



PRISCILA NUNES BRITO

**“PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA-POLIGLUTÂMICO:
ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.”**

CAMPINAS

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

PRISCILA NUNES BRITO

**“PRODUÇÃO DE ÁCIDO GAMA-POLIGLUTÂMICO:
ESTUDO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO UTILIZANDO
RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS”**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA PRISCILA
NUNES BRITO, E ORIENTADA PELO PROF. DR. RANULFO
MONTE ALEGRE.

CAMPINAS

2014

iii

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano de Souza - CRB 8/5816

B777p Brito, Priscila Nunes, 1985-
Produção de ácido gama-poliglutâmico: estudo e otimização do processo utilizando resíduos agroindustriais / Priscila Nunes Brito. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

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

1. Fermentação. 2. Ácido poliglutâmico. 3. Soja. 4. Arroz. I. Alegre, Ranulfo Monte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Production of poly(gamma-glutamic acid): study and optimization of the process using agro-industrial residues.

Palavras-chave em inglês:

Fermentation

poly(gamma-glutamic acid),

Soybean

Rice

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Mestra em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Ranulfo Monte Alegre [Orientador]

Reinaldo Gaspar Bastos

Marta Teixeira Duarte

Data de defesa: 07/02/2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

Banca Examinadora

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
(Orientador – DEA/FEA/UNICAMP)

Prof.^a Dr. Reinaldo Gaspar Bastos
(Membro titular – UFSCAR)

Prof.^a Dr.^a Marta Teixeira Duarte
(Membro titular – CPQBA/UNICAMP)

Prof. Dra. Gabriela Alves Macedo
(Membro suplente – DCA/FEA/UNICAMP)

Prof.^a Dr.^a Jonas Contiero
(Membro suplente – DBM/IB/UNESP)

Abstract

The industrial use of raw materials obtained from renewable sources is essential to the sustainable development of modern society. The need to use catalytic processes "green" ecologically correct to convert renewable commodity chemicals, including biopolymers is mobilizing researchers worldwide. Among the various polymers biosynthesized, is the γ -PGA, which is water-soluble, anionic, biodegradable and biocompatible, with wide applications in the chemical, medical, environmental, and food. This study aimed to optimize the obtaining the γ -polyglutamic acid (γ -PGA) by solid state fermentation using soy fibrous residue as a carbon source. The species selected for this study was *Bacillus subtilis* and *Bacillus velezensis* where three strains were tested, selecting the one that showed better growth and production of γ -PGA. In addition, we measured factors such as aeration and moisture from the fermentation medium. The optimization study was performed using the strategy of experimental design. The solid medium which maximized the yield was fixed at 9:1 fibrous byproduct of soybean and rice hulls, allowing for maximum yield of 46.19 g of γ -PGA / kg of solid medium (bs) without addition precursor glutamic acid, and thus a viable means for producing γ -PGA with lower process cost.

Resumo

A utilização industrial de matérias-primas obtidas por fontes renováveis é essencial para o desenvolvimento sustentável da sociedade moderna. A necessidade de se utilizar de processos catalíticos “verdes”, ecologicamente corretos para converter fontes renováveis em *commodities* químicos, dentre eles os biopolímeros está mobilizando pesquisadores do mundo inteiro. Dentre os diversos polímeros biossintetizados, encontra-se o γ -PGA, que é solúvel em água, aniônico, biodegradável e biocompatível, com amplas aplicações nas áreas química, médica, ambiental e de alimentos. Este trabalho buscou a otimização da obtenção do ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) por fermentação em estado sólido utilizando resíduo fibroso de soja como fonte de carbono. As espécies selecionadas para este estudo foram *Bacillus velezensis* e *Bacillus subtilis* onde três linhagens foram testadas, selecionando-se a que apresentou melhor crescimento e produção de γ -PGA. Além disso, foram mensurados os fatores como: aeração e umidade do meio de fermentação. O estudo de otimização foi realizado utilizando a estratégia de planejamentos experimentais. O meio sólido que maximizou a produção foi fixado em 9:1 de sub-produto fibroso de soja e casca de arroz, possibilitando máxima produção de 46,19 g de γ -PGA/ kg de meio sólido (b.s.), sem adição do precursor ácido glutâmico, sendo assim um meio viável para produção de γ -PGA com menor custo de processo.

Sumário

Abstract.....	vi
Resumo.....	vii
Lista de ilustrações.....	xvii
Lista de tabelas.....	xiv
1.Introdução.....	1
2.Objetivos.....	2
2.1. Objetivos Específicos.....	2
3. Revisão Bibliográfica.....	3
3.1. Soja.....	3
3.2. Casca de Arroz.....	4
3.3. Fermentação em Estado Sólido (FES).....	6
3.3.1. Fatores que afetam a FES.....	7
3.4. Ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA).....	9
3.4.1. Propriedades físico-químicas.....	11
3.4.2. Aplicações.....	12
3.4.3. Síntese de γ -PGA.....	13
4. Material e Métodos.....	18
4.1. Microrganismo.....	18
4.1.1. Manutenção das culturas.....	18
4.1.2. Estudo do crescimento do microrganismo.....	18
4.2. Meio sólido para FES.....	19
4.3. Fermentação.....	19
4.4. Planejamento Experimental.....	19
4.4.1. Ensaios preliminares para a produção de γ -PGA.....	19
4.4.2. Planejamento por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR2 ⁴).....	20
4.5. Metodologias analíticas.....	21

4.5.1. Extração e quantificação de ácido γ -poliglutâmico.....	21
4.5.2. Determinação da biomassa seca.....	22
4.5.3. Determinação do pH.....	22
4.5.4. Cromatografia em Camada Delgada.....	22
5. Resultados e Discussão.....	24
5.1. Caracterização do substrato.....	24
5.2. Efeito da Temperatura no crescimento dos microrganismos produtores de γ -PGA em meio BHI – Preparo do inóculo.....	24
5.3. Seleção da melhor linhagem de <i>Bacillus</i> produtora de γ -PGA e influência da descompactação da massa.....	25
5.4. Influência da Temperatura e tempo na produção de γ -PGA.....	29
5.5. Influência da adição de sais, ácido cítrico, umidade e pH inicial na produção de γ -PGA.....	32
6. Conclusões.....	39
7. Referências Bibliográficas.....	41
APÊNDICE A.....	49

Dedicatória

Dedico este trabalho ao Prof. Ranulfo Monte Alegre pelo acolhimento e orientação, no qual durante esse tempo sem precedentes me deu força e total apoio. Aos meus pais, pela credibilidade, meus irmãos pelo incentivo, aos meus sobrinhos Pedro e Gabriel pelo amor incondicional, a Murilo, meu amor, um anjo que Deus enviou à minha vida, só para me fazer feliz, sem cada um de vocês essa vitória não seria tão especial!!!

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade de viver esse sonho. Obrigada pela serenidade e luz nos meus caminhos.

Agradeço aos meus pais pelo incentivo e credibilidade, sem a confiança que depositaram em mim, talvez eu não tivesse forças para viver tanto tempo longe...

Agradeço aos meus irmãos, pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu esposo Murilo, por simplesmente segurar a minha mão e caminhar ao meu lado. Seu amor é essencial à minha vida!

As minhas grandes amigas: Flavinha, Ju e Carla obrigada pela amizade, pelo apoio, pelas palavras de conforto e pelas boas risadas.

As minhas novas amigas e companheiras: Dani e Helo, por todos os momentos vividos, pelas alegrias e pela companhia em casa.

A Claudinha, César, Meire, Sylvia e Dona Maria, companheiros do Laboratório, muito obrigada pela paciência nos ensinamentos e pela companhia.

A Luana, por todas as horas dedicadas às minhas estatísticas e dúvidas, muitíssimo obrigada pela sua amizade.

Ao meu orientador, Ranulfo, por certas palavras ditas neste trajeto, quando as coisas pareciam perdidas, me apoiou e me confortou de que tudo daria certo no fim. Muitíssimo Obrigada...

A banca examinadora, muito obrigada pela sua compreensão em todas as vezes que fui obrigada a alterar a data de defesa.

Ao Marcos, Cosme e Mauro, funcionários da secretaria, o que seria da minha defesa sem a ajuda de vocês... Muito obrigada de coração!

Aos Professores do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, pelo ensinamento e dedicação.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos, em especial ao Laboratório de Tratamento de Efluentes e Processos Fermentativos pela realização deste trabalho.

Aos funcionários da Fea, pela ajuda, paciência e atenção no atendimento.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo pela bolsa concedida.

Lista de Ilustrações

Figura 1. Estrutura química: (a) ácido α -poliglutâmico e (b) ácido γ -poliglutâmico FONTE: Adaptado de Candela e Fouet (2006).....	10
Figura 2.. Modelo predito para ácido γ -D-poliglutâmico. (a) vista superior (b) vista lateral. FONTE: Zanuy e Aleman (2001).....	12
Figura 3. Via proposta para a síntese do γ -PGA em Bacilli. FONTE: Adaptado de Buescher e Margaritis (2007)	16
Figura 4. Fermentação em frascos de Erlenmeyers de 250 mL.....	19
Figura 5. Curvas de crescimento microbiano em caldo BHI em cultivos conduzidos a 37°C a 180 rpm... ..	24
Figura 6. Curvas de crescimento microbiano em caldo BHI em cultivos conduzidos a 30°C a 180 rpm.....	25
Figura 7. Efeito da mistura de substratos no meio de cultura na produção de γ -PGA em 48 horas de cultivo. (SUB: sub-produto de soja, CA – casca de arroz).....	26
Figura 8. Produção de γ -PGA durante o processo fermentativo na proporção 9:1 (SUB:CA). SUB – sub-produto de soja, CA – casca de arroz. (Concentração de γ -PGA calculada em cima da porcentagem de substrato adicionado em cada ensaio (base seca))..	27
Figura 9. Produção de biomassa durante o processo fermentativo para as três linhagens a 37°C.....	27
Figura 10. Erlenmeyer com meio contendo Sub-produto Fibroso de Soja e Casca de Arroz, fermentado por <i>Bacillus velezensis</i> NRRC 23189, por 48 horas. Vista do fundo do Erlenmeyer (A) e vista frontal (B).....	28
Figura 11. Extração de γ -PGA, Becker contendo meio antes da adição de álcool etílico (A) a 4°C e após adição de álcool (B).....	29
Figura 12. Produção de γ -PGA por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL 23189 em meio constituído de farelo desengordurado de soja e casca de arroz.....	31
Figura 13. Variação de pH no decorrer das fermentações dos ensaios preditos.....	32
Figura 14. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a produção de γ -PGA em 48 horas de fermentação.....	34
Figura 15. Superfície de resposta e curvas de contorno para a produção de γ -PGA. (A) e (B) umidade versus sais.....	36

Figura 16. Superfície de resposta e curvas de contorno para a produção de γ -PGA. (C) e (D) Umidade versus pH inicial.....	36
Figura 17. Superfície de resposta e curvas de contorno para a produção de γ -PGA. (A) e (B) Ácido Cítrico versus Umidade.....	37
Figura 18. Cromatografia do padrão ácido glutâmico (P) e do γ -PGA hidrolisado por <i>Bacillus subtilis</i> NRRC 351 (1), <i>Bacillus velezensis</i> NRRC 23189 (2) e <i>Bacillus subtilis</i> NRC 41289 (3).....	38

Lista de Tabelas

Tabela 1. Composição centesimal de farelo de soja.....	4
Tabela 2. Solução/suspensão de sais nutrientes.....	20
Tabela 3. Tabela de níveis das variáveis para o planejamento DCCR 2 ⁴	20
Tabela 4. Composição da casca de arroz utilizado como substrato no presente trabalho.....	24
Tabela 5. Matriz dos ensaios gerada pelo Delineamento Composto Central Rotacional DCCR4 com seus níveis reais e codificados e a resposta produção de γ -PGA (g/kg) em 48 horas de fermentação.....	33
Tabela 6. Coeficientes de regressão para as variáveis e suas interações significativas.....	34
Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para a produção e γ -PGA (g/kg de substrato) em 48 horas, referente a matriz do delineamento (DCCR).....	35

1. Introdução

Inevitavelmente os desafios com a problemática ambiental permeiam todas as atividades relacionadas aos processos industriais. A utilização integral de resíduos gerados é uma necessidade fundamental para manutenção da biosfera terrestre, visto que, em algumas áreas esta já não tem mais a capacidade de assimilação natural de dejetos, que ficam acumulados na natureza ou provocam degradação ambiental com velocidade maior do que a esperada.

Além de ser pauta das principais Conferências Internacionais de Meio Ambiente, a busca por sustentabilidade ambiental levanta outra questão importante no que diz respeito ao tipo de resíduo gerado. Dentre a ampla gama de rejeitos gerados no Brasil, o problema de acúmulo de materiais não-biodegradáveis nos solos tem sido um grande problema. Tais materiais, como por exemplo, o plástico, pode demorar mais de 100 anos para se decompor no meio ambiente.

Frente a tais circunstâncias, estudos têm sido direcionados à busca por desenvolvimento de novos materiais que sejam biodegradáveis e biocompatíveis, com propriedades e desempenho idênticos aos convencionais, tais como os biopolímeros, que surgem como uma dessas alternativas de substituição e além de possuírem tais características, são também obtidos a partir de fontes de resíduos agroindustriais.

