



LUANA PEREIRA DE MORAES

Produção do ácido γ -poliglutâmico a partir dos subprodutos, como o glicerol e o melaço, e estudo posterior de sua hidrólise

CAMPINAS
2014



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

LUANA PEREIRA DE MORAES

**Produção do ácido γ -poliglutâmico a partir dos
subprodutos, como o glicerol e o melaço, e estudo
posterior de sua hidrólise**

**Tese apresentada à
Faculdade de Engenharia de
Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas,
como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção
do título de Doutora, na área de
Engenharia de Alimentos.**

Orientador: Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA
LUANA PEREIRA DE MORAES, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. RANULFO MONTE ALEGRE**

**CAMPINAS
2014**

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Márcia Regina Garbelini Sevillano - CRB 8/3647

M791p Moraes, Luana Pereira de, 1983-
Produção do ácido gamma-poliglutâmico a partir dos subprodutos, como o glicerol e o melaço, e estudo posterior de sua hidrólise / Luana Pereira de Moraes.
– Campinas, SP : [s.n.], 2014.

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

1. Ácido gamma-poliglutâmico. 2. Melaço. 3. Otimização. 4. Glicerina. I. Alegre, Ranulfo Monte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Poly (gamma- glutamic acid) production of substrates industrial, glycerol and molasses, and its hydrolyses

Palavras-chave em inglês:

Poly(gamma- glutamic acid)

Molasses

Optimization

Glycerol

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Titulação: Doutora em Engenharia de Alimentos

Banca examinadora:

Ranulfo Monte Alegre [Orientador]

Dirce Yorika Kabuki

Jonas Contiero

Marta Cristina Teixeira Duarte

Rosana Goldbeck

Data de defesa: 25-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Engenharia de Alimentos

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre (Orientador) - UNICAMP

Prof.^a Dr.^a Dirce Yorika Kabuki – FEA/UNICAMP

Prof. Dr. Jonas Contiero - UNESP (Rio Claro)

Prof.^a Dr.^a Marta Cristina Teixeira Duarte - CPQBA/UNICAMP

Dr.^a Rosana Goldbeck – Centro Nac. de Pesq. em Energia e Materiais

Dr.^a Fernanda Lopes Motta - FEQ/UNICAMP

Dr.^a Giovana da Silva Padilha – DEA/UNICAMP

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi – UNESP (São José do Rio Preto)

Abstract

The poly(γ -glutamic acid), also known as γ -PGA, is a polymer that much research has been done on this metabolite and it produces glutamic acid polymers and monomers when hydrolyzed. γ -PGA is a water-soluble, biodegradable and non toxic biopolymer with applications in medicine, food, cosmetic industries. This work aims to study the process of γ -PGA production and hydrolysis. *Bacillus* strains and experimental conditions had been determined, as well as different culture conditions without glutamic acid as alternative industrial substrates by-products (glycerol and molasses). Firstly, culture media and alternative and cheap substrates were selected and *Bacillus* strains was evaluated. A fractional central composite design was utilized to evaluate the effects of fermentative compounds and culture conditions on γ -PGA production. The optimization of culture conditions was determined using central composite design (CCD). Finally, consumption and enzymatic hydrolysis of γ -PGA in culture media was studied. The *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 strain was selected. The culture media without glutamic acid with 100 g/L of glycerol was optimized. The CCD showed the best γ -PGA production in culture media with ammonium sulphate, 8 g/L, citric acid, 20 g/L, the temperature of 27 °C, the agitation of 200 rpm, the initial pH 6,5 in shaker. Under optimized conditions, the production of γ -PGA was 4,17 g/L. The production of γ -PGA was 4,82 g/L when the molasses, 200 g/L, was supplemented with ammonium sulphate, 8 g/L, citric acid, 12,5 g/L, temperature of 27 °C, agitation of 200 rpm, initial pH 6,5 in shaker. Experimental conditions of 5 L in stirred bioreactor with stirring rates of 500 rpm, aeration rate of 2 VVM, the temperature of 27 °C and same optimal conditions, showed higher γ -PGA production than when used glycerol in culture media, 28 g/L. When it was used molasses the γ -PGA production was 6,69 g/L. The *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 uses γ -PGA as only carbon source or when the carbon at the medium was not sufficient. Thus, the microorganism produces the enzyme that hydrolyses γ -PGA.

Keywords: poly(γ -glutamic acid), *Bacillus velezensis*, molasses, glycerol, bioprocess optimization, industrial substrates.

Resumo

O ácido γ -poliglutâmico, também conhecido como γ -PGA, é um polímero largamente estudado com capacidade de produzir polímeros e monômeros de ácido glutâmico quando hidrolisado. Por ser solúvel em água, biodegradável e atóxico, o γ -PGA é aplicado em indústrias alimentícias, cosméticas e medicina. Com o objetivo de estudar a produção de γ -PGA e sua hidrólise, foram avaliadas diferentes cepas de *Bacillus* spp e condições experimentais, além disso, meios de cultivos sem a presença do ácido glutâmico a partir de subprodutos industriais, como glicerol e melaço. O estudo iniciou com a escolha do meio de cultivo e aplicação de substratos alternativos e baixo custo. Foram determinadas as possíveis espécies do *Bacillus* produtoras de γ -PGA, analisou-se os componentes do meio fermentativo e as condições de cultivo que interferem na produção de γ -PGA através do planejamento experimental e aplicou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) para otimização das condições de cultivo. Por fim, avaliou-se o consumo de γ -PGA e a hidrólise de γ -PGA pela enzima presente no meio de cultivo. O micro-organismo *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 foi o selecionado para a produção de γ -PGA. A produção de γ -PGA em meio de cultivo sem ácido glutâmico contendo glicerol (100 g/L) foi otimizado, obtendo-se o ponto ótimo em meio cuja composição foi de sulfato de amônio, 8 g/L, ácido cítrico, 20 g/L, temperatura de 27 °C, agitação de 200 rpm, pH_{inicial} 6,5 em cultivo submerso conduzido por agitador orbital. Nas condições otimizadas a produção de γ -PGA sem utilização do ácido glutâmico foi de 4,17 g/L. Ao substituir o glicerol por melaço, obteve-se uma produção de 4,82 g/L do γ -PGA em meio contendo melaço, 200 g/L, sulfato de amônio, 8 g/L, ácido cítrico, 12,5 g/L, temperatura de 27 °C, agitação de 200 rpm, pH_{inicial} 6,5 em cultivo submerso conduzido por agitador orbital. A avaliação das condições de cultivo em biorreator com capacidade de 5 L, agitação de 500 rpm, taxa de aeração de 2 VVM, 27 °C e as mesmas condições otimizadas, mostrou um aumento na produção do γ -PGA quando o subproduto de glicerol foi utilizado, a produção de γ -PGA foi de 28 g/L. Um aumento na produção de γ -PGA para 6,69 g/L foi determinado quando utilizou

melaço. O *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 utiliza o γ -PGA como fonte de carbono quando outras fontes não estão no meio fermentativo. Para isto o micro-organismo libera uma enzima no meio de cultura responsável pela hidrólise do γ -PGA.

Palavras-chave: ácido γ -poliglutâmico, *Bacillus velezensis*, melaço, glicerol, bioprocesso, otimização, subprodutos industriais.

Sumário

Abstract.....	vii
Resumo	viii
Índice Ilustrações	xxi
Índice Tabelas	xxv
1. Introdução	1
1.1. Objetivos.....	3
1.1.1. Geral	3
1.1.2. Específicos.....	3
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. Produção Industrial de Aminoácidos.....	5
2.2. Poli aminoácidos	9
2.3. Métodos de Degradação do Ácido γ -poliglutâmico	18
2.4. Matérias-primas para Fermentação	19
2.4.1. Glicerol	19
2.4.2. Melaço	22
2.5. Métodos Fermentativos	26
2.6. Artigo de Revisão Publicado	27
3. Material e Métodos	29
3.1. Micro-organismos e Manutenção	29
3.2. Preparo do Inóculo	30
3.3. Cultivo Submerso em Incubadora de Agitação Orbital (shaker).....	30
3.3.1. Avaliação das Composições do Meio de Cultura para Produção do γ -PGA.....	31
3.3.2. Avaliação dos Micro-organismos, da Composição do Meio, da Temperatura e do $pH_{inicial}$ para Utilização no Processo Fermentativo.....	32
3.3.2.1. Escolha dos Micro-organismos	32
3.3.2.2. Escolha do Meio, $pH_{inicial}$ e Temperatura	32
3.3.3. Efeito da Temperatura e do $pH_{inicial}$	33
3.3.4. Estudo da Adição de Diferentes Fontes de Nitrogênio e Diferentes Concentrações de Ácido Cítrico no Meio de Fermentação de <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189.....	33
3.3.5. Estudo das Variáveis Glicerol/Melaço, Sulfato de Amônio e Ácido Cítrico no Processo Produtivo do γ -PGA com <i>Bacillus velezensis</i> NRRL-23189.....	34
3.4. Cultivo Submerso em Biorreator	35
3.5. Análise da Hidrólise e Consumo de γ -PGA	36
3.6. Métodos Analíticos.....	36
3.6.1. Isolamento de γ -PGA (Diálise e Liofilização)	36
3.6.2. Determinação da Biomassa Seca.....	37
3.6.3. Determinação de pH_{final}	37
3.6.4. Determinação de ART (Açúcares Redutores Totais) no Melaço	38
3.6.5. Determinação do Ácido Glutâmico (Cromatografia em Camada Delgada).....	38
3.6.6. Determinação do γ -PGA	38
4. Resultados e Discussão.....	39
4.1. Avaliação das Composições do Meio de Cultura para Produção do γ -PGA.....	39
4.2. Avaliação dos Micro-organismos, da Composição do meio, da Temperatura e do $pH_{inicial}$ para Utilização no Processo Fermentativo.....	44

