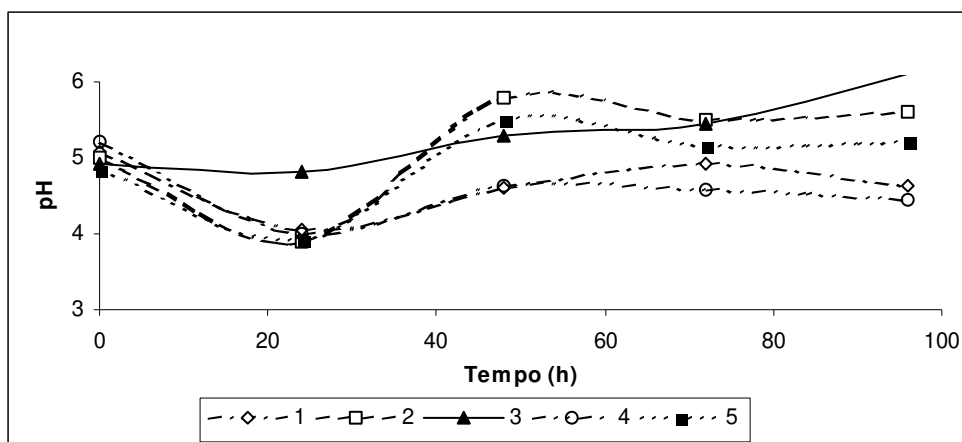
Ensaio	Glutathiona (mg/L)			
	24 h	48 h	72 h	96 h
1	37,58	89,06	101,77	107,86
2	96,67	135,88	177,192	192,43
3	31,11	77,19	119,36	40,8
4	29,05	75,28	164,27	137,17
5	33,96	103,68	177,13	139,6
6	30,37	52,45	81,3	100,71
7	104,59	137,93	104,59	137,93
8	36,69	58,36	94,16	151,4
9	48,56	79,29	68,33	77,06
10	138,46	189,01	138,46	189,01
11	25,15	122,4	110,91	129,94
12	32,63	61,28	107,63	135,42
13	19,16	102,69	144,93	127,35
14	49,61	52,6	141,96	175,76
15	21,01	77,01	131,69	166,02
16	40,8	52,68	102,53	157,57
17	36,03	123,92	192,89	264,49
18	176,22	238,31	176,22	238,31
19	180,56	235,06	180,56	235,06

Tabela 18 – Valores de produtividade máxima e rendimento de glutatona em 24, 48, 72 e 96 h de fermentação para o primeiro planejamento Plackett-Burman 12 (PB-12).

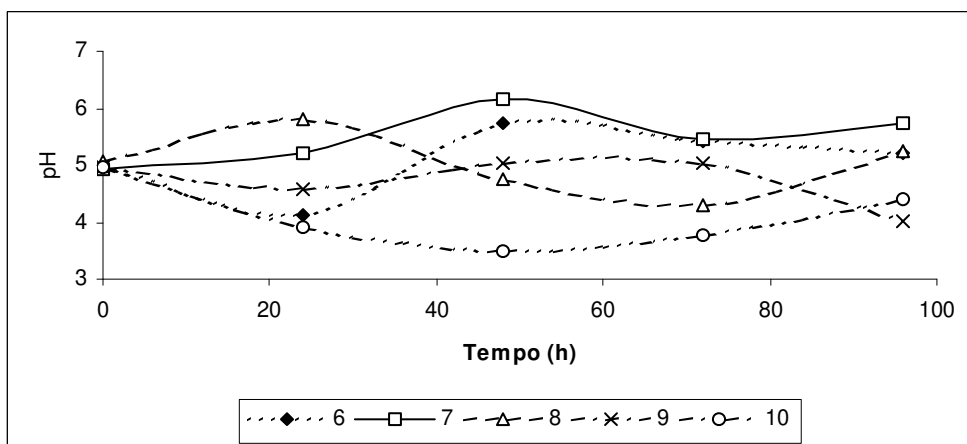
Ensaio	Produtividade (mg/L.h)	Rendimento (mg _{GSH} /g células)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
1	1,60	3,10	4,07	6,22	7,60
2	1,97	2,80	7,32	9,98	7,92
3	1,65	1,64	4,04	6,38	4,06
4	2,34	3,29	8,72	8,11	7,46
5	1,67	2,05	3,34	5,62	5,85
6	2,90	2,09	6,93	7,66	11,93
7	1,55	2,63	7,30	5,91	5,72
8	1,59	2,20	5,07	6,55	5,56
9	0,80	2,19	3,18	4,01	4,08
10	0,60	2,01	2,98	2,88	3,59
11	1,71	2,63	8,23	8,36	7,36
12	0,89	5,73	8,73	8,49	9,06
13	2,28	1,92	6,93	6,99	9,13
14	2,26	2,09	5,96	7,30	9,32
15	2,21	2,06	4,58	8,01	8,90