No Brasil, uma grande quantidade de sub-produtos fibrosos de soja (*Glycine Max*) são gerados no processo de produção de proteína de soja. Estes materiais, ricos em celulose e hemicelulose, podem ser usados como substratos para cultivos microbianos visando a produção de valiosos ácidos e enzimas.

O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é um biopolímero aniônico, solúvel em água, biodegradável, biocompatível e atóxico, obtido a partir de bactérias do gênero *Bacillus*, através de processos fermentativos. Ou seja, além, de produzir um novo biopolímero com características que favorecem o meio ambiente, ele é obtido através de fontes renováveis, o que torna a sua utilização ainda mais promissora à aplicação industrial.

2. Objetivo

O objetivo geral deste trabalho, foi estudar a otimização da produção de ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA), por Fermentação em Estado Sólido (FES), utilizando o sub-produto fibroso de soja, avaliando parâmetros tempo, temperatura, umidade e adição de sais.

2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar o desempenho de linhagens de *Bacillus* na produção de γ -PGA;
- Avaliar a influência do tempo e temperatura na produção de γ -PGA;
- Avaliar a aeração ideal para o meio de fermentação;
- Avaliar a influência da adição de sais minerais ($MgSO_4$, $CaCl_2$, $FeCl_3$, $MnSO_4$ e K_2HPO_4), adição de ácido cítrico, umidade e pH na produção de γ -PGA.

3. Revisão Bibliográfica

3.1. Soja

Planta pertencente à família das leguminosas, como o feijão e a ervilha, a soja tem recebido várias denominações e o seu preciso posicionamento taxonômico foi sujeito a inúmeras controvérsias no passado. Atualmente, a soja cultivada é classificada como *Glycine max* (L.) e pertence ao ramo *Fanerógama*, divisão *Angiospermae*, classe *Dicotyledoneae*, ordem *Rosales*, família *Leguminosae*, subfamília *Papilionidae* e ao gênero *Glycine* L. Seus produtos vêm sendo amplamente estudados devido não somente ao seu valor nutricional, mas também às suas propriedades funcionais na indústria de alimentos, e como alimento funcional, porque exerce ação moduladora em determinados mecanismos fisiológicos por meio de suas proteínas e isoflavonas (CIABOTTI *et al.*, 2006; MORAES *et al.*, 1996).

A primeira notícia sobre soja que se tem conhecimento no Brasil data de 1882, e relata resultados de testes feitos com algumas variedades na Bahia. Efetivamente, foi introduzida no país em 1908, em São Paulo, por intermédio de imigrantes japoneses, mas o verdadeiro impulso na produção ocorreu na década de 60, quando se iniciou o cultivo sucessivo trigo-soja no Rio Grande do Sul (MORAES *et al.*, 1996). No Paraná, a produção passou de 8 mil toneladas em meados dos anos 1960 e 1961, para 150 mil em 1960, para 3,5 milhões em 1970, para 4,15 milhões em 1980 e para 6,5 milhões de toneladas em 1990, consolidando o Paraná na segunda posição entre os maiores produtores, atrás apenas do Mato Grosso (fonte: Embrapa, 2004, citado por COSTA *et al.*, 2007).

A soja é um dos produtos agrícolas mais comercializados no mundo com crescimento médio anual, nos últimos 40 anos, da ordem de cinco milhões de toneladas/ano (CONAB, 2007). Isso se deve às suas diversas formas de consumo, que se estendem desde a alimentação (humana e animal) até a indústria, farmacêutica e siderúrgica mundial.

A soja é um produto agrícola de grande interesse mundial graças à versatilidade de aplicação de seus produtos na alimentação humana e animal e ao seu valor econômico nos mercados nacional e internacional (MELLO FILHO *et al.*, 2004). A relação entre o consumo de soja e a saúde humana tem sido amplamente investigada pelas

características nutricionais desse alimento, quer seja o elevado teor de proteína de qualidade nutricional adequada, o conteúdo significativo de minerais e fibras, ou ainda, a quantidade reduzida de gordura saturada e a ausência de colesterol (GRIESSHOP, *et al.*, 2001).

Essa diversidade é possível porque as indústrias de processamento de soja produzem subprodutos, como farelo e óleo, que se constituem em importante matéria-prima para diversos setores industriais (FREITAS *et al.*, 2001).

O subproduto fibroso de soja foi utilizado como substrato para cultivo em estado sólido por Heck *et al.*, (2005), e Heck, Hertz e Ayub (2002), na produção de celulase, xilanase e transglutaminase. Os resultados obtidos por esses autores demonstraram o potencial deste subproduto para obtenção de outros bioprodutos. Foi observado ainda que em países asiáticos a soja é amplamente utilizada para a produção de Natto, produto rico em γ -PGA produzido pelo cultivo de linhagens específicas de *B. subtilis*.

Zambom, *et al.*, 2001, pesquisaram as características do farelo de soja, uma vez que este subproduto tem desempenhado papel importante na produção de polímeros de natureza fermentativa. Os investigadores avaliaram os seus componentes e podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Composição centesimal de farelo de soja*.

Fonte	Umidade	Proteínas	Lipídeos	Carboidratos	Fibras
Subproduto de soja	10	46,7	1,67	33,10	4,97

*médias em triplicatas.

3.2. Casca de Arroz

O arroz é um dos principais produtos de impacto na economia do estado do Rio Grande do Sul. Toda a cadeia produtiva do arroz, cada vez mais, tem manifestado sérias

preocupações com os impactos ambientais causados tanto na produção quanto no beneficiamento da matéria prima. Estas preocupações se refletiram em ações como a introdução do Selo Ambiental da lavoura de arroz, implantado pelo IRGA, e também no direcionamento da casca do arroz para a produção de energia (IRGA, 2010).

O beneficiamento do arroz, assim como todo processo agroindustrial, apresenta impactos ambientais resultantes das técnicas produtivas empregadas e que, se não forem adequadamente manejados, podem resultar em danos ao meio ambiente. Dentre os poluentes gerados pelos engenhos beneficiadores, a casca de arroz é o de maior importância, quer seja pela quantidade gerada, aliada a baixa densidade, ou pela dificuldade em sua decomposição no meio ambiente, constituindo-se em sério problema para as empresas do setor, tendo em vista as obrigações exigidas pela legislação vigente. Portanto, o aproveitamento desses resíduos agroindustriais auxilia na solução dos problemas ambientais, podendo ainda, gerar renda extra através da sua utilização direta, melhorando os aspectos de qualidade e produtividade da gestão dos recursos naturais. (LHAMBY, *et al.*, 2010).

A casca de arroz é classificada como um resíduo de classe II, segundo a Norma brasileira de classificação de resíduos sólidos, ou seja, não inerte e não perigoso à saúde humana e ao meio ambiente (ABNT, 2004). Um destino comum da casca é o descarte em lavouras e fundos de rios, liberando gás metano - prejudicial à camada de ozônio - ao se decompor (PEROZZI, 2004).

A casca de arroz é um resíduo agroindustrial, subproduto do beneficiamento do arroz, e de extrema importância no Brasil, tendo em vista a produção nacional que é de aproximadamente 13 milhões de toneladas de casca, sendo o Rio Grande do Sul responsável por 46% do total. Com poder calorífico de 3.200 kcal.kg⁻¹, a utilização da casca de arroz, para geração de energia elétrica, além de proporcionar melhorias ao meio ambiente, pode agregar valor ao arroz produzido pelas indústrias. Além disso, a casca apresenta baixa densidade, em torno de 130 kg.m⁻³, resultando em grande volume para disposição (MAYER *et al.*, 2006).

A casca de arroz torna-se, neste contexto, um subproduto abundante e de baixo valor agregado pelo seu baixo valor como ração animal, pois é de difícil digestibilidade, baixa densidade, e em grande quantidade de cinzas e sílica como componentes e

características abrasivas (SAHA e COTTA, 2008). Considerado um sub-produto lignocelulósico agroindustrial a casca de arroz vem sendo muito estudada para a produção biotecnológica de compostos de alto valor agregado, além de poder ser utilizado como elemento aerador dos meios de cultivos semi-sólidos, aumentando a porosidade dos mesmos.

3.3. Fermentação em Estado Sólido (FES)

A Fermentação em estado Sólido possui potencial biotecnológico para produção de alimentos, combustíveis, produtos químicos e fármacos. A utilização de resíduos agroindustriais como substratos para FES é uma alternativa econômica e que apresenta a vantagem de agregar valor em resíduos que normalmente são descartados pelas indústrias. Com a evolução da engenharia bioquímica, dos modelos matemáticos e dos biorreatores, é possível o aumento de escala e produção industrial de insumos por FES (PANDEY *et al.*, 2001).

A Fermentação em Estado Sólido ocorre na superfície ou interior de materiais sólidos os quais possuem a capacidade de absorver água, podendo ou não conter nutrientes solúveis e ser ou não biodegradáveis, sobre os quais os microrganismos irão crescer. O suporte sólido pode atuar como fonte de nutrientes ou os nutrientes podem ser solúveis em água e os microrganismos estarem aderidos a uma matriz sólida, que irá absorver o meio de cultura líquido (DEL BIANCHI *et al.*, 2001)

Vários resíduos e subprodutos oriundos da agroindústria, como bagaço de mandioca, polpa e casca de café, polpa de maçã, soja e resíduos de batata vem sendo utilizados em FES, com diferentes tipos de microrganismos, para a produção de enzimas e biopolímeros.

Segundo Pandey *et al.* (2000) a partir da década de 90 houve aumento sem precedentes no interesse em relação à fermentação em estado sólido para o desenvolvimento de bioprocessos, tais como biorremediação e biodegradação de compostos perigosos, desintoxicação biológica de resíduos agroindustriais, biotransformação e enriquecimento nutricional de culturas e de resíduos de culturas, obtenção de produtos com grande valor agregado, tais como metabólicos secundários biologicamente ativos, incluindo antibióticos, alcaloides, fatores de crescimento de

plantas, entre outras. Pode-se citar também as enzimas, ácidos orgânicos, biopesticidas, biocombustíveis e compostos aromáticos.

Os processos de fermentação no estado sólido têm potencial econômico considerável na produção de produtos para as indústrias de alimentos para consumo humano e animal, farmacêutica e agrícola. Além disso, esses procedimentos são de interesse econômico especial para países com abundância de resíduos e sub-produtos agroindustriais e biomassa, visto que podem ser utilizados como matérias-primas de baixo custo (PANDEY *et al.*, 1992; CASTILHO *et al.*, 2000;). Vários resíduos oriundos da agroindústria, como bagaço de mandioca, polpa e casca de café, polpa de maçã, soja e resíduo de batata vem sendo usados em FES com diferentes tipos de microrganismos por pesquisadores, para a produção, por exemplo, de ácidos orgânicos.

Os resultados reportados na literatura envolvem processos com intensa suplementação de nutrientes e ainda carentes de acesso aos parâmetros de cultivos como a aeração, fator de suma importância, visto a falta de uniformização do meio em questão. Faz-se necessário uma avaliação de gastos com essa suplementação, para a validação real destes estudos em escala industrial.

Têm-se observado que muitos estudos sobre fermentação, para a produção de biopolímeros é feita por fermentação submersa, e utilização de fungos. A fermentação semi-sólida apresenta grandes vantagens em se tratar de um meio com atividade de água reduzida, bem como formação de gradientes de temperatura, nutrientes e produtos.

3.3.1. Fatores que afetam a FES

3.3.1.1. Umidade

O teor de umidade do meio de cultivo é um dos principais parâmetros que influencia a fermentação em estado sólido (FES). A natureza do substrato, as necessidades do microrganismo utilizado e o tipo de produto final desejado são os principais fatores que determinam o teor de umidade que o substrato deverá apresentar. Um substrato devidamente umedecido deve possuir um filme superficial de água visando facilitar a dissolução e a transferência de nutrientes e de oxigênio. Porém, entre as partículas de substrato deve haver canais que possibilitem a difusão de gases e a

dissipação de calor. Assim, se o nível de umidade for elevado, implicará no decréscimo da porosidade do meio, resultando na diminuição de trocas gasosas e o aumento da temperatura interna do meio em fermentação. Além disso, a alta umidade resulta num decréscimo da porosidade, o que impede a penetração do oxigênio, o que pode facilitar a contaminação bacteriana. Vale mencionar que, suportes com baixa umidade dificultam o crescimento microbiano, causando menor produção do metabólito desejado. A umidade na fermentação sólida pode variar de 18 a 85%, se modificando em função da capacidade de absorção do meio de cultivo utilizado (DEL BIANCHI *et al.*, 2001, citados por LIMA, *et al.*, 2001).