4.2.1. Escolha do Micro-organismo.....	44
4.2.2. Escolha do Meio, pH _{inicial} e Temperatura.....	46
4.2.2.1. Planejamento Experimental 2 ⁴⁻¹ Realizado para o Micro-organismo <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189	46
4.2.2.2. Planejamento Experimental 2 ⁴⁻¹ Realizado para o micro-organismo <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094	50
4.2.2.3 Planejamento Experimental 2 ⁴⁻¹ Realizado para o Micro-organismo <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41294	54
4.2.3. DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) para as Variáveis Temperatura e do pH _{inicial} na Produção do γ -PGA por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189 e <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094.....	58
4.2.3.1. DCCR Realizado para o Micro-organismo <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189....	58
4.2.3.2. DCCR Realizado para o Micro-organismo <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094	64
4.3. Estudo da Adição de Diferentes Fontes de Nitrogênio e Diferentes Concentrações de Ácido Cítrico no Meio de Fermentação de <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189	71
4.4. Otimização do Meio de Cultivo Utilizado no Processo Fermentativo e Validação dos Resultados Através do Estudo das Variáveis Concentração Glicerol/Melaço, Sulfato de Amônio e Ácido Cítrico Utilizando <i>Bacillus velezensis</i> NRRL-23189	73
4.4.1. Estudo do Efeito da Concentração de Glicerol, Ácido Cítrico e Sulfato de Amônio na Produção de γ -PGA por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189	73
4.4.2. Estudo do Efeito do Melaço, Ácido Cítrico e Sulfato de Amônio na Produção do γ -PGA por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189	79
4.4.3. Validação dos Resultados	88
4.5. Produção de γ -PGA em Biorreator de 5 L	89
4.6. Estudo da Hidrólise de γ -PGA	94
4.6.1. Utilização de γ -PGA como Fonte de Carbono	94
4.6.2. Estudo da Hidrólise Enzimática de γ -PGA pela Enzima Produzida pela <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189	96
5. Conclusões.....	99
6. Sugestões para Trabalhos Futuros	101
7. Referências Bibliográficas.....	103
8. Anexos	111
8.1. Artigo 1: Food and Public Health.....	111
1. Introduction	112
2. The γ -PGA synthesis	112
3. Enzymes involved in γ -PGA production.....	113
4. Nutritional requirements for different <i>Bacillus</i> species.....	114
5. Characteristics and possible applications	115
6. Conclusions	119
ACKNOWLEDGEMENTS	119
8.2. Artigo 2: International Review of Chemical Engineering (IRECHE).....	123
I. INTRODUCTION	124
II. MATERIALS AND METHODS.....	125
III. SURFACE-RESPONSE METHODOLOGY	125
IV. RESULTS AND DISCUSSION	126
V. CONCLUSIONS	129
ACKNOWLEDGEMENTS	129

REFERENCES.....	129
-----------------	-----

À minha família: Paulo, Jorgina, Luciana, Ana Paula, Analu e Agenor.

Ao meu orientador Ranulfo Monte Alegre.

Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus,
não sou o que eu era antes.
(Marthin Luther King)

Agradecimentos

A Deus, pela vida e proteção durante toda minha caminhada.

A minha família, pelo incentivo, amor, carinho, atenção e momentos de felicidade.

A minha princesinha Analu, que apareceu repentinamente, mas que muito contribui para finalização deste projeto.

Ao Agenor, pelo amor e carinho e, sobretudo por compreender a minha ausência.

Ao meu orientador professor Dr. Ranulfo Monte Alegre pela orientação, incentivo, paciência e grande apoio durante a realização deste trabalho. Muito obrigada por tudo!

A Universidade Estadual de Campinas, em particular à Faculdade de Engenharia de Alimentos, pela oportunidade da formação profissional e realização deste curso.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos pelo suporte para o desenvolvimento deste trabalho e concessão do doutorado direto.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudo.

Aos colegas do laboratório, Claudinha, Dona Maria, Meiri, César, Oswaldo, Renato, Giovana, Jenny, Priscila, Yanete que muitas vezes colaboraram para realização deste trabalho.

As amigas e amigos, Aline, Marcela, Bruna, Diane, Janaína, Helena, Tereza, César e Ivan que estiveram presentes em meus momentos de alegrias e tristezas levando sempre o apoio necessário.

A Mariana, Kaliana e ao Rafael pela grande amizade, incentivo no final da caminhada, momentos de alegria e presença nos momentos de solidão.

A Rejane que sempre incentivou e contribuiu nos meus estudos (COLUNI, EAL, FEA), participando das alegrias, dos desesperos em provas e concursos, e que muito contribuiu para a finalização desta caminhada.

A Rosana pela amizade, pelo apoio e contribuição com relação ao projeto.

Àqueles que, de algum modo, contribuíram para a realização desta etapa, o meu sincero agradecimento e admiração!!

Índice Ilustrações

Figura 1. Ácido γ -PGA	10
Figura 2. Produção do γ -PGA.....	12
Figura 3. Principais setores industriais de utilização da glicerina.....	20
Figura 4. Produção de biodiesel no Brasil entre 2005 e 2011, em metros cúbicos	21
Figura 5. Cromatografia em camada delgada do ácido γ -PGA hidrolisado com HCl 6N, obtido dos meios fermentados por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL-B 23189.	41
Figura 6. Diagrama de Pareto para a produção do γ -PGA, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189.	49
Figura 7. Diagrama de Pareto avaliando o pH _{final} , ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189.	49
Figura 8. Diagrama de Pareto para a produção de biomassa, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189.	50
Figura 9. Diagrama de Pareto para a produção do γ -PGA, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094.....	53
Figura 10. Diagrama de Pareto avaliando o pH _{final} , ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094.....	53
Figura 11. Diagrama de Pareto para a produção de biomassa, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094.....	54
Figura 12. Diagrama de Pareto para a produção do γ -PGA, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41294.....	56
Figura 13. Diagrama de Pareto avaliando o pH _{final} , ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41294.....	57
Figura 14. Diagrama de Pareto para a produção de biomassa, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41294.....	57
Figura 15. Concentrações preditas X concentrações observadas para a resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, após 72 h, agitação de 200 rpm. 60	
Figura 16. Superfície de resposta gerada pela resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, após 72 h, agitação de 200 rpm.....	62
Figura 17. Valores preditos X valores observados para a resposta pH _{final} do meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, após 72 h, agitação de 200 rpm.	63