Tabela 19 – Valores de produtividade máxima e rendimento de glutatona em 24, 48, 72 e 96 h de fermentação para o segundo planejamento Plackett-Burman 12 (PB-12).

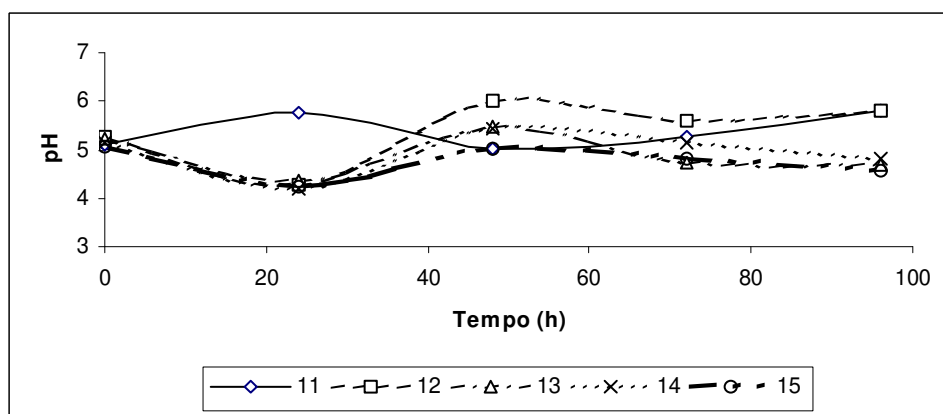
Ensaio	Produtividade (mg/L.h)	Rendimento (mg _{GSH} /g células)			
		24 h	48 h	72 h	96 h
1	1,26	3,08	3,24	3,64	6,50
2	1,54	1,44	2,72	2,85	5,38
3	4,07	2,58	8,25	6,75	5,49
4	1,91	2,97	4,58	3,97	3,70
5	2,51	1,85	3,82	8,77	7,67
6	1,72	2,38	2,62	4,12	5,23
7	1,00	1,32	1,83	2,79	3,22
8	1,74	2,55	4,33	8,12	8,90
9	1,21	3,70	4,41	3,59	2,23
10	2,31	3,26	3,77	3,32	2,62
11	2,46	3,48	4,14	7,52	5,73
12	2,63	3,18	5,66	2,51	2,36
13	2,49	4,50	9,39	8,89	4,90
14	2,31	3,75	8,09	8,19	5,31
15	2,40	3,33	8,84	8,12	5,13



(a)

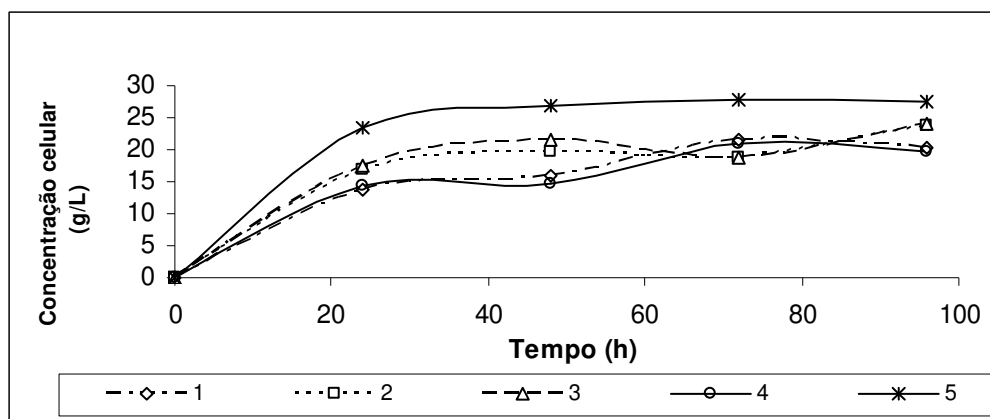


(b)