3.3.1.2. pH

O controle do pH durante a FES, embora seja um dos parâmetros mais críticos, dificilmente será conseguido devido à heterogeneidade e consistência do material. Como tentativa de amenizar o efeito de uma variação brusca, utilizam-se substratos com boa capacidade tamponante ou adição de soluções-tampão durante a etapa de umidificação do substrato (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

3.3.1.3. Temperatura

O crescimento microbiano é um processo exotérmico, e o calor gerado deve ser dissipado, visto que altas temperaturas não são favoráveis ao crescimento dos microrganismos. Uma das grandes dificuldades dos processos de FES é a remoção de calor devido à baixa condutividade térmica da matéria fermentada. Para a FES em larga escala, o problema se agrava e, os equipamentos para refrigeração mostram-se inadequados para dissipar o calor metabólico (HASAN, 2002). Pode-se contornar este problema com a introdução de ar comprimido através do meio de cultura em escala industrial, controle de temperatura da sala ou do equipamento onde ocorre a fermentação, pelo sistema de camisas em torno do fermentador com circulação de água refrigerante (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

A temperatura ótima para fermentação depende do tipo de microrganismo, mas geralmente o intervalo de temperatura permanece entre 25 e 35 °C. Durante o metabolismo há geração de calor. A cada mol de CO₂ produzido durante a oxidação do

substrato são liberadas 673 Kcal. Por isso, em alguns processos de FES é necessário remover o calor a fim de controlar a temperatura do processo (SILVA *et al.*, 2010).

3.3.1.4. Agitação e aeração

O emprego de agitação em FES pode melhorar homogeneização do meio e a distribuição dos inóculos e do umidificante, impedir a formação de agregados e favorecer a exatão de gases e a troca de calor do meio. Porém, pode interferir na formação dos esporos, devido à fragmentação do micélio. A interface sólido/gás deve permitir a troca de gases, pois o consumo de oxigênio e a formação de dióxido de carbono são muito elevados em FES (SCHMIDELL *et al.*, 2001; SAUCEDO-CASTANEDA *et al.*, 1992).

3.3.1.5. Inóculo

De acordo com Chen *et al.* (2005), a concentração do inóculo é um importante fator biológico, o qual determinará a quantidade de biomassa produzida pela fermentação. Uyar & Baysal (2003) avaliaram como importante fator a concentração do inóculo na produção de protease alcalina por *Bacillus sp.* Concluíram que o aumento do nível de inóculo, variando entre 10 e 35%, diminuiu a produção de enzimas devido à exatão dos nutrientes presentes no meio fermentativo. Logo, uma quantidade adequada de concentração de inóculo em relação à quantidade de substrato utilizado se faz necessária, para garantir a total fermentação do meio.

3.4. Ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA)

Ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é um biopolímero aniônico que ocorre naturalmente na forma de uma homopoliamida composta por unidades de D- e L-ácido glutâmico. É solúvel em água, biodegradável, comestível e atóxico para seres humanos e para o meio ambiente (SHIH, VAN, 2001). Existe uma distinção entre o γ -PGA e o α -PGA. São formados por unidades de ácido D- e L-glutâmico, no entanto a ligação entre os monômeros é diversa. Enquanto no γ -PGA as unidades monoméricas estão conectadas por uma ligação amida entre o grupo α -amino e o grupo γ -ácido carboxílico (SHIH; VAN, 2001), no α -PGA a união se dá com o grupo α -carboxílico (BUESHER; MARGARITIS, 2007), conforme pode ser observado da Figura 1.

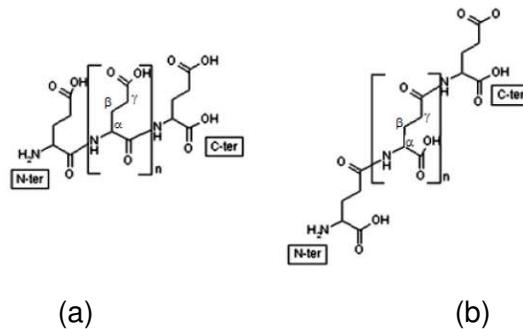


Figura 1. Estrutura química: (a) ácido α -poliglutâmico e (b) ácido γ -poliglutâmico
FONTE: Adaptado de Candela e Fouet (2006).

O α -PGA somente pode ser obtido através de síntese química, enquanto o γ -PGA é produzido somente por via microbiana e ocorre naturalmente no *natto*, alimento japonês que consiste em soja fermentada. No *natto*, o γ -PGA é produzido por *Bacillus subtilis natto* (NOGUCHI, *et al.*, 2001).

Segundo Silva (2010), em algumas publicações, embora cada vez menos frequente, ainda é possível observar o uso da terminologia “ácido poliglutâmico” ou “PGA” de forma indistinta, como ocorre no trabalho publicado por Sanio e Steinbuchel (2002) e Soliman, Berekaa e Abdel-Fattah (2005).

O γ -PGA foi isolado pela primeira vez em 1913 por Sawamura, quando foi descoberto como componente da parede celular do *Bacillus anthracis* e passou a ser considerado um polímero tóxico e causador de doenças. Em 1942 Bovarnick o descobriu como componente extracelular produzido em fermentação por *Bacillus licheniformis* e em 1963 foi descoberto por Fujii no *natto* (ARPAL, 2004).

O γ -PGA produzido por *Bacillus* geralmente apresenta massa molecular elevada, na faixa entre 10^5 a 10^8 Da e polidispersividade entre 2 e 5 (DO, *et al.*, 2001; SHIH; VAN, 2001). Oppermann-Sanio e Steinbuchel (2002) reportam uma faixa mais estreita de massa molecular para o γ -PGA produzido por *Bacillus licheniformis*, com valores entre 10^5 e 10^6 Da. Sung *et al.* (2005) utilizando a linhagem *Bacillus subtilis*, obtiveram um γ -PGA de elevada massa molecular ($>2.10^6$ Da) quando usaram uma concentração baixa de

cloreto de sódio no meio de cultivo, e uma massa molecular mais baixa ($10^4 - 2.10^6$ Da) para as concentrações superiores a 10% de cloreto de sódio.

3.4.1. Propriedades físico-químicas

O γ -PGA é um polímero composto unicamente por uma das formas ou pelas duas formas enantioméricas (D- e L-) do ácido glutâmico. O γ -PGA é altamente solúvel e sequestrante de moléculas de água. Ao contrário das proteínas, onde os aminoácidos são ligados por ligações peptídicas (α -amino), no γ -PGA as ligações são tipo γ -amino, deste modo este polímero é resistente à ação das proteases, capazes de clivar as ligações α -amino. (CANDELA; FOUET, 2006).

A massa molar e a polidispersividade são características importantes que se refletem nas propriedades funcionais de um polímero. A massa molecular e a estrutura química dos materiais poliméricos são as principais responsáveis pelas suas propriedades e, conseqüentemente, pela sua utilização em inúmeras aplicações (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

O ácido γ -poliglutâmico é uma macromolécula produzida por *Bacillus* spp, que produz soluções muito viscosas e que possui estrutura composta por 5.000 a 10.000 unidades de D- e L- ácido glutâmico conectadas por ligações γ -amida entre grupos α -amino e γ -carboxílico (TANIGUCHI *et al.*, 2005)

Além do γ -PGA ser variável quanto à sua composição estereoquímica, ele também é variável quanto a massa molecular (ASHIUCHI *et al.*, 2003). Sua massa molecular geralmente varia de 100.000 a 1.000.000 Da, segundo KUNIOKA (2004). Essa variação ampla é devido às diferentes condições de cultivo e microrganismos utilizados na produção do polímero (BUESCHER; MARGARITIS, 2007). O tamanho dos filamentos de γ -PGA também varia dependendo do organismo produtor da molécula e dos métodos utilizados em análise e de purificação. (CANDELA; FOUET, 2006)

O filamento de γ -PGA pode adotar conformação estrutural específica dependendo da sua concentração e do pH do meio (HE;NEU; VANDERBERG, 2000; DO; CHANG; LEE, 2001). A estrutura do ácido γ -D-poliglutâmico foi predita por Zanuy e Aleman (2001), através de modelo teórico determinado para uma molécula composta por 10 a 20

unidades monoméricas de ácido D- glutâmico. Em solução aquosa essa molécula consistia de uma hélice no sentido anti-horário, estabilizada por pontes de hidrogênio intramoleculares, conforme Figura 2.

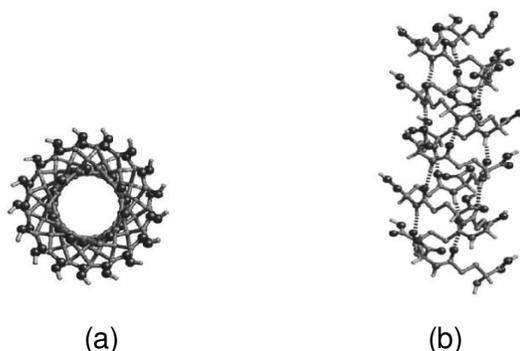


Figura 2. Modelo predito para ácido γ -D-poliglutâmico. (a) vista superior (b) vista lateral. FONTE: Zanuy e Aleman (2001).

Os polímeros com massa molecular elevada são úteis como espessantes, no entanto, podem não ser aplicáveis a outros usos nos quais a alta viscosidade os tornaria inadequados. A massa molecular do polímero definirá, portanto, em grande parte, sua aplicação. Por exemplo, em sistemas utilizados para veiculação de medicamentos, polímeros de diferentes massas moleculares são requeridos para controlar a liberação da droga através dos tecidos (SHIH; VAN, 2001)

3.4.2. Aplicações

O γ -PGA apresenta uma diversidade de aplicações que incluem o uso como espessante, umectante, melhorador de textura, crioprotetor, amenizador de sabores amargos, veículo para medicamentos, adesivo biológico, floculante, hidrogéis altamente absorvedores de água, quelante de metais pesados, fibras biodegradáveis e aditivo para alimentação animal (KINIOKA, 2004; SHIH; VAN, 2001; CANELA; FOUET, 2006)

Apresenta vantagens sobre as poliamidas convencionais, podendo ser obtido mediante biossíntese e é biodegradável. Existe ainda o fato de apresentar propriedades como solubilidade em água e não toxicidade para humanos e para o meio ambiente, ser comestível e aniônico. Devido a essas vantagens ele tem despertado grande interesse

quanto às suas possíveis aplicações nas indústrias de alimentos, plásticos e cosméticos e nas áreas ambiental e médica (ARPAL, 2004; SHIH; VAN, 2001; TANIGUCHI *et al.*, 2005), podendo ainda segundo Shih e Van (2001) ser utilizado como agente anti-envelhecimento ou potencializador de textura em produtos de padaria.

O γ -PGA é capaz de aumentar a absorção do cálcio pelo intestino delgado quando o mineral é administrado por via oral. Noguchi *et al.* (2001) apontam três explicações possíveis para esse fato: a primeira é que o γ -PGA inibe a formação de complexo insolúvel de cálcio com outras substâncias e assim aumenta a sua absorção pelo intestino ; a segunda explicação possível é que o γ -PGA aumenta a solubilidade do cálcio e facilita seu transporte através das paredes do intestino; a última possibilidade é que o γ -PGA retarde o tempo de trânsito do alimento no intestino, e assim o cálcio teria mais tempo para ser absorvido. Assim, em alimentos funcionais, sais de cálcio do γ -PGA poderiam ser adicionados para aumentar a concentração de Ca^{2+} , que poderiam ser administrados na prevenção da osteoporose (SUNG, *et al.*, 2005).

No Brasil, a Ajinomoto Co. já comercializa tais produtos funcionais a base de γ -PGA e sais de cálcio, o Calvital e o Caltake (AJINOMOTO, 2006), enquanto que a Nippon Polyglu Co., indústria também japonesa comercializa um suplemento funcional de γ -PGA com extrato de malte (NIPPON POLY-GLU, 2006).

O γ -PGA também é utilizado em vacinas para produzir anticorpos contra o anthrax (WIMER-MACKIN, 2005 APUD BUESCHER; MARGARITIS, 2007). Esses mesmos autores destacam outras possibilidades de uso do γ -PGA, como absorvedor de água para agricultura, horticultura e engenharia civil.

Mitsuki *et al.* (1998) aponta a atividade crioprotetora do γ -PGA, que aliado a seu fraco sabor não altera o sabor final de alimentos congelados, por exemplo. Sais orgânicos e aminoácidos possuem criogenia, mas podem alterar o sabor do alimento. Ou seja, o γ -PGA consegue reduzir o ponto de congelamento e a quantidade de gelo formado no processamento, sem alterar o sabor final do produto.

Em tratamento de água o γ -PGA pode ser usado como floculante ou como quelante de metais, removendo os metais pesados e os radionucleotídeos. (SHIH, VAN, 2001). Devido a sua solubilidade em água, o γ -PGA é forte candidato a substituir os atuais

floculantes que existem no mercado (poliacrilamida e ácidos poliacrílicos), que se caracterizam por se degradar na água e por gerar substâncias tóxicas (ARPAL, 2004).

3.4.3 Síntese de γ -PGA

Os nutrientes necessários para a produção do γ -PGA variam de acordo com a cepa utilizada (SHIH, VAN, 2001). Algumas cepas necessitam da adição de L-glutamato no meio de cultivo, como precursor, para o crescimento celular e outras não (KAMBOUROVA *et al.*, 2001). Além disso, o tipo de fonte de carbono e de nitrogênio, a aeração e o pH inicial do meio de cultivo, a umidade e o tempo de reação afetam a produtividade e qualidade do γ -PGA (SHIH, VAN, 2001).

Xu *et al.* (2005) apontaram duas origens das unidades monoméricas de ácido glutâmico para a formação do γ -PGA: uma seria através do próprio ácido glutâmico ou podem ser sintetizadas a partir de precursores adicionados ao caldo de cultivo, como a glicose.