Figura 18. Concentrações preditas X concentrações observadas para a resposta Biomassa em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, após 72 h, agitação de 200 rpm.....	64
Figura 19. Concentrações preditas X concentrações observadas para a resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094, após 72 h, agitação de 200 rpm.....	66
Figura 20. Superfície de resposta gerada pela resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094, após 72 h, agitação de 200 rpm.	68
Figura 21. Valores Preditos X valores Observados para a resposta pH _{final} em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094, após 72 h, agitação de 200 rpm.	69
Figura 22. Superfície de resposta gerada pela resposta pH _{final} em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094, após 72 h, agitação de 200 rpm.....	69
Figura 23. Concentrações preditas X concentrações observadas para a resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094, após 72 h, agitação de 200 rpm.....	70
Figura 24. Concentrações preditas X concentrações observadas para a resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.	75
Figura 25. Superfície de resposta gerada pela resposta concentração de γ -PGA, em função da concentração de sulfato de amônio no ponto central, em meio fermentado contendo glicerol como substrato, produzido por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.	77
Figura 26. Superfície de resposta para a resposta γ -PGA, em função da concentração de glicerol no ponto central, em meio fermentado contendo glicerol como substrato, produzido por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.....	78
Figura 27. Superfície de resposta para a resposta γ -PGA, em função da concentração de ácido cítrico no ponto central, em meio fermentado contendo glicerol como substrato, produzido por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.....	78
Figura 28. Concentrações preditas X concentrações observadas para a resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.	81
Figura 29. Concentrações Preditas X concentrações Observadas para a resposta Melaço Residual em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.	83
Figura 30. Superfície de resposta para a resposta γ -PGA, em função da concentração de sulfato de amônio no ponto central, em meio fermentado contendo melaço como substrato, produzido por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.	85
Figura 31. Superfície de resposta para a resposta Melaço Residual , em função da concentração de sulfato de amônio no ponto central, em meio fermentado	

contendo melaço como substrato, produzido por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.	85
Figura 32. Superfície de resposta para a resposta γ -PGA, em função da concentração de ácido cítrico no ponto central, em meio fermentado contendo melaço como substrato, produzido por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.	86
Figura 33. Superfície de resposta para a Melaço Residual, em função da concentração de ácido cítrico no ponto central, em meio fermentado contendo melaço como substrato, produzido por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.	86
Figura 34. Superfície de resposta para a resposta γ -PGA, em função da concentração de melaço no ponto central, em meio fermentado contendo melaço como substrato, produzido por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.	87
Figura 35. Superfície de resposta para a resposta Melaço Residual, em função da concentração de melaço no ponto central, em meio fermentado contendo melaço como substrato, produzido por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.	87
Figura 36. Cinética da produção do γ -PGA utilizando glicerol da fabricação de biodiesel como fonte de carbono e <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189	90
Figura 37. Cinética da produção do γ -PGA utilizando melaço como fonte de carbono e <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189	91
Figura 38. Consumo de γ -PGA, produzido utilizando o melaço como fonte de carbono, sem ácido cítrico no meio a 27 °C.	95
Figura 39. Consumo do γ -PGA, produzido utilizando o resíduo de glicerol como fonte de carbono, sem ácido cítrico no meio a 27 °C	95
Figura 40. Concentração de γ -PGA remanescente – hidrólise pela enzima presente em sobrenadante de meio de cultivo contendo γ -PGA em diferentes temperaturas.	97

Índice Tabelas

Tabela 1. Valor, volume e preço dos aditivos de uso industrial	8
Tabela 2. Variabilidade da composição do melaço em usinas de açúcar de São Paulo e Alagoas	24
Tabela 3. Composição do melaço em função do tempo de armazenamento	25
Tabela 4. Açúcar mascavo, rapadura e melaço produzidos em quilogramas por tonelada de cana-de-açúcar	26
Tabela 5. Composição do meio BHI	29
Tabela 6. Produção do γ -PGA por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189 em meio com diferentes concentrações de glicerol e ácido glutâmico	31
Tabela 7. Níveis estudados no planejamento experimental 2^{4-1} , 72 h de fermentação e agitação de 200 rpm.	33
Tabela 8. Níveis de temperatura e pH _{inicial} estudados no DCCR, 72 h de fermentação e agitação de 200 rpm.	33
Tabela 9. Diferentes formulações de meio variando a composição de nitrogênio e a presença e ausência do ácido cítrico	34
Tabela 10. Tabela variáveis e níveis estudados no DCCR 2^3	34
Tabela 11. Tabela variáveis e níveis estudados no DCCR 2^3	35
Tabela 12. Composição dos meios utilizados nos biorreatores de 5 L.	35
Tabela 13. Presença de γ -PGA no sobrenadante de diversos meio de cultura precipitado metanol em meio com diferentes concentrações de glicerol e ácido glutâmico	40
Tabela 14. Biomassa produzida por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL-B 23189 após 72 h de fermentação	42
Tabela 15. Valores de pH _{final} obtido após 72h de fermentação com <i>Bacillus velezensis</i> NRRL-B 23189	43
Tabela 16. γ -PGA obtido após 72 h de fermentação, pH _{inicial} 6,5, temperatura de 37 °C e agitação de 200 rpm	45
Tabela 17. Biomassa obtida após 72 h de fermentação, pH _{inicial} 6,5, temperatura de 37 °C e agitação de 200 rpm.	45
Tabela 18. pH _{final} obtido após 72 h de fermentação, pH _{inicial} 6,5, temperatura de 37 °C e agitação de 200 rpm.	45
Tabela 19. Concentração do γ -PGA, pH _{final} e biomassa obtidos após 72 h de fermentação com o <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, agitação de 200 rpm	47
Tabela 20. Estimativa dos efeitos para a concentração do γ -PGA	47
Tabela 21. Concentração do γ -PGA, biomassa e pH _{final} obtidos após 72 h de fermentação com o <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094, agitação de 200 rpm.....	51
Tabela 22. Estimativa dos efeitos para a concentração do γ -PGA	52
Tabela 23. Concentração do γ -PGA, biomassa e pH _{final} obtidos após 72 h de fermentação com o <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41294, agitação de 200 rpm.....	55
Tabela 24. Concentração do γ -PGA, biomassa e pH _{final} obtidos após 72 h de fermentação com o <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, agitação de 200 rpm	59
Tabela 25. Coeficientes de regressão do DCCR para a concentração do γ -PGA .	60
Tabela 26. Análise de variância para a produção do γ -PGA.....	61

Tabela 27. Concentração de γ -PGA, biomassa e pH _{final} obtidos após 72 h de fermentação com o <i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094, agitação de 200 rpm.....	65
Tabela 28. Coeficientes de regressão do DCCR para a resposta pH _{final}	66
Tabela 29. Análise de variância para a produção do γ -PGA.....	67
Tabela 30. Concentração média de γ -PGA produzido em meio fermentado por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, utilizando glicerol como substrato e diferentes concentrações de ácido cítrico e diferentes fontes de nitrogênio, temperatura de 27 °C, 72 h, agitação de 200 rpm	71
Tabela 31. Concentração de γ -PGA produzido em meio fermentado por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, utilizando glicerol como substrato e diferentes concentrações de ácido cítrico e diferentes fontes de nitrogênio, temperatura de 32 °C, 72 h, agitação de 200 rpm	72
Tabela 32. Produção do γ -PGA no DCCR 2 ³ utilizando <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, temperatura de 27 °C, 72 h, pH _{inicial} de 6,5 e agitação de 200 rpm	74
Tabela 33. Coeficientes de regressão do DCCR para γ -PGA	76
Tabela 34. ANOVA para a resposta γ -PGA produzido por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, temperatura de 27 °C, 72 h, pH _{inicial} de 6,5 e agitação de 200 rpm	77
Tabela 35. Produção do γ -PGA e melaço residual no DCCR 2 ³ utilizando <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, temperatura de 27 °C, 72 h, pH _{inicial} de 6,5 e agitação de 200 rpm.....	80
Tabela 36. Coeficientes de regressão do DCCR para a produção do γ -PGA.....	82
Tabela 37. ANOVA para a resposta γ -PGA produzido por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, temperatura de 27°C, 72 h, pH _{inicial} de 6,5 e agitação de 200 rpm	82
Tabela 38. Coeficientes de regressão do DCCR para o Melaço Residual	84
Tabela 39. ANOVA para a resposta Melaço Residual do meio fermentado por <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, temperatura de 27 °C, 72 h, pH _{inicial} de 6,5 e agitação de 200 rpm.....	84
Tabela 40. Produção do γ -PGA no DCCR 2 ³ utilizando <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, temperatura de 27 °C, 72 h, pH _{inicial} de 6,5 e agitação de 200 rpm	88
Tabela 41. Produção do γ -PGA no DCCR 2 ³ utilizando <i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189, temperatura de 27 °C, 72 h, pH _{inicial} de 6,5 e agitação de 200 rpm	89

1. Introdução

Desde 1950 a produção de aminoácidos por métodos fermentativos tornou-se importante aspecto para a Microbiologia industrial; liderando numerosos estudos para entender e melhorar a direção das condições metabólicas para sua produção. Antes disso, não existia um processo comercial apropriado para a produção de L-aminoácidos naturais, exceto por isolamento a partir de proteínas. Por esta razão, diversos estudos foram sendo conduzidos para possibilitar o enriquecimento das proteínas vegetais com aminoácidos essenciais, a baixo custo (TRYFONA; BUSTARD, 2005).

Assim, aminoácidos têm sido produzidos com auxílio de micro-organismos por aproximadamente 50 anos. A produção total de aminoácidos é de L-ácido glutâmico (aproximadamente 900.000 toneladas por ano) seguido por L-lisina (420.000 toneladas por ano) e DL-metionina (350.000 toneladas por ano). A razão pela crescente demanda destes aminoácidos é sua ampla gama de aplicações industriais, sendo utilizados na indústria de alimentos como “potenciadores” de sabor, aditivos, suplementos alimentares, agentes terapêuticos e precursores de sínteses de peptídeos ou agroquímicos (TRYFONA; BUSTARD, 2005). Atualmente, há um aumento do uso de aminoácidos na área de fármacos como soro e soluções intravenosas. Sua grande utilização está na alimentação humana e no enriquecimento de ração animal, uma vez que é grande número de aminoácidos não são sintetizados no organismo de animais superiores (SILVA et al., 2005).