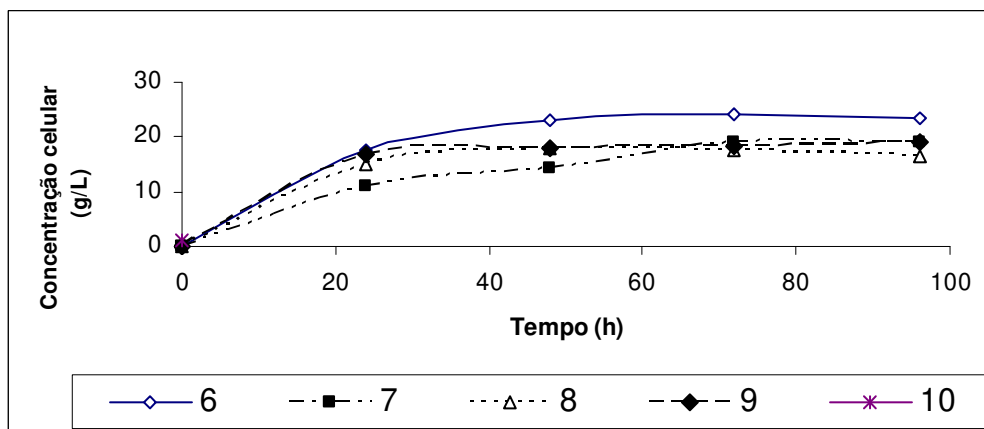


(c)

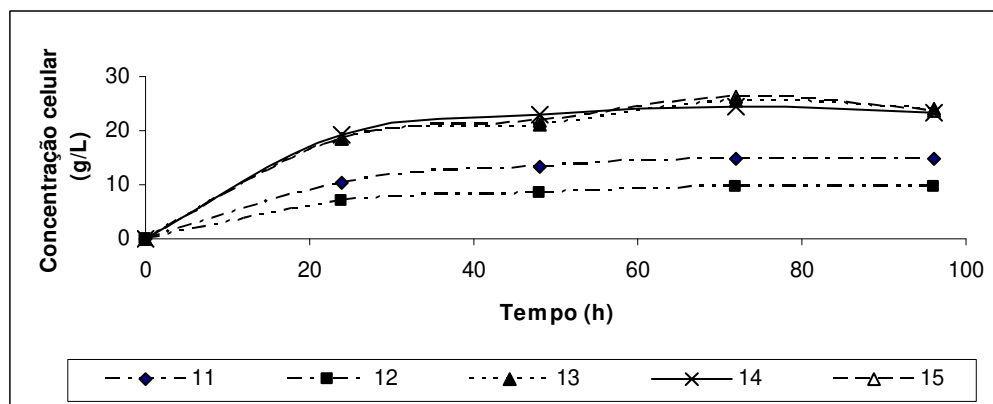
Figura 5 – Valores de pH observados durante as 96 h de fermentação para o primeiro planejamento Plackett-Burman 12 (PB-12).



(a)