Quando a síntese do γ -PGA ocorre através da glicólise e ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) a glicose é metabolizada produzindo ácido α -cetoglutárico, que é precursor direto do ácido L-glutâmico. Porém, se as células estiverem supridas de ATP, ou seja, se houver excesso de fonte de carbono, parte desse carbono será convertido a polissacarídeos, também através do ciclo TCA e da gliconeogênese. O ácido L-glutâmico também pode ser produzido pelo TCA a partir do ácido cítrico, que é convertido a ácido isocítrico e depois a ácido α -cetoglutárico (SHIH, VAN, 2001; GOTO; KINIOKA, 1992).

O ácido cítrico é produzido atualmente no Brasil por vir fermentativa por produtores como a Cargill. Os substratos utilizados são em geral milho e açúcar, através do *Aspergillus niger*. Seu custo pode chegar a R\$ 4,4/kg. Pesquisas para otimização e redução de custo no processamento de ácido cítrico tem sido reveladas, já que é muito utilizado pelas indústrias de alimentos, refrigerantes, sucos de frutas e produtos farmacêuticos. Como precursor de outras fermentações também tem sido reportado como componente essencial de tais reações.

Algumas companhias que produzem comercialmente o ácido γ -poliglutâmico são a Ajinomoto Co., a Nippon Poly-glu Co. e a Natto Biosciences, todas localizadas no

continente asiático. A Ajinomoto Co., nitidamente com foco em alimentos para a saúde, oferece dois produtos funcionais a base de PGA e sais de cálcio (AJINOMOTO, 2006). A Nippom Poly-glu Co. comercializa produtos para tratamentos de águas e suplementos funcionais a base de γ -PGA (NIPPON POLY-GLU, 2006). A Natto Biosciences produz o γ -PGA e derivados como insumos para fins variados, em aplicações que podem ser desenvolvidas em conjunto com o cliente (NATTO BIOSCIENCES, 2008). O preço de venda desse produtos pode variar entre U\$ 1- 9,99/kg, sem adição de frete de importação e impostos.

Se o polímero está associado à superfície da bactéria e forma uma cápsula, o complexo enzimático correspondente é denominado Cap (cápsula), enquanto que é denominado de Pgs (poliglutamato-sintetase) se o γ -PGA é liberado. CapB/PgsB e CapC/PgsC estão diretamente envolvidos na síntese, enquanto CapA/PgsA e CapE/PgsE são requeridos para o transporte. Em cultivos de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, o γ -PGA encontra-se no meio extracelular, sendo a liberação do polímero provavelmente facilitada pelo PgsS (CANDELA; FOUET, 2006).

O complexo de formação do γ -PGA foi descrito por Ashiuchi et al. (2004; 2001a), e pode ser visto na Figura 3. Inicialmente o ácido glutâmico se liga a molécula de ATP, que é convertida a ADP, fornecendo energia para a polimerização. O complexo PgsBCA age como uma amida-ligase, sendo que as subunidades PgsB e PgsC formam juntas um sítio catalítico e a subunidade PgsA remove a cadeia do sítio ativo e permite que um novo monômero seja adicionado. A presença do cátion Mg^{2+} é essencial para a atividade do complexo PgsBCA e a presença de Zn^{2+} aumenta ainda mais essa atividade; Fe^{2+} e Ca^{2+} são inibidores do complexo e Mn^{2+} aparentemente não exerce nenhuma influência.

Xu, Chen e Yu (2005) avaliaram a utilização de diversos resíduos/subprodutos agroindustriais como substratos para obtenção de γ -PGA por FES. Os autores obtiveram a produção de 83,61 g/kg (b.s.), quando otimizaram meio constituído de uma mistura de farinha de torta de soja e fibra de trigo em proporção de 11:9, suplementada com ácido glutâmico, ácido cítrico e NH_4NO_3 . Neste trabalho, foi utilizada uma nova linhagem (*B. subtilis* CCTCC202048), sendo os ensaios conduzidos em frascos de 250 mL com 20 g de meio, a 40°C por 42 horas.

B. subtilis CCTC202048 também foi testado para obtenção de γ -PGA. Foi utilizado planejamento experimental de forma a otimizar o meio de cultivo que foi constituído de resíduos agroindustriais, ácido cítrico, ácido glutâmico e MnSO_4 (CHEN *et al.*, 2005).

4. Material e Métodos

4.1. Microrganismo

As linhagens estudadas neste trabalho foram: *Bacillus subtilis* NRRC 351, *Bacillus velezensis* NRRC 23189 e *Bacillus subtilis* NRC 41289.

4.1.1. Manutenção das culturas

As culturas de *Bacillus* foram replicadas em tubos inclinados, contendo meio agar BHI (Brain Heart Infusion), previamente esterilizados a 121 °C, mantidos a temperatura de 37°C por 24 horas, sendo posteriormente armazenados sob refrigeração até sua utilização.

4.1.2. Estudo de crescimento do microrganismo

Para definir o microrganismo que melhor se desenvolveria em caldo BHI (Brain Heart Infusion), foi feito um estudo comparativo de crescimento em shaker, a 180 rpm e 37°C por 24 horas. O crescimento celular foi determinado indiretamente pela medida da absorvância a 660 nm, espectrofotômetro UV-VIS de marca HACH modelo DR-4000.

O inóculo foi preparado em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 25 mL de caldo BHI, previamente esterilizado a 121°C. Uma alçada do microrganismo foi transferida para cada um dos frascos e posteriormente colocado em agitador orbital (shaker) a 180 rpm, 37°C por 24 horas.

4.2. Meio sólido para FES

O meio sólido utilizado para fermentação foi o sub-produto fibroso de soja e a casca de arroz. A umidade inicial do meio foi previamente ajustada para 60%. O substrato passou por processo de esterilização a 121 °C por 15 minutos.

4.3. Fermentação

O método de fermentação empregado foi FES (Fermentação em Estado Sólido). Foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 250 mL (FIGURA 4) contendo inicialmente 10 g dos substratos nas proporções citadas no item 4.4.1. As cepas de *Bacillus* foram inoculadas a uma concentração de 5% (v/m). A temperatura adotada e o tempo ideal de fermentação foram definidos através de planejamentos experimentais.



Figura 4. Fermentação em frascos de Erlenmeyer de 250 mL.

4.4. Planejamento Experimental

4.4.1. Ensaio preliminares para a produção de γ -PGA

A fermentação foi conduzida a 37°C, usando como fonte de carbono subproduto fibroso de soja e casca de arroz, nos níveis de 10:0; 9:1; 8:2; 7:3 (sub-produto de soja: casca de arroz), buscando uma melhor descompactação da massa no leito das partículas. Também foi adicionado 5% (v/m) de solução de sais, apresentado na Tabela 1, sempre tomando a alíquota após agitação da solução/suspensão para manter as alíquotas uniformes. A umidade e pH inicial foram corrigidos até 60% e 7,2 respectivamente, antes da esterilização, conforme Wang *et al.*, (2008). Os substratos foram autoclavados a 121°C

e posteriormente inoculados com 5% (volume de inóculo/massa de meio sólido), sendo em seguida incubados em câmara a 37 °C, por 48 horas.

Tabela 2. Solução/suspensão de sais nutrientes.

Componentes	Concentração (g/L)
MgSO ₄ (g/L)	1
CaCl ₂ (g/L)	0,30
FeCl ₃ (g/L)	0,08
MnSO ₄ (g/L)	0,104
K ₂ HPO ₄ (g/L)	0,6

4.4.2. Planejamento por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR 2⁴)

Para este estudo as fermentações foram feitas de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para quatro variáveis (2⁴, acrescido de 8 ensaios axiais e 4 repetições no ponto central, totalizando 28 ensaios). As concentrações de sais, ácido cítrico, umidade e pH utilizados nos meios dos ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 3, com a variável resposta Produção de γ -PGA sendo avaliada no tempo 48 horas de fermentação.

Tabela 3. Tabela de níveis das variáveis para o planejamento DCCR 2⁴.

Variáveis/Níveis	-2	-1	0	+1	+2
Umidade (%)	55	60	65	70	75
pH	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5
Sais* (g/kg)	0	0,02	0,04	0,06	0,08
Ácido Cítrico (g/kg)	0	0,5	1,0	1,5	2,0

A solução de sais consistiu em 1g de $MgSO_4$, 0,30 g de $CaCl_2$, 0,08g de $FeCl_3$, 0,104g de $MnSO_4$ e 0,6g de K_2HPO_4 dissolvidos e medidos sob agitação em água deionizada. A fermentação foi mantida a 37°C e ficou estabelecida pelos ensaios anteriores em (9g de farelo de soja + 1g de casca de arroz) e inoculados com 5% de inóculo (cultivado por 48 horas em BHI).

4.5. Metodologias Analíticas

4.5.1. Extração e quantificação de ácido γ -poliglutâmico

Para a determinação de γ -PGA, o meio de cultivo foi submetido inicialmente à extração com água destilada à temperatura ambiente, usando proporção de meio fermentado/água destilada de 1:10 (m/v), em agitador orbital a 150 rpm por 1 hora (adaptado de CHEN *et al.*, 2005).

A quantificação do ácido γ -poliglutâmico foi feita segundo o método espectrofotométrico de complexação com o brometo de cetiltrimetilamônio, adaptado de Kanno e Takamatsu (1995). Para a construção da curva padrão foi utilizado γ -PGA (MM: 70-100 kDa, Sigma-Aldrich), sendo sua absorvância medida em 400 nm.

De acordo com essa metodologia, uma solução de ácido tricloroacético foi adicionada ao meio de cultivo para reduzir o pH até 3,0 e precipitar as células microbianas e proteínas. A seguir, a mistura foi centrifugada a 2300 g e 4°C por 20 minutos. O sobrenadante foi recolhido, o pH ajustado em 7,0 e cinco volumes de etanol absoluto foram adicionados. O precipitado resultante foi coletado por centrifugação a 2300 g e 4°C por 20 minutos. A etapa de adição de etanol e centrifugação foi realizada duas vezes. Após a segunda centrifugação, o precipitado foi dissolvido em tampão pH 7,0 \pm 0,1 e submetido à reação de complexação com brometo de cetiltrimetilamônio. A metodologia está apresentada de forma mais detalhada no Apêndice A.

4.5.2. Determinação de biomassa seca

Para a determinação de biomassa seca, o meio de cultivo foi submetido inicialmente à extração com água destilada à temperatura ambiente, em proporção de meio fermentado/água destilada de 1:10 (m/v), baseado na massa seca inicial do substrato, em agitador orbital a 150 rpm por 1 hora (adaptado de CHEN *et al.*, 2005). O meio foi filtrado para retirada de partículas sólidas. Amostras de 10 mL da fase aquosa contendo massa celular em fase aquosa foram centrifugadas a 2300g durante 15 minutos, em centrífuga EXCELSA BABY II modelo 206-R, obtendo-se duas fases; a massa celular decantada e a fase aquosa livre de células. O sobrenadante foi retirado do tubo. A massa precipitada foi lavada duas vezes com água destilada e novamente precipitada por centrifugação, sendo seca a 65°C até peso constante em estufa a vácuo SUPRILAB, modelo GST-920. Os resultados finais foram expressos em g/Kg.

4.5.3. Determinação do pH

Cada amostra teve seu pH medido e/ou ajustado antes e após a fermentação e consequente produção de γ -PGA através de potenciômetro digital, marca DIGIMED, modelo DM20.

4.5.4. Cromatografia em camada delgada

Para a cromatografia, o meio de cultivo foi submetido inicialmente à extração com água destilada à temperatura ambiente, numa proporção de meio fermentado/água destilada de 1:10 (m/v), em agitador orbital a 150 rpm por 1 hora (adaptado de CHEN, *et al.*, 2005). A suspensão meio fermentado/água destilada foi filtrada para retirada de partículas sólidas. Em uma amostra de 10 mL do filtrado, foi adicionado 4 volumes de etanol a 4°C. A rede formada indica a presença de γ -PGA. A rede foi cuidadosamente retirada do meio com auxílio de espátula e assim levada para o processo de cromatografia em camada delgada para análise de aminoácidos livres, usando como padrão solução de ácido glutâmico e água.

O γ -PGA obtido foi purificado e hidrolisado com HCl 6N a 110°C por 6 horas em tubo fechado. Sua identificação foi feita em cromatografia em camada delgada (CCD) em sílica

gel 60, com fase móvel butanol-ácido acético-agua (3:1:1). Os aminoácidos foram detectados com solução de ninidrina 2%.

5. Resultados e Discussões

5.1. Caracterização do substrato

A Tabela 4 mostra a caracterização do substrato casca de arroz.

Tabela 4. Composição da casca de arroz utilizada como substrato no presente trabalho.

Amostra	Umidade (%) [*]	Proteína (%) [*]	Lipídeos (%) [*]
Casca de Arroz	10,96 ± 0,22	17,16 ± 1,82	4,67 ± 0,28

*médias em triplicatas

5.2. Efeito da temperatura no crescimento dos microrganismos produtores de γ -PGA em meio BHI – Preparo do inóculo.

Foram avaliadas as melhores condições de desenvolvimento para as bactérias *Bacillus* (NRRC351, NRRC23189 E NRRC41289) em caldo BHI (Brain Heart Infusion). Pode-se observar através das Figuras 5 e 6, as curvas de crescimento microbiano em duas temperaturas distintas. A 37°C a fase de crescimento exponencial foi alcançada em menos de 6 h com fase lag relativamente curta. Já a 30°C o início da fase de crescimento exponencial só foi alcançada com aproximadamente 8 h de cultivo. As amostras foram coletadas em intervalos de tempo com leitura da absorbância a 660 nm.