Durante o processamento, grande parte dos nutrientes que estão disponíveis nos alimentos são perdidos havendo a necessidade de adicionar suplementos ricos ou concentrados nutricionais, como o ácido glutâmico. Tal suplementação muitas vezes é cara e pode tornar o produto inviável para o consumidor. Entre os aminoácidos produzidos, aproximadamente 70% destina-se a formulação de alimentos, podendo ser aplicados de forma individual ou em combinação com outros aminoácidos para acentuar o sabor ou enriquecer dietas,

sendo os 30% restantes utilizados na formulação de rações, cosméticos, entre outras aplicações (SATO, 2001).

Poli aminoácidos são poli amidas compostas por aminoácidos simples e diferem das proteínas em vários aspectos, entre estes podemos citar a presença de um único aminoácido e diferentes maneiras de serem sintetizados utilizando micro-organismos (KUNIOKA, 1997). O γ -PGA é um poli aminoácido composto, de elevada massa molar resultante de reações químicas de polimerização entre o D- e o L- ácido glutâmico. Pode ser empregado em medicina, indústria alimentícia, farmacêutica, formulação de plásticos, tratamento de água, entre outras aplicações (BAJAJ; SINGHAL, 2011; GOTO; KUNIOKA, 1992).

Alguns micro-organismos produtores de γ -PGA requerem L- ácido glutâmico para a sua produção, enquanto outros não requerem o L- ácido glutâmico no meio de fermentação (KUNIOKA, 1997). Assim há a possibilidade de produção de γ -PGA e posterior hidrólise do polímero em L- ácido glutâmico, aminoácido de grande valor comercial, cuja maioria dos estudos relacionados com sua produção estão protegidos por patentes. Um dos maiores custos para obtenção de biomassa celular e conseqüentemente obtenção de bioprodutos por fermentação industrial, como no caso da produção microbiana do γ -PGA, é o substrato utilizado.

No Brasil é produzido grande quantidade de biodiesel e conseqüentemente grande quantidade do subproduto glicerol. O país também se destaca pela grande produção de cana-de-açúcar e conseqüentemente de açúcar, gerando grande quantidade de melaço. Ambos, glicerol e melaço podem ser utilizados como fonte de carbono de baixo custo no processo de produção do γ -PGA e também como forma de diminuir e aproveitar mais apropriadamente os subprodutos industriais. Neste contexto, pretende-se avaliar o efeito da substituição da fonte de carbono no meio de cultura por fontes de fácil acesso e baixo custo, tais como glicerol e melaço para a produção do γ -PGA e posterior hidrólise a aminoácido ácido

glutâmico, produto de grande interesse comercial e cuja produção ainda não é bem conhecida, a partir de *Bacillus* spp.

1.1. Objetivos

1.1.1. Geral

Produção do ácido γ -poliglutâmico usando como fontes de carbono o glicerol e o melão e posterior estudo de sua degradação.

1.1.2. Específicos

Encontrar uma linhagem produtora de ácido γ -poliglutâmico sem a necessidade de utilizar o ácido glutâmico no meio de cultivo;

Avaliar o efeito do pH e temperatura no micro-organismo durante a fermentação para produção do ácido γ -poliglutâmico;

Estudar os componentes do meio de cultivo que interferem na produção do ácido γ -poliglutâmico;

Estudar metodologias de hidrólise do ácido γ -poliglutâmico.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Produção Industrial de Aminoácidos

Os aminoácidos são estruturas fundamentais das proteínas. Todos os 21 aminoácidos encontrados nas proteínas do corpo humano têm um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono (o carbono α). Eles diferem uns dos outros através de suas cadeias laterais ou grupos R, os quais variam em estrutura, tamanho, carga elétrica e influenciam a solubilidade do aminoácido em água (SILVA et al., 2005).

O carbono α liga-se, além dos grupos amino, carboxil e grupos R, a um átomo de hidrogênio, sendo assim considerado um centro quiral. Todas as moléculas com centros quirais são também opticamente ativas e podem formar estereoisômeros. Compostos biológicos com centro quiral ocorrem naturalmente em apenas uma forma estereoisomérica, D ou L. Os resíduos de aminoácidos em moléculas de proteínas são exclusivamente L-isômeros (NELSON; COX, 2000).

A grande importância dos aminoácidos está relacionada com a alimentação humana e no enriquecimento de ração animal, pois há um número significativo de aminoácidos essenciais que não são sintetizados no organismo de animais superiores e do homem; portanto devem ser introduzidos na dieta pela alimentação. Outra importância que merece destaque é que os aminoácidos são constituintes básicos das proteínas. As proteínas são uma fonte vital da reconstituição e promoção da biofunção da vida. Desta forma, os aminoácidos são de extrema importância para existência humana e de todos os seres vivos (SATO, 2001).

Na indústria de alimentos utiliza-se combinação de aminoácidos para realçar o sabor dos alimentos. O efeito flavorizante do glutamato monossódico já é bem conhecido; o aspartato sódico e a L-alanina são adicionados em suco de frutas para melhorar o sabor e a glicocola, aminoácido não essencial, adiciona-se aos alimentos que contém edulcorantes. A L-cisteína melhora a qualidade do pão durante o processo de cocção, e atua como antioxidante nos sucos de frutas. O L-

triptofano combinado com a L-histidina atua também como antioxidante e utiliza-se para evitar rancificação do leite em pó. O aspartame (L-aspartil-L-fenilalanina metil-éster), que se produz a partir da L-fenilalanina e ácido L-aspártico, utiliza-se como edulcorante de baixa caloria nas bebidas não alcoólicas (SATO, 2001). Podem também ser utilizados na medicina como componentes de soluções no tratamento pós-operatório, desintoxicantes nas disfunções hepáticas e gastrointestinais, em moléstias nervosas e mentais e mesmo como tônico orgânico (SATO, 2001).

Segundo Bastos e Costa (2011), o ácido glutâmico tem sido utilizado como aditivos de uso industrial. Estes aditivos respondem por 6,3% do total exportado no ano de 2010, sendo os sais do ácido glutâmico um dos principais produtos exportados. Aproximadamente 66% da produção industrial de aminoácidos é utilizada na formulação de alimentos, sendo 31% utilizados como aditivos de rações, 4% em medicina e cosmética, e como matéria-prima na indústria química (SATO, 2001).

Alguns aminoácidos podem ser obtidos por via fermentativa empregando diferentes fontes de carbono, como glicose, frutose, glicerol, melaço, etanol, entre outros. Para a produção do polímero γ -PGA e posterior produção do aminoácido ácido glutâmico pode-se utilizar o glicerol, glicose, sacarose, maltose, lactose, amido e ácido cítrico como fontes de carbono (SHI et al., 2006b). Para a escolha da melhor fonte de carbono deve-se levar em conta o menor custo, maior rendimento de aminoácidos obtidos e quantidade de biomassa produzida.

Estudos mostram que o incremento do glutamato no meio fermentativo não influenciou no crescimento celular, no sistema de produção do γ -PGA, mas reduz a utilização da glicose. O L-glutamato presente em baixa concentração (5 g/L) pode ser totalmente convertido em γ -PGA, entretanto em concentrações acima de 30 g/L, uma alta concentração residual do L-glutamato (> 40% da concentração inicial do L-glutamato) foi detectada no final da fermentação (HUANG et al., 2011).

As propriedades estimulantes do sabor do ácido glutâmico foram descobertas no Japão em 1908 por Kikunoe Ikeda, e a produção comercial do glutamato sódico ocorreu a partir de hidrolisados ácidos de trigo e proteína de soja logo depois (SATO, 2001).

O mercado global de aminoácidos movimenta cerca de 1 milhão de toneladas, mas ainda é considerado um nicho. Em 2007 a produção brasileira representava cerca de 13% da produção mundial (AJINOMOTO, 2011).

A maior parte dos fabricantes do ácido glutâmico está situada no sudeste da Ásia (Japão, Coreia e Taiwan), sendo as firmas japonesas as que mais se destacam como a Ajinomoto Co., Kyowa Hakko Kogyo Co. e Tanabe Seiyaku Co. Dentre os fabricantes ocidentais do glutamato sódico destacam-se Stauffer Chem. Co. (EUA) e Orsan, S.A. (França) (SATO, 2001).