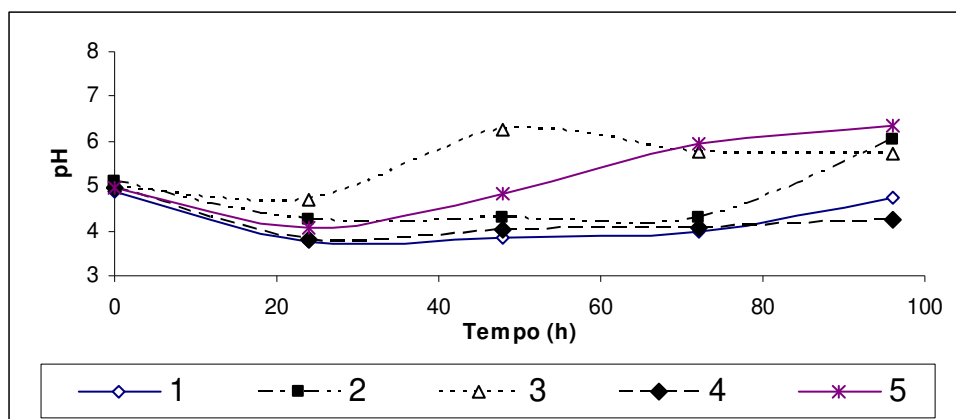


(b)

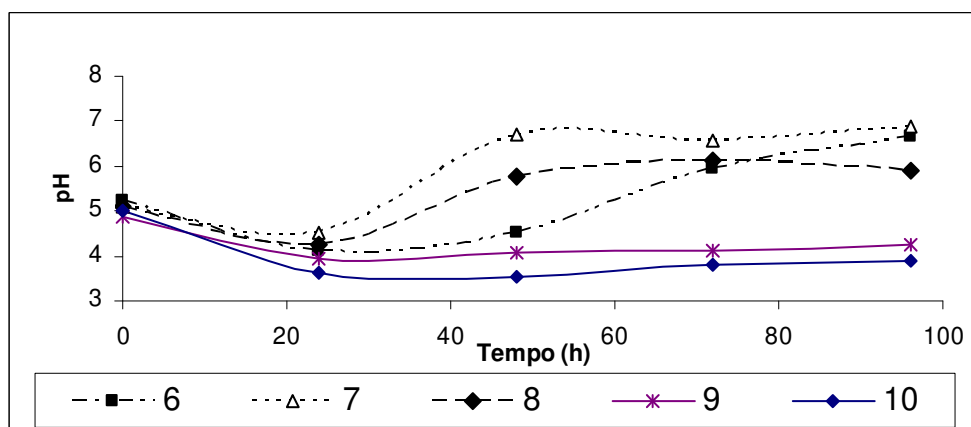


(c)

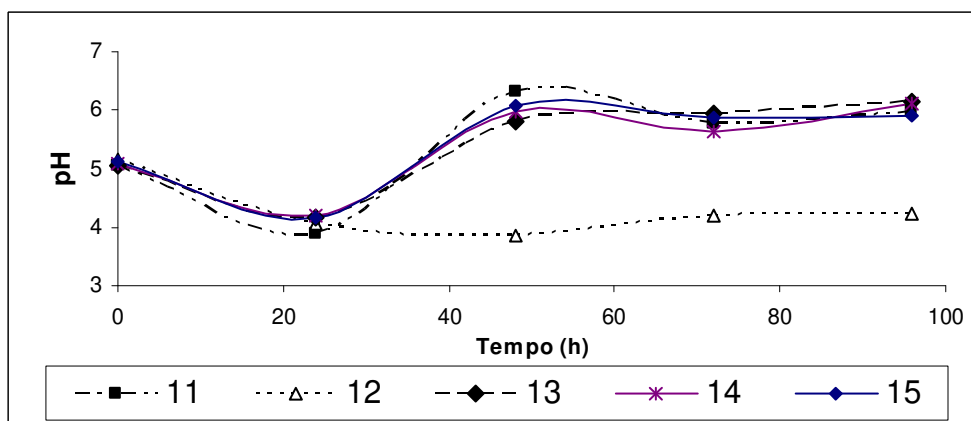
Figura 6 – Valores de concentração celular observados durante as 96 h de fermentação para o primeiro planejamento Plackett-Burman 12 (PB-12).