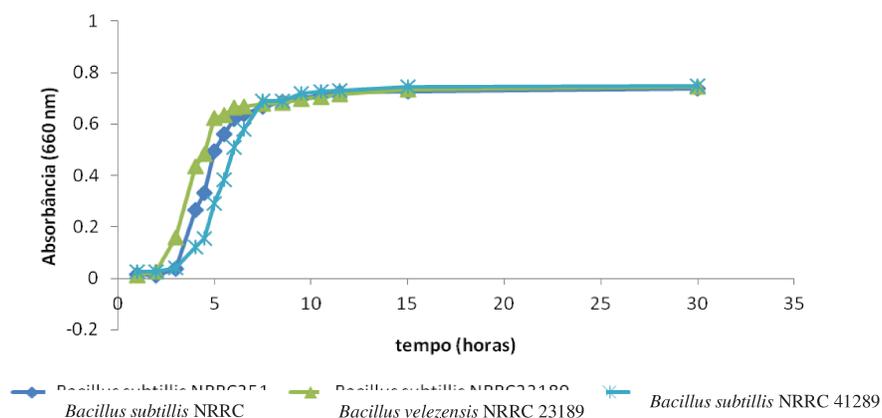


Figura 5. Curvas de crescimento microbiano em caldo BHI em cultivos conduzidos a 37°C e 180 rpm.

Silva (2010) utilizou o Caldo LB como meio de obtenção do inóculo com 12 h de propagação e encontrou valores de concentração celular pouco superiores aos encontrados neste trabalho, em cultivo a 37°C e concentração celular determinada pela absorvância a 660nm. Embora se tenha encontrado valores de concentrações celulares próximas ao final da curva de crescimento nos cultivos a 30°C e 37°C, decidiu-se utilizar temperatura de 37°C e tempo mínimo de 12 horas para os inóculos de todos os ensaios, para assegurar a uniformidade dos mesmos.

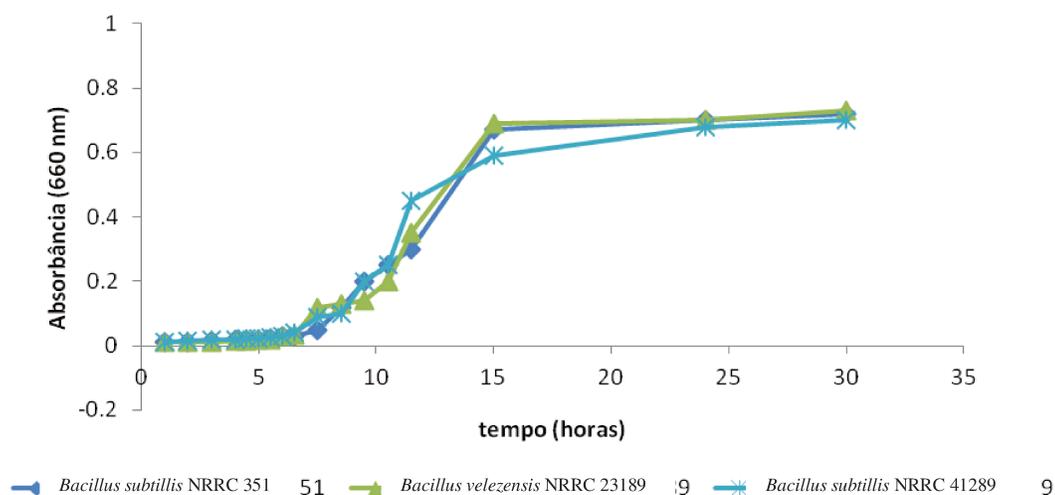


Figura 6. Curvas de crescimento microbiano em caldo BHI em cultivos conduzidos a 30°C e 180 rpm.

5.3. Seleção da melhor linhagem de *Bacillus* produtora de γ -PGA e influência da descompactação do meio.

Através da Figura 7 é possível observar a concentração de γ -PGA obtida após cultivo de 48 h para as 3 linhagens de *Bacillus*. As três linhagens apresentaram habilidade para a produção do polímero, mas a NRRC 23189 foi a que mostrou melhor produção, sendo assim a de maior potencial para continuidade nos ensaios. A maior produção encontrada (3,2%, p/p) foi com a composição 9:1 (sub-produto de soja/casca de arroz). Definiu-se então como mistura ideal a ser utilizada nos ensaios posteriores. Com o aumento da adição de casca de arroz nos ensaios seguintes 8:2 e 7:3 (sub-produto de soja/casca de arroz) foi observado uma redução gradativa na produção do polímero a medida que se aumentava a quantidade de casca de arroz. Os meios sem casca de arroz

apresentaram menor produção de γ -PGA. Esse fato deveu-se à alta compactação da mistura, nos ensaios sem casca de arroz, uma vez que sem espaços vazios no leito de células os microrganismos ficam restritos a fermentar áreas menores.

Maiores massas de γ -PGA foram encontrados por Wang *et al.*, (2008), sendo o pico de produção e produtividade de γ -PGA foi alcançado em 42 h de cultivo com concentração de 3,63% (p/p), utilizando resíduo de soja e batata doce em cultivo sólido, observando ainda um provável consumo de γ -PGA pelo próprio microrganismo produtor, a partir deste ponto.

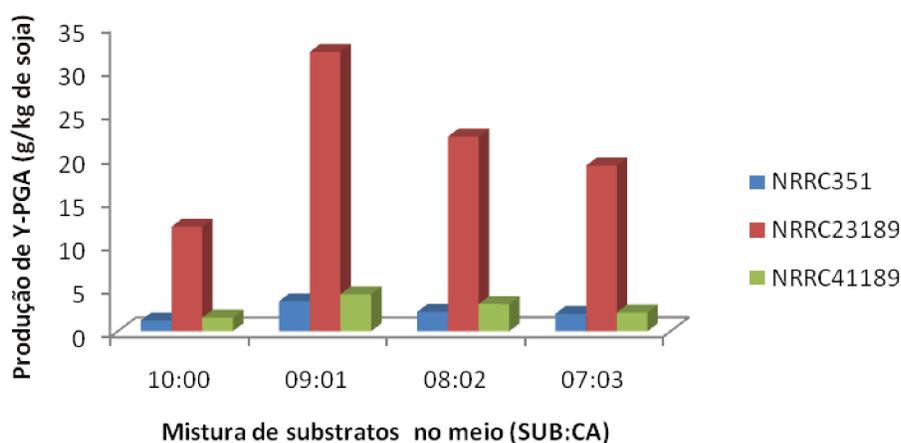


Figura 7. Efeito da mistura de substratos no meio de cultura na produção de γ -PGA em 48 h de cultivo. (SUB: sub-produto de soja, CA – casca de arroz).(Concentração de γ -PGA calculada em relação a porcentagem de substrato adicionado em cada ensaio (base seca)).

A Figura 8 ilustra os perfis de produção de γ -PGA, envolvendo os três microrganismos utilizados, ficando confirmada a maior produção pela linhagem *B. velezensis* NRRC 23189, com máxima produção em 48 horas de fermentação, produzindo 32 g/kg de substrato. Chen *et al.*, (2005), utilizando fermentação em estado sólido de resíduo de soja e dejetos suínos também observaram concentração máxima de células viáveis em 42 horas e decréscimo da concentração de γ -PGA a partir de 48 horas, quando seu pico foi de 6% (p/p). No entanto, essa concentração foi obtida com suplementação do meio com ácido glutâmico, precursor na formação do γ -PGA.

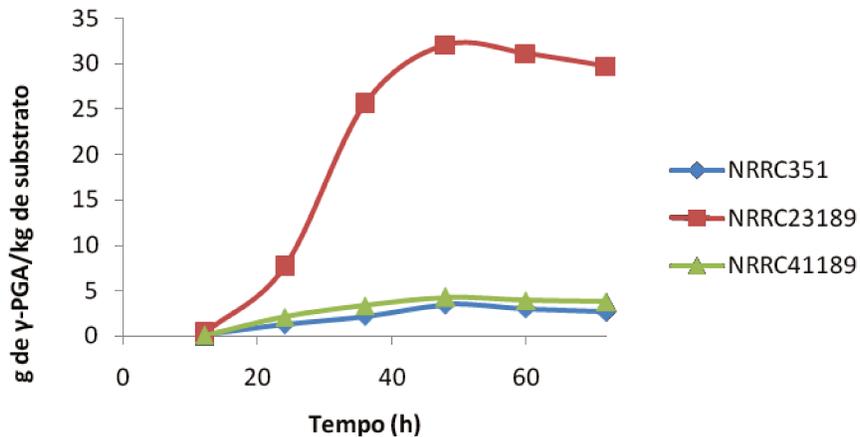


Figura 8. Produção de γ -PGA durante o processo fermentativo na proporção 9:1 (SUB:CA). SUB – sub-produto de soja, CA – casca de arroz. (Concentração de γ -PGA calculada em cima da porcentagem de substrato adicionado em cada ensaio (base seca)).

Os dados de produção de biomassa estão apresentados na Figura 9. O pico de produção de γ -PGA ocorreu no início da fase estacionária de crescimento, acompanhando a produção de γ -PGA, provavelmente pela hidrólise e consumo do mesmo pelo próprio microrganismo produtor. Nota-se também que a linhagem NRRC 23189, produziu biomassa mais rápido do que as demais, máxima de 1,32 g/L de biomassa.

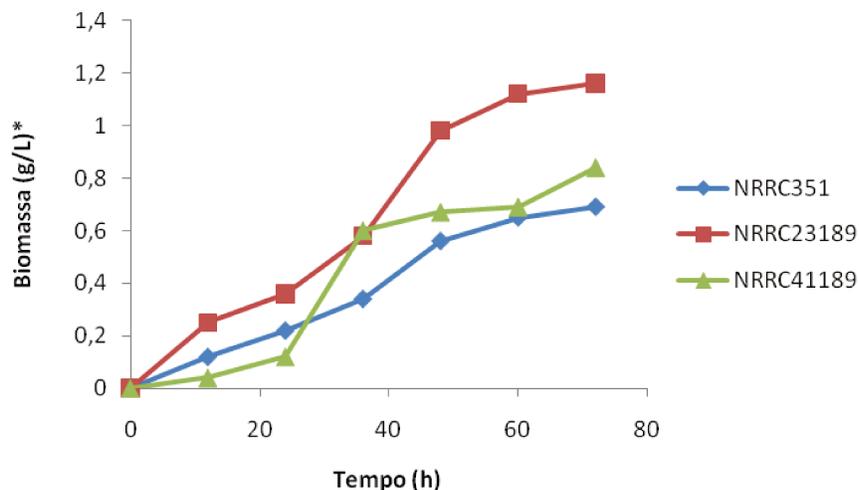


Figura 9. Produção de biomassa durante o processo fermentativo para as três linhagens a 37°C.

A Figura 10 (A e B) ilustra a biomassa produzida após 48 horas de fermentação. Pode-se notar a presença de γ -PGA (substância esbranquiçada) que envolve principalmente os locais onde há poros maiores que são mais aerados. Nota-se também, que nos locais mais compactados, não é observada a presença de massa microbiana e γ -PGA, confirmando a necessidade da aeração do meio de cultivo.



(A)



(B)

Figura 10. Erlenmeyer com meio contendo Sub-produto Fibroso de Soja e Casca de Arroz, fermentado por *B. velezensis* NRRC 23189, por 48 h. Vista do fundo do Erlenmeyer (A) e vista frontal (B).

O γ -PGA extraído do meio conforme metodologia descrita no item 3.5.1, pode ser vista na Figura 11. Após adição de álcool etílico a 4°C, imediatamente têm-se a formação de uma rede emaranhada de coloração branca.



(A)



(B)

Figura 11. Extração de γ -PGA, Becker contendo meio antes da adição de álcool etílico (A) a 4°C e após adição de álcool (B).

5.4. Influência da temperatura e tempo na produção de γ -PGA .

Para verificar o efeito da temperatura sobre a produção de γ -PGA, foram feitas fermentações de meio constituído por nove partes de farelo desengordurado de soja e uma parte de casca de arroz. A Figura 12 (A e B) mostra a produção de γ -PGA em função do tempo de fermentação em temperaturas de 25, 30, 35 e 37°C.

Observa-se que os ensaios 2 e 4 (Figura 12 A) apresentaram produção de γ -PGA bem maior que os outros ensaios, em 50 horas de fermentação, em temperaturas de 35 e 37°C, respectivamente. O melhor resultado ocorreu a 37°C (ensaio 4 da Figura 12.A), que apresentou concentração de γ -PGA cerca de 23% maior que no ensaio a 35°C (ensaio 2). Nas temperaturas de 25 e 30°C a concentração de γ -PGA foi pequena, atingindo menos de 20% da concentração obtida a 37°C.