A Tabela 1 apresenta o valor, o volume e o preço dos sais de ácido glutâmico utilizados como aditivos de uso industrial durante os anos 2008, 2009 e 2010 (BASTOS; COSTA, 2011).

Tabela 1. Valor, volume e preço dos aditivos de uso industrial

Produto	Valor (US\$ FOB mil)			Volume (tonelada)			Preço (US\$/ton)		
	2008	2009	2010	2008	2009	2010	2008	2009	2010
Sais do ácido glutâmico	130.837	121.781	152.785	114.329	91.142	106.424	1.144	1.336	1.436
Lisina	155.075	101.882	138.390	99.444	82.074	78.013	1.559	1.241	1.774
Óleos essenciais de laranja	70.893	55.842	74.455	30.078	28.408	28.805	2.357	1.966	2.585
Subprodutos terpênicos residuais da desterpenação dos óleos essenciais	53.397	47.415	56.988	36.100	35.660	35.146	1.479	1.330	1.621

FOB: Termo Internacional do Comércio; Free on Board. **Fonte:** BASTOS; COSTA, 2011.

A Ajinomoto continua sendo o único produtor no Brasil. Aproximadamente 16% das exportações mundiais do ácido glutâmico e seus sais são de responsabilidade do país. Devido a crise ocorrida durante o ano de 2009, tal exportação caiu aproximadamente 6%. Em 2010, o valor foi retomado (BASTOS; COSTA, 2011).

Vários micro-organismos têm sido estudados para a produção de aminoácidos. Dentre estes podemos destacar *E. coli* (GERIGK et al., 2002), espécies dos gêneros *Brevibacterium* (YAO et al., 2001), *Corynebacterium* (SAHM et al., 1995; WADA et al., 2002; HERMANN, 2003) e *Bacillus* (YAO et al., 2009; BAJAJ et al., 2008; SHI et al., 2006b; GOTO; KUNIOKA, 1992).

2.2. Poli aminoácidos

Poli aminoácidos são poliamidas compostos de aminoácidos simples específicos diferindo das proteínas que possuem uma variedade de aminoácidos. Outra diferença importante é na formação da molécula de proteína, onde o DNA direciona a colocação dos aminoácidos numa sequência específica. Já os poli aminoácidos são biossintetizados por diferentes modos e diferentes micro-organismos (KUNIOKA, 1997). Em proteínas, as ligações amidas são formadas entre os grupos α -amino e α -carboxílicos (ligações α -amida), em poli aminoácidos as ligações amidas envolvem outros tipos de ligações como a ligação entre os grupos β -, α -carboxílico e ϵ -amino (CANDELA; FOUET, 2006).

Na natureza existem 3 diferentes poli aminoácidos: ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA), poli- ϵ -lisina (ϵ -PL) e o polímero de ácido aspártico com grupos laterais de arginina ligados ao grupo β -carboxil (KUNIOKA, 1997). O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) (Figura 1) é um polímero extracelular produzido como fina camada de lodo por certas espécies de *Bacillus*, é aniônico, ocorre naturalmente, solúvel em água, homopoliamida constituído por monômeros D- e L- ácido glutâmico conectados por ligações amida entre grupos α -amino e γ -carboxílico (SILVA, 2010). O γ -PGA naturalmente produzido contém aproximadamente iguais quantidades das formas D- e L- unidades e podem atingir alto peso molecular (PORTILLA-ARIAS et al.,

2007). É biodegradável, comestível e não tóxico para humanos e ambientes, pelo que tem sido sugerido como bom candidato a várias aplicações, como em alimentos, cosméticos, indústrias farmacêuticas, para minimizar os efeitos colaterais, e medicina. Pode ser utilizado com espessante e umectantes. (SHI et al., 2006b). É comercialmente produzido pela Vedan, Taiwan, para aplicação em alimentos e cosméticos (BAJAJ, 2011).

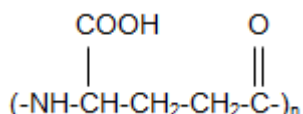


Figura 1. Ácido γ -PGA

O ácido γ -PGA foi descoberto por Ivánovics e colaboradores como um componente da cápsula do *Bacillus anthracis* em 1937 (SHI et al., 2006b) e é lançado para o meio devido envelhecimento ou autólise da célula (BAJAJ, 2011). Desde Bovarnick que mostrou em 1942 que γ -PGA se acumulava em caldo de cultura de *Bacillus subtilis* como um produto de fermentação, muitas pesquisas têm sido realizadas. Posteriormente foi identificado em outras espécies de *Bacillus* como polímero extracelular (KO; GROSS, 1998; KUNIOKA; GOTO, 1994; KUBOTA et al., 1993) incluindo *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* (SHI, 2006b; KAMBOUROVA et al, 2001; THORNE; LEONARD, 1958; BOVARNICK, 1942), *Bacillus subtilis* IFO3335 (GOTO; KUNIOKA, 1992). Por exemplo, uma tradicional comida Japonesa conhecida como “natto” (fermentação das sementes de soja) é uma mistura de γ -PGA e frutanas (polissacarídeos da frutose) produzida por *Bacillus natto* (SHI et al., 2006b).

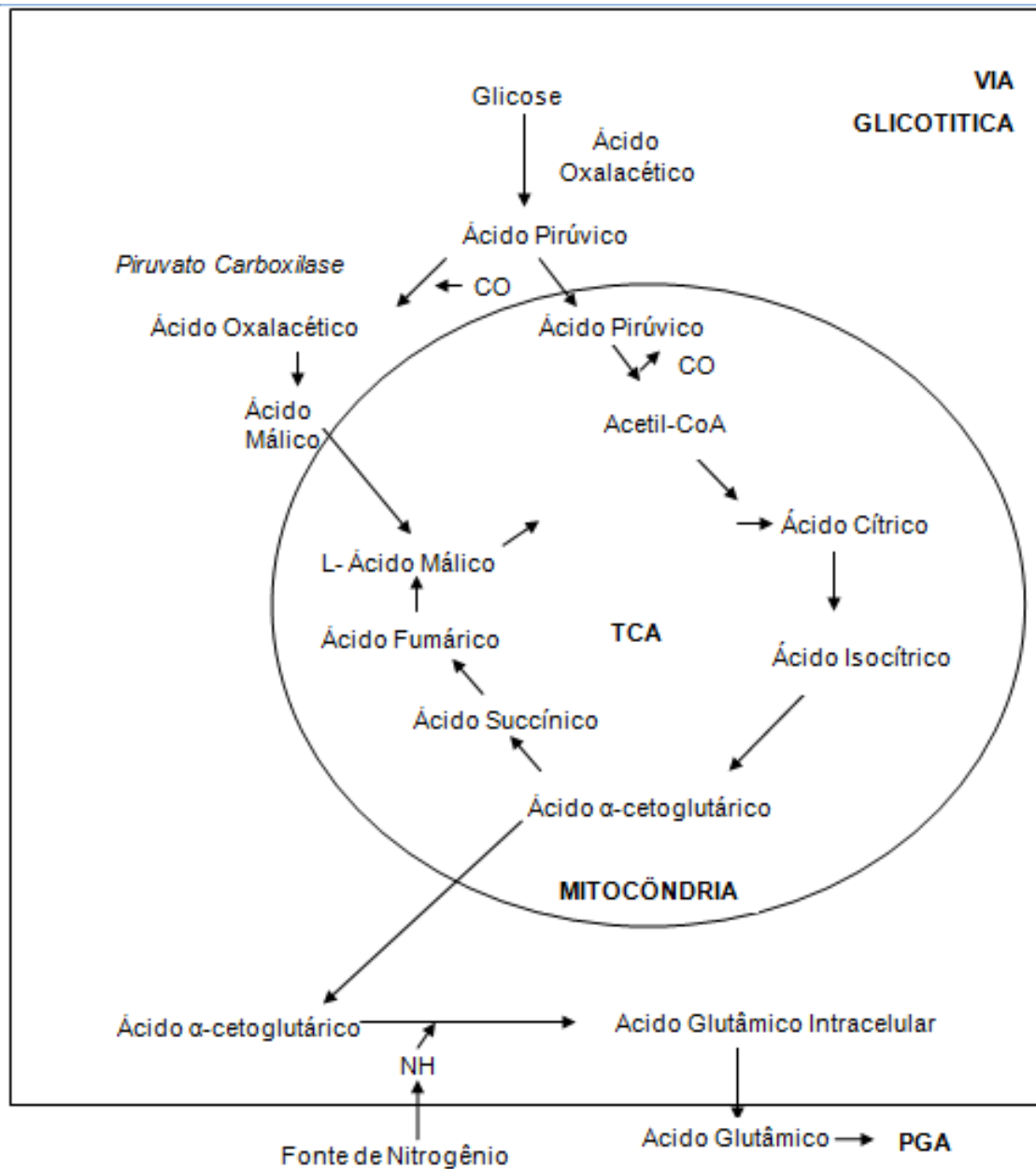
Estratégias para a produção de γ -PGA em fermentação submersa (Smf) têm sido estudadas com bastante frequência além do estudo da produção de γ -PGA em meio sólido (SSF). Modificações do γ -PGA por esterificação (PORTILLA-ARIAS et al., 2007) do lado dos grupos carboxílicos, tem sido abordada com frequência para modificar as propriedades do biopolímero.