(a)

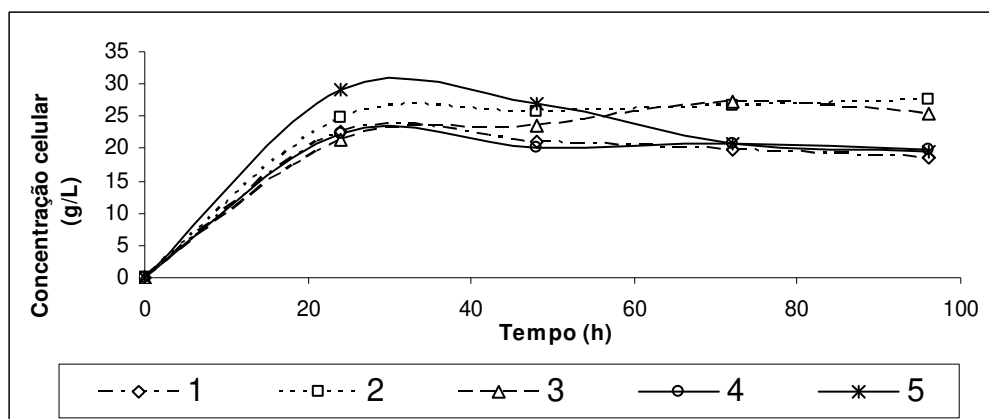


(b)

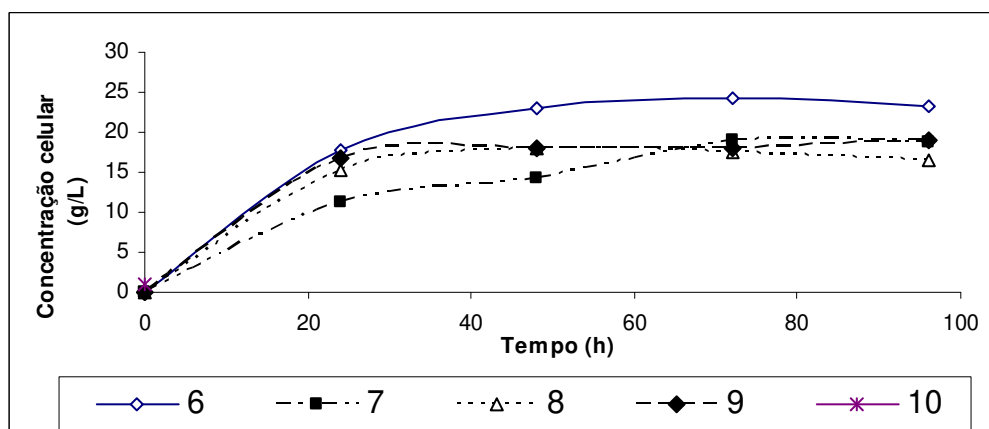


(c)

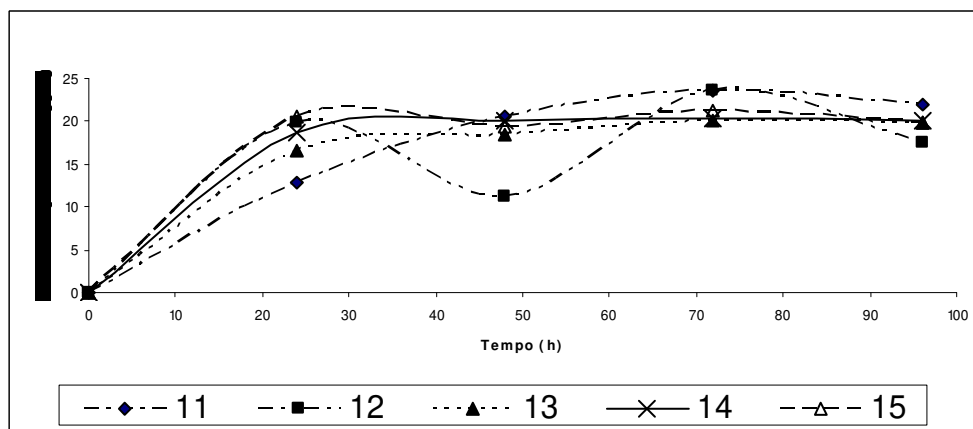
Figura 7 – Valores de pH observados durante as 96 h de fermentação para o segundo planejamento Plackett-Burman 12 (PB-12). Ensaios do 1 ao 15.



(a)



(b)



(c)

Figura 8 – Valores de concentração celular observados durante as 96 h de fermentação para o segundo planejamento Plackett-Burman 12 (PB-12). Ensaios do 1 ao 15.