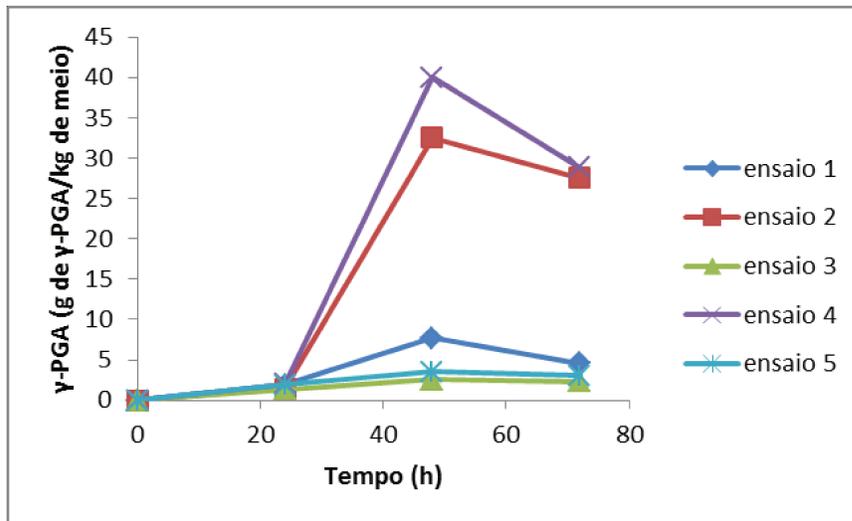
Comparando estas curvas de produção de γ -PGA com as curvas de crescimento do *B. velezensis* NRRL 23189 das Figuras 5 e 6, observa-se que a 35°C o microrganismo apresentou maior fase lag de cerca de 10 horas, enquanto a produção de γ -PGA ocorreu a partir da vigésima quarta hora de fermentação, mostrando que a produção de γ -PGA nesta temperatura é não associada ao crescimento celular. A 37°C observa-se fato semelhante. A partir de 48 horas de fermentação observa-se que ocorreu pequena redução da concentração de γ -PGA nos ensaios 2 e 4, mostrando que houve consumo de polímero pelo microrganismo, provavelmente para utilizá-lo, porém, torna-se difícil concluir se ele foi utilizado com fonte de carbono e/ou fonte de nitrogênio.

Chen *et al.*, (2005b) otimizaram o meio de cultivo contendo estrume suíno, farelo de trigo, torta de soja e ácido glutâmico, ácido cítrico e $MnSO_4$, produzindo em média 60 g de γ -PGA por kg de substrato, em base seca (1,25 g/kg.h). Para fermentação de 15g de meio as condições ótimas de cultivo foram: 60% de umidade do meio, pH inicial 9,0, 4% de inóculo, 37 °C em 48 horas de fermentação como o tempo ideal para a produção do polímero.

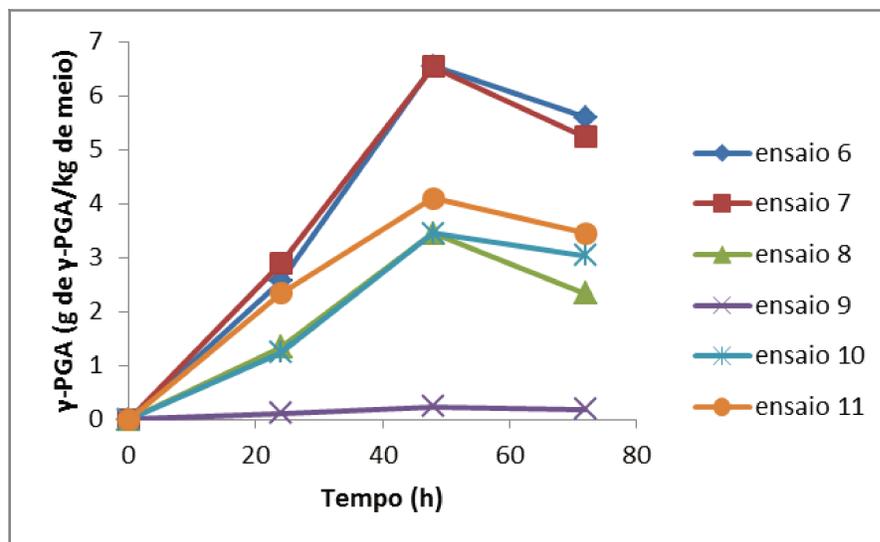
De acordo com Schreier, 1993 *apud* Candela e Fouet (2006), o γ -PGA é um composto de reserva para precursores de carbono e nitrogênio ou fonte de energia, ou seja, quando o substrato do meio é cessado os microrganismos começam a utilizar o γ -PGA como fonte de energia e assim tem-se início a degradação do biopolímero.

A Figura 13 mostra a variação do pH durante as fermentações dos ensaios do planejamento completo DCCR 2². Os ensaios seguiram o mesmo padrão de alcalinização do meio com o decorrer da fermentação, provavelmente por produção de amônia no meio.

Moraes *et al.* (2012) avaliaram a produção de γ -PGA por meio de cultivo líquido com diferentes concentrações de melaço, ácido cítrico e sulfato de amônio. A máxima produção foi alcançada com meio contendo 200 g/L de melaço, 12,5 g/L de ácido cítrico e sulfato de amônio (8 g/L).



(A)



(B)

Figura 12. Produção de γ -PGA por *Bacillus velezensis* NRRL 23189 em meio constituído de farelo desengordurado de soja e casca de arroz. A) Ensaios 2, 4, 6, 8 e 10. B) 1,3, 5, 7 , 9 e 11.

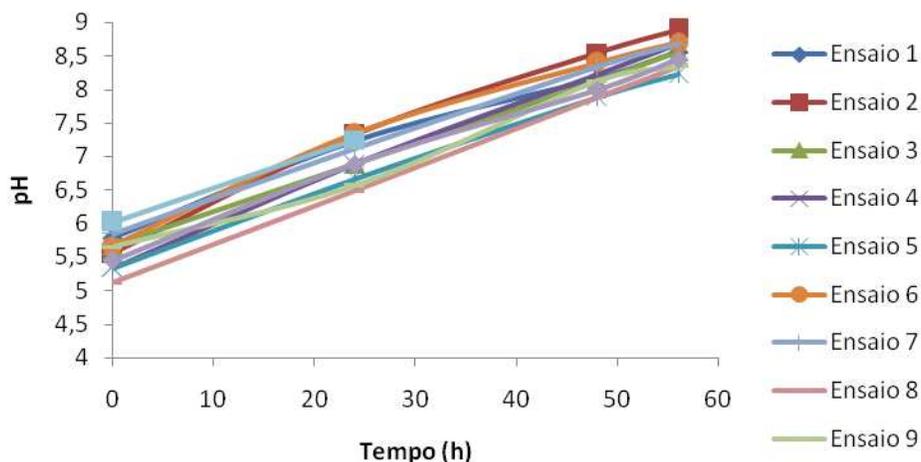


Figura 13. Variação de pH no decorrer das fermentações dos ensaios preditos .

5.5. Influência da adição de sais, ácido cítrico, umidade e pH inicial do meio na produção de γ -PGA.

A matriz dos ensaios com os valores reais das variáveis estudadas, bem como as respostas obtidas para a produção de γ -PGA estão apresentadas na Tabela 5. O tempo de fermentação foi de 48 h.

A Tabela 6 mostra os coeficientes de regressão para as variáveis X_1 , X_2 , X_3 E X_4 e suas interações significativas e a Figura 16 mostra o Gráfico de Pareto dos principais efeitos, tendo como resposta a produção de γ -PGA em 48 horas de fermentação, ou seja com p-valores menores que 10% ($p \leq 0,1$).

Tabela 5. Matriz dos ensaios gerada pelo Delineamento Composto Central Rotacional DCCR4 com seus níveis reais e codificados e a resposta produção de γ -PGA (g/kg) em 48 horas de fermentação.

Ensaio	Umidade (%)	pH	Sais (g/kg)	Ácido Cítrico (g/kg)	γ-PGA (g/kg de substrato)
1	-1 (60)	-1 (6,0)	-1 (0,02)	-1 (0,5)	27,175
2	+1 (70)	-1 (6,0)	-1 (0,02)	-1 (0,5)	17,307
3	-1 (60)	+1 (7,0)	-1 (0,02)	-1 (0,5)	25,009
4	+1 (70)	+1 (7,0)	-1 (0,02)	-1 (0,5)	15,140
5	-1 (60)	-1 (6,0)	+1 (0,06)	-1 (0,5)	46,191
6	+1 (70)	-1 (6,0)	+1 (0,06)	-1 (0,5)	18,991
7	-1 (60)	+1 (7,0)	+1 (0,06)	-1 (0,5)	21,011
8	+1 (70)	+1 (7,0)	+1 (0,06)	-1 (0,5)	17,789
9	-1 (60)	-1 (6,0)	-1 (0,02)	+1 (1,5)	15,140
10	+1 (70)	-1 (6,0)	-1 (0,02)	+1 (1,5)	23,083
11	-1 (60)	+1 (7,0)	-1 (0,02)	+1 (1,5)	13,456
12	+1 (70)	+1 (7,0)	-1 (0,02)	+1 (1,5)	9,845
13	-1 (60)	-1 (6,0)	+1 (0,06)	+1 (1,5)	23,083
14	+1 (70)	-1 (6,0)	+1 (0,06)	+1 (1,5)	36,803
15	-1 (60)	+1 (7,0)	+1 (0,06)	+1 (1,5)	34,878
16	+1 (70)	+1 (7,0)	+1 (0,06)	+1 (1,5)	30,064
17	-2 (55)	0 (6,5)	0 (0,04)	0 (1,0)	17,788
18	+2 (75)	0 (6,5)	0 (0,04)	0 (1,0)	18,678
19	0 (65)	-2 (5,5)	0 (0,04)	0 (1,0)	26,453
20	0 (65)	+2 (7,5)	0 (0,04)	0 (1,0)	31,027
21	0 (65)	0 (6,5)	-2 (0,00)	0 (1,0)	35,118
22	0 (65)	0 (6,5)	+2 (0,08)	0 (1,0)	32,952
23	0 (65)	0 (6,5)	0 (0,04)	-2 (0,0)	34,878
24	0 (65)	0 (6,5)	0 (0,04)	+2 (2,0)	36,322
25	0 (65)	0 (6,5)	0 (0,04)	0 (1,0)	38,488
26	0 (65)	0 (6,5)	0 (0,04)	0 (1,0)	38,007
27	0 (65)	0 (6,5)	0 (0,04)	0 (1,0)	38,248
28	0 (65)	0 (6,5)	0 (0,04)	0 (1,0)	38,234

Tabela 6. Coeficientes de regressão para as variáveis e suas interações significativas.

	Coef. De Regressão	Erro padrão	t(23)	p valor	Lim. Conf. -90%	Lim. Conf. +90%
Média	33,90	2,30	14,75	0,00	29,96	37,84
X₁ (Q)	-5,23	1,41	-3,72	0,001	-7,65	-2,82
X₂ (Q)	-2,61	1,41	-1,85	0,08	-5,02	-0,19
X₃ (L)	3,26	1,48	2,19	0,04	0,72	5,81
X₁ * X₄	3,96	1,81	2,18	0,04	0,85	7,08

*p ≤ 0,10; L: termos lineares; Q: termos quadráticos; X₁: Umidade (%); X₂: pH; X₃: Concentração de sais (g/kg) e X₄: Concentração de ácido cítrico (g/kg).

A Figura 14 mostra o gráfico de Pareto dos principais efeitos, tendo como resposta a produção de γ -PGA em 48 horas de fermentação.

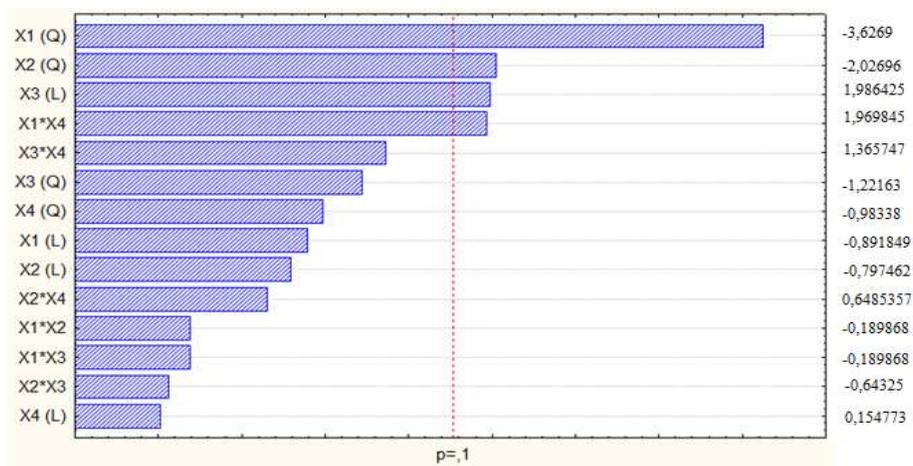


Figura 14. Gráfico de Pareto dos efeitos principais, tendo como variável resposta a produção de γ -PGA em 48 horas de fermentação.