Por serem altamente solúveis em água e biodegradável, derivados de γ -PGA têm o potencial de servir como substitutos de hidrogéis à base de petróleo e polímeros termoplásticos. γ -PGA pode também ser capaz de servir como agente aplicado em várias questões do ambiente, tais como absorção de íons de metais pesados (SHI et al., 2006b). Paralelo ao crescimento no número de aplicações do γ -PGA ocorre a busca por métodos de redução do custo de produção e comercialização de suas aplicações.

O *Bacillus subtilis* ZJU-7 foi isolado recentemente do processo de fermentação usando coalhada de feijão (comida tradicional Chinesa) e tem demonstrado ser bom produtor em grande escala do γ -PGA, chegando a produzir 54,4 g/L do polímero em meio nutriente contendo sacarose e glutamina (SHI et al., 2006a).

A produção do γ -PGA via fermentação aeróbia tem sido estudada recentemente (RICHARD; MARGARITUS, 2003a; KO; GROSS, 1998; CROMWICK et al., 1996; KUNIOKA; GOTO, 1994). Muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos para evidenciar as rotas metabólicas da biossíntese do γ -PGA a fim de aumentar sua produtividade (SHI et al., 2007). Os resultados indicam que a chave para síntese do γ -PGA é o 2-oxoglutarate, que é um precursor direto do L-ácido glutâmico (KO; GROSS, 1998) e é sintetizado via glicólise e ciclo do ácido tricarboxílico (SHI et al., 2007). A Figura 2 demonstra resumidamente o processo para a produção celular do γ -PGA.

CÉLULA

**Figura 2. Produção do γ -PGA**

Fonte: GOTO; KUNIOKA, 1992 com algumas modificações.

Produção com rendimento alto de γ -PGA (aproximadamente 50 g/L) tem sido relatada dentro de uma variedade de condições de cultura, mas mais esforços são ainda necessários para melhorar o processo de produção do γ -PGA através da otimização de bioprocessos (SHI et al., 2007; SHI et al., 2006a; SHI et al., 2006b).

Uma aplicação interessante foi proposta por Hoppensack e colaboradores em 2003. Eles estudaram a conversão do nitrogênio, contido em esterco líquido, em biomassa e γ -PGA pelo *Bacillus licheniformis* recém-isolada. Observaram que ao espalhar uma grande quantidade de esterco líquido nos campos agrícolas, ocorria a eutrofização do solo e da superfície da água e poluição da atmosfera devido à alta quantidade de nitrogênio da amônia. A solução proposta foi estudar a produção do γ -PGA e biomassa utilizando *Bacillus licheniformis*, devido sua habilidade em utilizar o nitrogênio. Os autores utilizaram a metodologia de fermentação em batelada com esterco de suínos e complementaram o meio com os sais minerais para a produção do γ -PGA. O meio utilizado era composto de esterco líquido adicionado de 18 g/L de citrato e 80 g/L de glicerol, obtendo-se redução da concentração de amônio de 2,83 para 0,1 g/L. A produção de γ -PGA foi de 0,16 g e de biomassa de 7,5 g de massa seca/massa após 410 h de fermentação. Aproximadamente 28% (w/w) do nitrogênio total foram convertidos em biomassa celular, sendo 0,1% (p/p) utilizada para produção do γ -PGA. Cerca de 33% (p/v) do amônio foi perdido no processo.

Goto e Kunioka (1992) estudaram a biossíntese e hidrólise do γ -PGA utilizando o *Bacillus subtilis* IFO3335, que requer biotina como nutriente. Os autores observaram que não houve produção do γ -PGA pelo micro-organismo na ausência de L-ácido glutâmico. Ao adicionar ácido cítrico como fonte de carbono em um meio contendo ácido glutâmico e sulfato de amônio, ocorreu produção de grande quantidade de γ -PGA (9,6 g/L), sem o aparecimento de subprodutos. Entretanto, quando se adicionou glicose ao meio com ácido glutâmico, ocorreu o aparecimento de um subproduto com aparência de polissacarídeo. Já na ausência de ácido cítrico ou com adição de ácido málico, ácido succínico ou ácido fumárico

no referido meio, o γ -PGA praticamente não foi produzido e houve predominância do subproduto. Ainda, ao utilizar o ácido acético como fonte de carbono no meio com ácido glutâmico ocorreu inibição de síntese celular e consequentemente produção do γ -PGA.

Goto e Kunioka (1992) discutiram o isolamento do *Bacillus subtilis* que não requerem L-ácido glutâmico, bem como não haver necessidade de biotina no meio de cultura para a produção de γ -PGA. Após a produção do γ -PGA, Goto e Kunioka (1992) estudaram um processo de hidrólise do γ -PGA em soluções aquosas utilizando diferentes temperaturas (80, 100, e 120 °C), observando as mudanças da massa molar com o tempo. Observaram que a degradação do γ -PGA através de uma reação em cadeia ao acaso. Quanto maior a temperatura, mais rápida foi a degradação, obtendo-se moléculas menores.

Li Y, Meng Y e Sun S (2008) conseguiram produzir γ -PGA com concentração de 34,1 g/L utilizando o *Bacillus subtilis* CGMCC N°. 2108. No processo fermentativo, o meio de cultura utilizado continha ácido glutâmico na concentração de 40-60 g/L.

Richard e Margaritis (2003a) estudaram a produção do γ -PGA utilizando também a bactéria *Bacillus subtilis* em um processo fermentativo em batelada, cujo meio tinha como única fonte de carbono o glicerol e ácido cítrico/ácido glutâmico como indutores. Os autores obtiveram concentração de 23 g/L do produto após 30 h de fermentação. Este estudo teve como base o fato de que o controle da adição do glicerol no meio fermentativo (KO; GROSS, 1998) e pH (CROMWICK et al.,1996) leva ao incremento da produção do γ -PGA por *Bacillus licheniformis*, parâmetros até então não estudados para o *Bacillus subtilis*. Os pesquisadores concluíram que o melhor pH_{inicial} para a fermentação por *Bacillus subtilis* IFO 3335 é pH 7, quando obtiveram biomassa de 4,2 g/L e uma concentração de γ -PGA de 18 g/L. Tanto o ácido cítrico quanto o ácido glutâmico presentes no meio fermentativo foram consumidos como fonte de carbono durante o processo. Após determinação do pH_{inicial}, os autores decidiram estudar a

variação na concentração inicial do glicerol. O estudo mostrou que o aumento na concentração inicial do glicerol tem efeito positivo na concentração final de γ -PGA no meio fermentativo. Uma concentração inicial de 20 g/L de glicerol resultou em 23 g/L após 30 h de fermentação. O aumento da concentração inicial do glicerol afetou também a biomassa final, cuja produção foi similar em todas as fermentações, e não houve um efeito inibitório para concentrações de glicerol superiores a 40 g/L.

Shi e colaboradores (2006b) aperfeiçoaram o processo de produção do γ -PGA por *Bacillus subtilis* ZJU-7 utilizando superfície de resposta. Foram investigados os componentes do meio como fonte de carbono e nitrogênio. Entre as 7 fontes de carbonos pesquisadas, a sacarose induziu a alta taxa de produtividade do γ -PGA. Entre as diferentes fontes de nitrogênio, a triptona apresentou o melhor efeito na produção do γ -PGA, sendo a concentração máxima obtida de 58,2 g/L após 24 h de fermentação a 37 °C.

Bajaj e Singhal (2009) estudaram o efeito da adição de diferentes aminoácidos e metabólitos intermediários precursores do ciclo do ácido tricarboxílico que podem atuar como precursores da produção do γ -PGA por *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. Concentração máxima de 35,75 g/L foi obtido em um meio contendo 0,5 mM L-glutamina e 10 mM ácido α -cetoglutarico. Quando utilizaram o meio de crescimento sem a adição de 0,5 mM L-glutamina e 10 mM ácido α -cetoglutarico obtiveram concentração de 26,12 g/L do γ -PGA. O meio de crescimento era composto por glicerol, ácido cítrico, ácido L-glutâmico, sulfato de amônio, K_2HPO_4 , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$. O pH_{inicial} foi ajustado em 6,5, e a cultura incubada a 37 °C e agitação de 200 rpm.