A única interação significativa no planejamento foi entre umidade e ácido cítrico ($X_1 * X_4$). Com o objetivo de determinar os valores ótimos para as variáveis independentes, um modelo de segunda ordem foi obtido a partir da regressão múltipla dos dados do DCCR. Todos os parâmetros significativos foram considerados no ajuste do modelo, apresentado na Equação 2.

$$y = 33,90 - 5,23 X_1^2 - 2,61 X_2^2 + 3,26 X_3 + 3,96 X_1 X_4 \quad (2)$$

onde y é a resposta predita (produção de γ -PGA, g/kg de substrato) e X_1 , X_2 , X_3 e X_4 , são respectivamente as variáveis independentes: Umidade, pH inicial, concentração de sais e concentração de ácido cítrico.

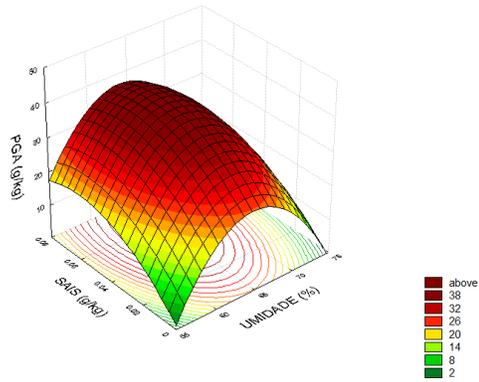
Os parâmetros não significativos foram incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 7. O F calculado para a regressão foi pouco superior ao tabelado, daí o motivo de coeficiente de variação R^2 mais baixo.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para a produção e γ -PGA (g/kg de substrato) em 48 horas, referente a matriz do delineamento (DCCR).

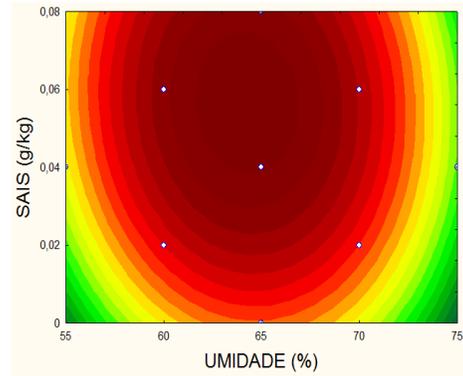
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	F calculado
Regressão	2028,49	14	144,89	2,24
Resíduo	841,45	13	64,73	
Falta de ajuste	841,33	10	84,13	2175,85
Erro Puro	0,116	3	0,04	
Total	2869,94	27		

$R^2 = 0,67$

Como o F calculado para a regressão foi significativo, maior que o F tabelado, e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 \approx 67\%$). Podemos concluir que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais, sendo possível construir a superfície de resposta representada pela Figura 15, e ainda por se tratar de um processo fermentativo complexo em meio sólido.

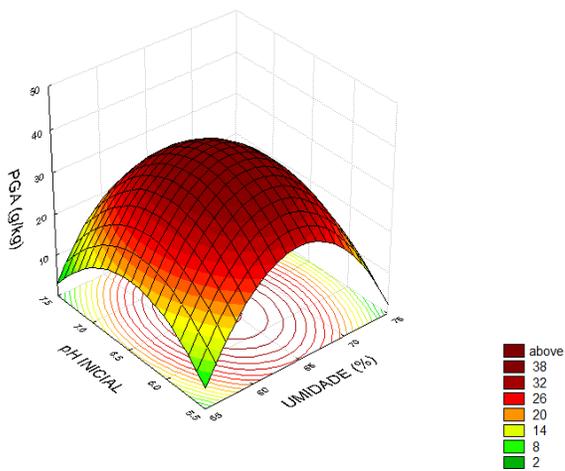


(A)

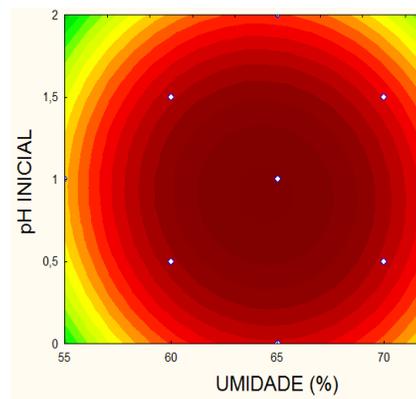


(B)

Figura 15. Superfície de resposta e curvas de contorno para a produção de γ -PGA. (A) e (B) umidade versus sais



(C)



(D)

Figura 16. Superfície de resposta e curvas de contorno para a produção de γ -PGA. (C) e (D) Umidade versus pH inicial.

É possível observar pelas curvas de contorno B e D das Figuras 19 e 20, respectivamente, que a faixa ótima de umidade para a máxima produção de γ -PGA está entre 63% e 67%, quando sobrepostas com adição de sais e ajuste de pH inicial. Valores próximos foram encontrados por Bajaj, *et al.*, (2008) que usaram torta de soja em fermentação sólida e obtiveram, máxima produção de 90,8 g/kg de substrato em 72 horas de fermentação, com o *B. licheniformis* NCIM 2324, a 37°C, 65% de umidade e meio suplementado com ácido glutâmico.

Em relação a faixa ideal de adição de sais, têm-se um valor entre 0,04 e 0,07 g/kg, podendo ser fixado em 0,04 g/kg, garantindo redução de custo do processo.

Wang *et al.* (2008), testaram torta de soja e resíduo de batata doce, em fermentação em estado sólido, conduzida a 37°C, umidade inicial corrigida a 60% e pH inicial 7,2. Sua máxima produção ocorreu em 42 horas, obtendo 3,63% (p/p), quando utilizou 0,5 g/kg $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0,15 g/kg $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 0,04 g/kg $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$, 0,104 g/kg $MnSO_4 \cdot H_2O$ como sais nutrientes do microrganismo.

A forte influência do pH sobre a produção de γ -PGA também já havia sido reportada em fermentação com outras linhagens de *Bacillus* (RICHARD; MARGARITIS, 2003a; CROMWICK; BIRRER; GROSS, 1996). Richard e Margaritis (2003a) encontraram as maiores produções de γ -PGA por *B. subtilis* IFO 3335 nas fermentações onde a faixa de pH foi observada entre 6,5 e 7,5. Neste estudo foram encontrados os valores máximos de produção em pH inicial entre 6,0 e 6,5.

A única interação significativa para este planejamento está exposta na Figura 17. A superfície de resposta gerada nos indica que o acréscimo de ácido cítrico entre os níveis reais de 0,3 g/kg a 1,5 g/kg, influenciou a produção de γ -PGA, de forma a ser fixada no menor nível para redução de custo do processo.

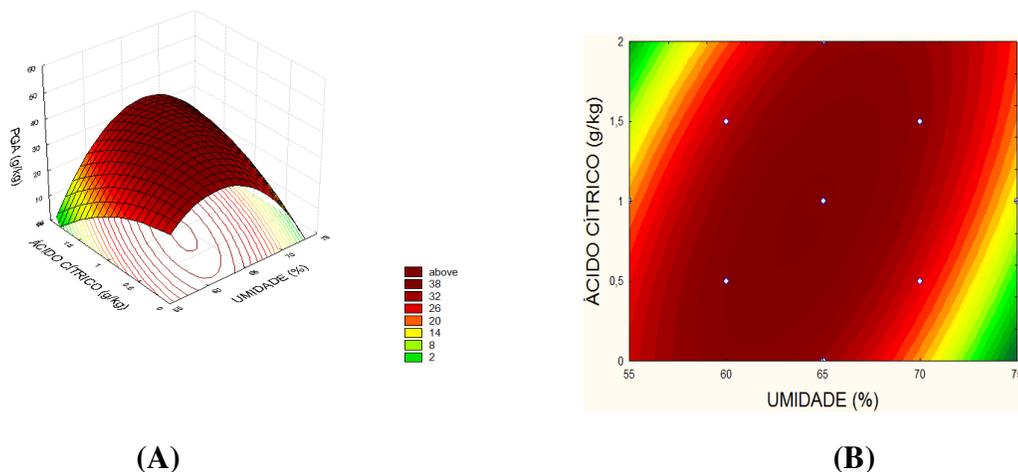


Figura 17. Superfície de resposta e curvas de contorno para a produção de γ -PGA. (A) e (B) Ácido Cítrico versus Umidade.

A Figura 18 ilustra a cromatografia em Camada Delgada (CDD) do Padrão ácido glutâmico indicado pela letra P. Os números 1, 2 e 3 se referem às amostras em triplicata de hidrólise do γ -PGA.

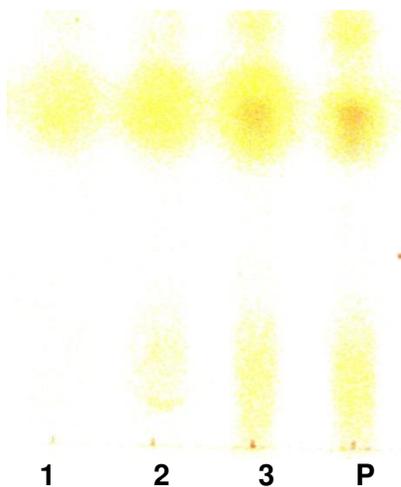


Figura 18. Cromatografia do padrão ácido glutâmico (P) e do γ -PGA hidrolisado por *B. subtilis* NRRC 351 (1), *B. velezensis* NRRC 23189 (2) e *B. subtilis* NRC 41289 (3).

6. CONCLUSÕES

- O presente trabalho mostrou que é possível produzir ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA), através de fermentação em estado sólido, utilizando sub-produto fibroso de soja como substrato e casca de arroz como agente aerador.
- A linhagem que produziu o biopolímero em maiores concentrações foi *B. velezensis* NRRC 23189, mostrando claramente muito mais habilidade para produção do que as outras linhagens testadas.
- A descompactação da massa foi fator determinante na produção do biopolímero. A melhor razão foi 9:1 (RFS:CA).
- O melhor tempo de fermentação foi 48 horas. A partir desse instante houve declínio de produção e provável consumo de γ -PGA pelos microrganismos.
- A temperatura de fermentação influencia a produção de γ -PGA, sendo a melhor temperatura 37 °C.
- Foi possível gerar no segundo DCCR o seguinte modelo: $y = 33,90 - 5,23 X_1^2 - 2,61 X_2^2 + 3,26 X_3 + 3,96 X_1X_4$, obtendo-se maior produção (46,191 g/kg de soja (b.s.)), com umidade inicial e pH ajustados respectivamente a 70% e 7,0.
- A presença do ácido cítrico no meio de cultura influencia a produção de γ -PGA e mostrou-se a única interação significativa no segundo planejamento indicando interação entre umidade e adição de ácido cítrico. Sendo fixado este último no seu menor nível, para redução de custo do processo.
- A cromatografia em camada delgada comprovou a produção de γ -PGA pelas cepas estudadas.
- Foi possível produzir γ -PGA a partir de resíduos como sub-produto fibroso de soja e casca de arroz sem adição de ácido glutâmico, com rendimento maior que alguns estudos reportados na literatura.

- O pH inicial e umidade do meio influenciaram a produção de γ -PGA, sendo a maior produção (46,19 g/kg) obtida com umidade de 70% e pH inicial 7,0.

7. Referências Bibliográficas

AJINOMOTO. Amino acids business. Disponível em http://www.ajinomoto.com/ar/i_r/pdf/fact/amino_oct2005.pdf. Acesso em 17 de fev. 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. 1987. Armazenamento de Resíduos Classe II e Classe III - Procedimento: NBR 11174, 2004.

ARPAL, J. A. A. Compuestos estequiométricos del ácido poli(γ -glutámico) com tensoactivos catiônicos. Abril, 2004. Dissertação (graduação em engenharia química) – Escola Técnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona (UPC).

ASHIUCHI, M. et al. Enzymatic synthesis of high molecular-mass poly-gamma-glutamate and regulation of its stereochemistry. *Applied Environment Microbiology*, v. 70, p. 4249-4255, 2004.

ASHIUCHI, M. et al. Isolation of *Bacillus subtilis* (chungkookjang), a poly-gamma-glutamate producer with high genetic competence. *Applied Microbiology Biotechnology*, v. 57, p. 764-769, 2001a.

ASHIUCHI, M.; KUWANA, E.; KOMATSU, K.; SODA, K.; MISONO, H. Differences in effects on DNA gyrase activity between two glutamate racemases of *Bacillus subtilis*, the poly-c-glutamate synthesis linking Llr enzyme and the YrpC(Murl) isozyme. *FEMS Microbiol. Lett.* n. 223, p. 221-225, 2003.

BAJAJ, I.B.; SINGHAL, R. S. Effect of aeration and agitation on synthesis of poly (gamma-glutamic) in batch cultures of *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 15, n.5, p. 635-640, 2010.

BUESCHER, J. M.; MARGARITIS, A. Microbial biosynthesis of polyglutamic acid biopolymer and applications in the biopharmaceutical, biomedical and food industries. *Critical reviews in Biotechnology*, v. 27, n. 1, p. 1-19, 2007.

CANDELA, T.; FOUET, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Molecular Microbiology*, v.60, n.5, p. 61-67, 2006.

CASTILHO, L.R.; POLATO, C.M.S.; BARUQUE, E.A.; JR, G.L.S. Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations. *Biochemical Engineering Journal*, v.4, p.239-247, 2000.