Shi e colaboradores (2006a) conseguiram isolar um micro-organismo da coalhada do feijão (tradicional comida chinesa) que foi identificado como *Bacillus subtilis* ZJU-7 e avaliaram as condições para a produção do γ -PGA. Observaram que a presença de L-ácido glutâmico era necessário no meio de fermentação para a produção do γ -PGA. Eles obtiveram 54,4 g/L do γ -PGA quando a fermentação

ocorreu a 37 °C, 24 h, valor elevado quando comparado com outros resultados da literatura.

Wang e colaboradores (2008) observaram que algumas espécies de *Bacillus subtilis* produzem ao mesmo tempo antibióticos e γ -PGA. Estes antibióticos foram purificados e identificados como antifúngicos.

Floculação é, no domínio da química, um processo onde colóides saem da suspensão sob a forma de flocos ou escamas. É uma técnica comum e efetiva, muito utilizada em tratamento de água para remoção de sólidos suspensos e íons metálicos. (DENG et al., 2003). Pode também ser utilizada como alternativa à centrifugação e separação de células microbianas de caldos fermentativos em alimentos, indústrias farmacêuticas e medicina (SHIH; VAN, 2001). Bhunia e colaboradores (2012) mostraram que o γ -PGA tem excelente atividade de floculação e não contém polissacarídeo em sua composição, além de ser um produto seguro e considerado eco-amigável. Eles estimularam a floculação adicionando cátions bivalentes e trivalentes, controlando o pH e a concentração do γ -PGA na solução.

Chung e colaboradores (2013) estudaram a modificação do γ -PGA para aplicação na área biomédicas. Através de alterações estruturais, geométricas e químicas utilizando mudanças de temperatura e interação com o solvente, o γ -PGA demonstrou ser um candidato atraente para aplicações em biomédicas, uma vez que é naturalmente produzido, biocompatível e degradável através da via enzimática. A fibra produzida foi utilizada no tratamento de feridas como curativo e materiais de compressão.

Pereira e colaboradores (2012) modificaram a estrutura do γ -PGA para aplicações em biomédicas, na forma de nano partículas utilizadas para a administração de substâncias biologicamente ativas, tais como proteínas e fármacos antiinflamatórios.

Diversas são as metodologias utilizadas para quantificação do γ -PGA produzido. O γ -PGA basicamente é excretado extracelularmente, fato que facilita sua purificação. Uma das metodologias empregadas é a precipitação do γ -PGA através da redução da atividade de água, conseguida através da adição de etanol ou de outro álcool como metanol, seguindo a metodologia descrita por Goto e Kunioka (1992). Assim, o γ -PGA pode ser separado por centrifugação e redissolvido em água destilada, sendo o sobrenadante descartado. Análises posteriores para quantificação e caracterização do polímero, como cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia de camada delgada (TLC) devem ser realizadas, pois proteínas e polissacarídeos podem ser precipitados juntamente com o γ -PGA em presença do álcool (BUESCHER; MARGARITIS, 2007).

Para análise qualitativa por cromatografia em camada delgada é necessário a hidrólise do polímero em presença de HCl 6N em altas temperaturas e posterior detecção do ácido glutâmico com uma mistura 0,2 % ninidrina em acetona (BAJAJ et AL., 2008). Já para quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência, não é necessário a degradação do γ -PGA (DO et al., 2001).

Uma alternativa interessante seria a quantificação via espectrofotometria a 400 nm. A metodologia modificada por Silva (2010) consiste na adição de uma solução de ácido tricloracético ao sobrenadante (pH 3) seguindo-se agitação por 30 min a 50 °C para extração do γ -PGA e precipitação de células e proteínas que ainda estejam presentes. Posteriormente, a mistura é submetida à centrifugação. O pH do sobrenadante obtido é ajustado a 7, seguindo-se precipitações fracionadas com etanol, sendo os precipitados separados por centrifugação. Os precipitados são suspensos em solução tampão pH 7 e o γ -PGA presente submetido a reação de complexação com brometo de cetiltrimetilamônio, que provocará turvação da solução cuja intensidade é proporcional à concentração do γ -PGA, que pode ser então quantificado por análise espectrofotométrica mediante a utilização de curva padrão (SILVA, 2010).

2.3. Métodos de Degradação do Ácido γ -poliglutâmico

Uma das características do γ -PGA é sua biodegradabilidade, por tratar-se de polímero do ácido glutâmico. Ele pode ser metabolizado como fonte de carbono bem como fonte de nitrogênio. A depolimerase que o hidrolisa foi identificada no meio de cultivo do *Bacillus licheniformis* 9945a, que é uma enzima responsável pela encapsulação da célula pelo polímero, bem como pela sua degradação (KING et al., 2000).

Micro-organismos também podem ser utilizados no processo de degradação do γ -PGA. Um meio contendo γ -PGA como única fonte de carbono e nitrogênio foi testado com vários micro-organismos. Pelo menos 12 cepas com capacidade de degradação do γ -PGA foram isoladas (OPPERMANN et al., 1998).

A degradação do γ -PGA também pode ocorrer em temperaturas elevadas, pois embora suas soluções sejam relativamente estáveis em temperatura ambiente, a amida será quebrada em temperaturas superiores a 60 °C (GOTO; KUNIOKA, 1992).

Uma metodologia de degradação do γ -PGA foi testada por Goto e Kunioka (1992). Eles monitoraram o modo de hidrólise em soluções aquosas a 80, 100 e 120 °C e as mudanças no peso molecular com o tempo e observaram que a degradação por aquecimento ocorreu de forma aleatória.

Portilla-Arias e colaboradores (2007) estudaram a degradação térmica do γ -PGA. O objetivo do trabalho foi caracterizar seu comportamento térmico e entender como ocorre o mecanismo de reação juntamente com a degradação.

Yao e colaboradores (2009) investigaram o processo de degradação enzimática do γ -PGA por *Bacillus subtilis* NX-2. Os resultados sugeriram que a γ -PGA depolimerase está presente e ativa extracelularmente na cultura. Os autores estudaram a atividade da enzima em temperaturas entre 30 e 40 °C juntamente

com o pH entre pH 5 e pH 8. Os resultados mostraram como ponto ótimo para atividade da enzima a temperatura de 30 °C e o pH 5.

2.4. Matérias-primas para Fermentação

O substrato constitui hoje, na maioria dos processos fermentativos, o custo mais alto na produção de massa microbiana e bioprodutos pela fermentação industrial. A fonte de nitrogênio é usualmente o componente mais caro requerido para crescimento microbiano, podendo ser suprido com preparação de plantas e resíduos agroindustriais (BISARIA et. al.,1997).

O meio para a produção do polímero γ -PGA normalmente contém fontes de carbono, nitrogênio e nutrientes inorgânicos como sulfato de magnésio, fosfato de potássio, sulfato de zinco, sulfato de ferro e cloreto de sódio. Fontes de carbono incluem glicose, maltose, lactose, ácido cítrico, glicerol, sacarose e amidos hidrolisados, bem como ácidos orgânicos. Como fontes de nitrogênio são normalmente utilizados sais de amônia e similares, uréia, substâncias como peptona, triptona, proteína de peixe concentrada, caseína hidrolisada, extrato de levedura, água de maceração de milho, proteína de soja hidrolisada e vários outros extratos de tecidos vegetais ou animais podem ser incorporados (CHEN et al., 2010; BAJAJ; SINGHAL, 2009; SHI et al., 2006b, GOTO; KUNIOKA, 1992).

2.4.1. Glicerol

A utilização dos biocombustíveis tem aumentado consideravelmente a cada dia, apresentando benefícios como desenvolvimento regional, social e agrícola, sustentabilidade e redução dos gases do efeito estufa. Entre os combustíveis, o biodiesel apresenta elevado potencial como biocombustível. Desde 2008, caminhões e ônibus rodam no Brasil com uma porcentagem de biodiesel feito com óleos vegetais ou gordura animal adicionado ao tradicional diesel de petróleo. Inicialmente eram 2% e a partir de 2010 a utilização deste combustível renovável e menos poluidor subiu para 5% (VASCONCELOS, 2012).

O glicerol é um dos subprodutos da produção do biodiesel, largamente produzido devido a incentivos governamentais para o aumento da produção de biodiesel no Brasil. O destino do glicerol excedente é um fator realmente preocupante, sabendo que para cada tonelada de biodiesel obtido são gerados 100 Kg de glicerol (10%), provocando vários efeitos na economia do biodiesel, uma vez que os mercados tradicionais de glicerina - termo usado para referir-se ao produto na forma comercial, com pureza acima de 95% não conseguirão absorver esta nova oferta de produto ao cenário de preços atuais (MOTA et al., 2009). A saída, como mostram várias pesquisas desenvolvidas no país, é transformá-lo num produto com maior valor agregado.