CHEN, X. et al. High yield of poly- γ -glutamic acid from *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation using swine manure as the basis of a solid substrate. *Bioresource technology*, v. 96, n17, p.1872-1879, 2005a.

CHEN, X. et al. Medium optimization by response surface methodology for poly- γ -glutamic acid production using dairy manure as the basis of a solid substrate. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.69, p. 390-396, 2005b.

CIABOTTI, S.; BARCELLOS, M.F.P.; MANDARINO, J.M.G.; TARONE, A.G. Avaliações químicas e bioquímicas dos grãos, extratos e tofus de soja comum e de soja livre de lipoxigenase. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 30, n. 5, p.920-929, 2006.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Séries históricas safras 1990 a 2006. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 1 nov. 2007.

COSTA, A.J.D.; ALMEIDA, M.J.M. O complexo agroindustrial paranaense: soja transgênica versus soja convencional. Curitiba. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Econômico, 2007.

CROMWICK, A. M., and R. A. GROSS. 1995. Effects of manganese(II) on *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A physiology and γ -poly(glutamic acid) formation. *Int. J. Macromol.* 17:259–267.

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

DO, J. H.; CHANG, H. N.; LEE, S. Y. Efficient recovery of γ -poly (glutamic acid) from highly viscous culture broth. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 76, n. 3, p. 219-223, 2001.

FREITAS, S.M. et al. Análise da dinâmica de transmissão de preços no Mercado Internacional de Farelo de Soja, 1990-99. Revista Agricultura em São Paulo, v.48, n.1, p.1-20, 2001.

GOTO, A. KUNIOKA, M. Biosynthesis and hydrolysis of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO 3335. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 56, n. 7, 1031-1035, 1992.

GRIESHOP, C. M.; FAHEY JR., G. C. Comparison of quality characteristics of soybeans from Brazil, China, and the United States. J. agric. Food Chem., v. 49, n. 5, p. 2669-2673, 2001.

HASAN, S.D.M. Produção, recuperação e caracterização de proteínas alergênicas da biomassa de *Drechslera (Helminthosporium) monóceras* obtida por fermentação em estado sólido. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. Tese (Doutorado).

HE, L.; NEU, M. P.; VANDERBERG, L. A. *Bacillus licheniformis* γ -glutamyl exopolymer: physicochemical characterization and U (VI) interaction. Environmental Science and Technology, v. 34, n. 9, p. 1694-1701, 2000.

HECK, J. X., SOARES, L. SOARES, L. H. B. Optimization of xylanase and mannanase production by *Bacillus circulans* strain BL 53 soybean on solid-state cultivation. Enzyme and Microbial Technology, 37: 417-423, 2005.

HECK, J. X.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. Cellulase and xylanase productions by isolated Amazon *Bacillus subtilis* strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation. Brazilian Journal of Microbiology, v. 33, n. 3, p. 213-218, 2002.

IRGA. Regulamento do Selo Ambiental da Lavoura de Arroz do Rio Grande do Sul. Acesso em: 24/03/2011. Disponível em <http://www.irga.rs.gov.br>.

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

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia industrial – vol.3. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 2001.

LUCAS, E. F., SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. Caracterização de polímeros: determinação do peso molecular e análise térmica. Rio de Janeiro: E-papers, 2001. 366 p.

MITSUIKI, M. et al. Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of oligo- and poly(glutamic acid)s. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 46, p. 891-895, 1998.

NIPPON POLY-GLU CO. NPG Products. Disponível em: http://www.poly-glu.com/eng/product_information/index.htm. Acesso em 17 fev. 2006

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

LHAMBY, A.; SENNA, A.J.T.; CANES, S. E. A prática da gestão ambiental agroindustrial: um estudo de caso em agroindústria que produz energia elétrica a partir de casca de arroz. I Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental. 2010.

MAYER, F.D.; HOFFMANN, R.; RUPPENTHAL, J.E. Gestão energética, econômica e ambiental do resíduo casca de arroz em pequenas e médias agroindústrias de arroz. 2006. Disponível em: <http://www.simpep.feb.unesp.br/anais/anais_13/artigos/124.pdf>. Acesso em: 15 de out. 2011.

MELLO FILHO, O. L.; SEDIYAMA, C. S.; MOREIRA, M. A.; REIS, M. S.; MASSONI, G. A.; PIOVESAN, N. D. Grain yield and seed quality of soybean selected for high protein content. pesq. agropec. Bras., v. 39, n. 5, p. 445-450. 2004.

MITSUIKI, M. et al. Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of oligo- and poly(glutamic acid)s. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 46, p. 891-895, 1998.

MOARES, L. P. ; ALEGRE, R. M.; BRITO, P. N. Optimisation of Poly(γ -Glutamic Acid) Production by *Bacillus velezensis* NRRL B – 23189 in Liquid fermentation With Molasses

as the Carbon Source Without Addition of Glutamic Acid. Int. Review of Chemical Engineering. V. 4, n.6, 2012.

MORAES, A. A. C., SILVA, A.L. Soja: suas aplicações. São Paulo: MEDSI Editora Médica e Científica, 1996, 14-19p

NATTO BIOSCIENCES. Gamma PGA: industry applications. Disponível em: http://www.nattobiosciences.com/gamma_pga.html Acesso em: 1 de setembro de 2008.

NIPPON POLY-GLU CO. NPG Products. Disponível em: http://www.poly-glu.com/eng/product_information/index.htm. Acesso em: 17 de fevereiro de 2006.

NOGUCHI, T. et al. Natto Mucilage Containing Poly- γ -glutamic acid increases soluble calcium in the rat small intestine. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v. 65, n.3, p.516-521, 2001.

OGAWA, Y., F. YAMAGUCHI, K. YUASA, and Y. TAHARA. 1997. Efficient production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* (*natto*) in jar fermenters. Biosci. Biotechnol. Biochem. 61:1684–1687.

OPPERMANN-SANIO, F.; STEINBUHEL, A. Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. Naturwissenschaften, v. 89, n. 1, p. 11-22, 2002.

ONISHI, R., S. ISHIKAWA, and J. SEKIGUCHI. 1999. Peptidoglycan hydrolase LytF plays a role in cell separation with CwIF during vegetative growth of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 181:3178–3184.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I sugarcane bagasse. Bioresour. Technol. N.74, p.69-80, 2000.

PANDEY, A. Recent process developments in solid-state fermentation. Process Biochemistry, v.27, p.109-117, 1992.

PEROZZI, Mariana. Brasil pode gerar 200 megawatts de energia com a casca do arroz. Arroz em Foco. 2004. Disponível em: <http://www.arroz.agr.br/site/arrozemfoco/040305.php> Acesso em: 18 ago. 2011.

PEROZZI, Mariana. Brasil pode gerar 200 megawatts de energia com a casca do arroz. Arroz em Foco. 2004. Disponível em: <<http://www.arroz.agr.br/site/arrozemfoco/040305.php>>. Acesso em: 18 ago. 2010.

RAGHAVARAO, K. S. M. S.; RANGANATHAN, T. V.; KARANTH, N. G. Some engineering aspects of solid-state fermentation. Biochemical Engineering Journal. v. 13, p. 127-135, 2003

RICHARD, A., MARGARITIS, A. Rheological, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. Biotechnology and Bioengineering, v. 82, n. 3, p. 299-305, 2003b.

RODRIGUEZ, J.A.; MATEOS, J.C.; NUNGARAY, J.; GONZÁLEZ, J.; BHANGNAGAR, T.; ROUSSOS, S.; CORDOVA, J.; BARATTI, J. Improving lipase production by nutrient source modification using *Rhizopus homothallicus* cultured in solid state fermentation. Process Biochemistry, v.41, p.2264–2269, 2006.

SAHA, B. C.; COTTA, M. A. Lime pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of rice hulls to ethanol. Biomass and Bioenergy, v. 32, p. 971-977, 2008.

SAUCEDO-CASTANEDA, G.; LONSANE, B.K.; KRISHNALAH, M.M.; NAVARRO, J.M.; ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii* in a solid state fermentation system. Process Biochemistry, v.27, p.97-107, 1992.

SHIH, I. L., and Y. T. VAN. The production of poly(-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. Bioresour. Technol. 79: 207–225, 2001.

SHI, I. L.; VAN, Y.T.; CHANG, Y. N. Application of statistical experimental methods to optimize production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, p. 213-220, 2002.

SOLIMAN, N. A.; BEREKAA, M. M.; ABDEL-FATTAH, Y. R. Polyglutamic acid (PGA) production by bacillus sp. SAB-26: application of Plackett-Burman experimental desing to evaluate culture requirements. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 69, n. 3, p. 259-67, 2005.

SCHIMIDELL, W. et al. (Coord.) Engenharia Bioquímica. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. 541 p. (Biotecnologia Industrial v. 1)

SUNG, M. H. et al natural and edible biopolymer poly- γ -glutamic acid: synthesis, production, and application. *The Chemical Record*, v. 5, p. 352-366, 2005.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. Composição Química e Valor protéico do resíduo de soja em relação ao Grão de soja. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 26(3): 571-576, jul.-set. 2006.

SILVA, S. B. Produção e otimização do processo de obtenção de Ácido γ -Poliglütâmico através de cultivo de *Bacillus subtilis* BL53. Porto Alegre: UFRGS, 2009, 114 p. Tese de doutorado- Programa de Pós graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

TANIGICHI, M. et al. Physicochemical properties of cross-linked poly- γ -glutamic acid and its flocculating activity against kaolin suspension. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.99, n.2, p. 130-135, 2005.

Uyar, F.; Baysal, Z. Solid state fermentation for production of α -amylase by a thermotolerant *Bacillus subtilis* from hot-spring water. *Process Biochemistry* 38, 1665-1668, 2003.

VASCONCELOS, I. M.; MAIA, A. A. B.; SIEBRA, E. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CARVALHO, A. F. F. U.; MELO, V. M. M.; CARLINI, C. R.; CASTELAR, L. I. M. Nutritional study of two Brazilian soybean (*Glycine max*) cultivars differing in the contents of antinutritional and toxic proteins. *J. Nutr. Biochem.*, v. 12, n.1, p. 55-62, 2001.

YOUNG, V. R. Soy protein in relation to human protein and amino acid nutrition. *J. Am. Diet. Assoc.*, v. 91, n. 7, p. 828-835, 1991.

WANG, Q., CHEN, S., ZHANG, J., SUN, M., LIU, Z., YU, Z. Co-producing lipopeptides and poly- γ -glutamic solid state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. *Bioresour. Technol.*, 3318-3323 p. (2008)

ZANUY, D. ALEMAN, C. Poly(γ -glutamic acid) in aqueous solution: molecular dynamics simulations of 10- and 20-residues chains at different temperatures. *Biomacromolecules*, v. 2, p. 651-657, 2001.

XU, J.; CHEN, S.; YU, Z. Optimization of process parameters for poly γ -glutamate production under solid state fermentation from *Bacillus subtilis* CCTCC202048. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 9, p. 3075-3081, 2005.

XU, *et al.* Efficient production of poly-(γ -glutamic acid) by newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 519-523, 2005.

Apêndice A

Determinação de ácido γ -poliglutâmico

A metodologia descrita a seguir foi adaptada do trabalho de Kanno e Takamatsu (1995).

PARTE 1 - Extração do ácido γ -poliglutâmico

- a) Adicionar 10 mL de ácido tricloroacético 6,25 % a um balão de 25 mL e elevar volume com o caldo de cultivo com auxílio de uma pipeta de Pasteur.
- b) Transferir para erlenmeyer de 125 mL e levar a banho de 50 °C com agitação por 20 min.
- c) Centrifugar a 20.000 g por 20 min.
- d) Coletar 10 mL do sobrenadante e ajustar pH até 7,0 com auxílio de NaOH 1M e 0,1M.
- e) Elevar em balão de 25 mL.
- f) Tomar uma alíquota de 5 mL e adicionar 25 mL de etanol absoluto a 4°C em um tubo de centrífuga. Misturar lentamente e deixar repousar por 10 min.
- g) Centrifugar a 25.000 g por 30 mim.
- h) Descartar o sobrenadante e ressolubilizar o precipitado com pequeno volume de tampão fosfato pH 7,0.
- i) Adicionar 25 mL de etanol 4°C. Misturar lentamente e deixar repousar por 10 min.
- j) Centrifugar a 25.000 g por 30mim.
- k) Descartar sobrenadante e adicionar tampão fosfato pH 7,0 e elevar volume em balão de acordo com quantidade prevista de polímero.

PARTE 2 - Quantificação do ácido γ -poliglutâmico (Complexação com Brometo de cetiltrimetilamônio)

- a) Num tubo de ensaio, adicionar 1 mL de solução de extrato de γ -PGA obtida a partir do caldo de cultivo na PARTE 1 desta metodologia.
- b) Adicionar 4 mL de tampão fosfato pH 7,0
- c) Adicionar 1mL de CET (Brometo de Cetiltrimetilamônio 0,1 M / NaCl 1M)
- d) Agitar em agitar e deixar repousar em banho a 30 °C por 20min.

e) Ler absorbância a 400 nm.

f) Calcular a quantidade de g-PGA no caldo de cultivo, através de curva padrão de g-PGA (MM: 70-100 kDa, Sigma-Aldrich).