As indústrias que se destacam no beneficiamento do glicerol podem ser observadas através da Figura 3.

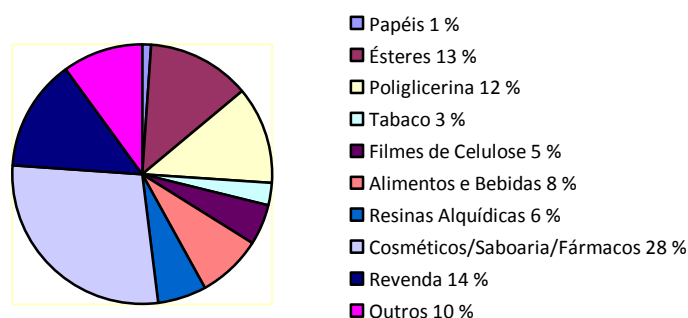


Figura 3. Principais setores industriais de utilização da glicerina

Fonte: Mota et al., 2009.

Dentro deste cenário da produção de biodiesel nacional, a previsão era de que o Brasil produzisse, em 2009, em torno de 760 milhões de litros de biodiesel, sendo que por volta de 10% de todo produto resultante da fabricação do combustível seria transformado em glicerina, ou seja, eram esperadas 76 mil toneladas de glicerol. Um grande receio é que o excesso de glicerina produzida, que é altamente poluidora possa ser descartado de maneira irresponsável no meio ambiente (COSTA, 2008).

Em 2011 foram fabricados 2,6 bilhões de litros do biocombustível e a produção estimada para 2020 é de 14,3 bilhões de litros, sendo o volume gerado de glicerol enorme e muito acima da demanda. A produção atingiu cerca de 260 mil toneladas apenas como subproduto do biodiesel, volume quase oito vezes superior à demanda, cerca de 40 mil toneladas conforme ilustra a Figura 4 (VASCONCELOS, 2012).

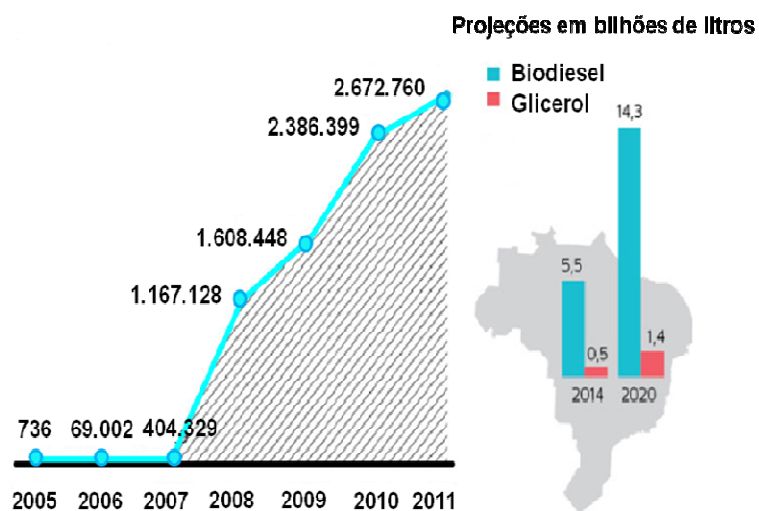


Figura 4. Produção de biodiesel no Brasil entre 2005 e 2011, em metros cúbicos

Fonte: VASCONCELOS, 2012.

Estima-se que 1,5 milhões de toneladas do glicerol são provenientes apenas das usinas de biodiesel instaladas no planeta. A Argentina, com 3,3 bilhões de litros, tornou-se em 2011 o maior produtor mundial de biodiesel, superando os Estados Unidos (3,1 bilhões de litros), o Brasil e a Alemanha (2,4 bilhões de litros) (VASCONCELOS, 2012).

Entre as diferentes utilizações da glicerina gerada nas plantas de biodiesel no Brasil, destaca-se a queimada em fornos e caldeiras para geração de energia calorífica em unidades industriais, como na produção do mesmo biocombustível, além de olarias, siderúrgicas, entre outras. Alternativa considerada

ambientalmente correta, pois o glicerol substitui a lenha e combustíveis fósseis. Muitas empresas também exportam seus excedentes de glicerina para outros países, onde a substância é usada como matéria-prima nos mercados tradicionais. Assim, a queima do produto para gerar calor e a exportação para a China são os dois principais destinos do glicerol do biodiesel. (VASCONCELOS, 2012).

Até o surgimento de outras formas de utilização da glicerina no Brasil, essa situação deverá se manter, ou seja, haverá um desequilíbrio entre oferta e demanda. Uma resposta a essa situação poderá estar no mercado internacional (RATHMANN, 2006).

Diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas para encontrar aplicação para este elevado volume de glicerol. Uma aplicação promissora deste álcool é utilizá-lo como substrato para o crescimento de micro-organismo.

2.4.2. Melaço

O melaço é um co-produto líquido que se obtém da fabricação do açúcar cristalizado, do melado ou da refinação do açúcar bruto, sendo o principal subproduto da indústria de açúcar. Cada tonelada de cana produz de 40 a 60 kg de melaço (WIKIPÉDIA, 2013). Até a metade do século passado o melaço não tinha muito aproveitamento, e era despejado em estradas de terra de acesso às usinas ou em “carreadores” de plantação de cana, para compactação do solo.

Aproximadamente 18 milhões de toneladas de melaço de cana-de-açúcar são produzidos por ano no Brasil pelo setor sucroalcooleiro (OLIVEIRA; SOUSDALEFF, 2009). Para se obter um maior rendimento na produção de biomassa microbiana a partir de melaço, utiliza-se a suplementação do meio de cultivo com fontes de nitrogênio e alguns minerais como fósforo e magnésio (DIEZ; YOKOYA, 1996).

A aplicação do melaço na suplementação de meio de cultivo foi motivada por diversas pesquisas devido ao seu baixo custo, alta disponibilidade e riqueza

em composição com relação à fonte de açúcares, nitrogênio, vitaminas (OLIVEIRA; SOUSDALEFF, 2009) e minerais (manganês, magnésio, fósforo, potássio, zinco, sódio e cálcio). A Tabela 2 mostra a composição de alguns melaços obtidos nos estados de São Paulo e Alagoas.

Tabela 2. Variabilidade da composição do melaço em usinas de açúcar de São Paulo e Alagoas

Elemento	Valores Observados					
	São Paulo			Alagoas		
	Médio	Mínimo	Máximo	Médio	Mínimo	Máximo
Água (%)	17,3	8,2	26,8			
Sólidos Totais (%)	82,7	73,2	91,8			
Brix (%)	80	65	88	78,61	76,77	83,3
Pureza (%)	65	56	76	46,54	40,41	55,67
Sacarose (%)	52	47	64			
Glicose (%)	12	6	20			
Frutose (%)	9	5	17			
Açúcares Redutores (%)	6	4	12	16,2	14,45	18,03
Açúcares Totais (%)	65,6	52,1	72,1	54,73	51,11	61,09
Gomas (ppm)	-	-	2000			
Substâncias Infermentecíveis (%)	0,3	0,1	0,5			
Matéria Nitrogenada (ppm)	-	100	300			
Acidez Sulfúrica (%)	0,3	0,18	1,2			
pH	6,3	5	6,8			
Cinzas (%)	5	3,5	7			
P ₂ O ₅	0,05	0,01	0,15	0,07	0,02	0,14
K ₂ O	2,1	1,23	2,68	3,51	2,93	4,52
CaO	0,36	0,14	0,73	1,36	0,93	2,03
MgO	0,12	0,03	0,6	1,03	0,6	1,31
SiO ₂	0,58	0,56	0,62			
Fe ₂ O ₃	0,32	0,28	0,56			
SO ₃	1,17	1	1,19			
Cl	0,18	0,14	0,28			
Na ₂ O	0,12	0,11	0,19			
Vitaminas A, B1 e B2		Variável				

Fonte:

<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Materias%20primas%20da%20fermentacao%20etanolica.pdf>.

Matérias-primas da fermentação etanólica. Clóvis Parazzi. Acessado em 20 set 2011.

No Brasil o melaço é utilizado principalmente na fabricação de álcool etílico, sendo aproveitado também como substrato em outros processos biotecnológicos para a produção de proteína, rações bovinas como suplemento para forragens volumosas, suplemento alimentar para suínos, equinos e aves, levedura prensada para panificação, antibióticos, adubação orgânica, pulverização do milho, confecção de molde na indústria de fundição, confecção de refratários, revestimento de forno e na massa de tijolo na indústria cerâmica, para dar consistência ao papelão e à casquinha de massa de tijolo na indústria de cerâmica, para dar consistência à casquinha de sorvete, em pneus, em velas para filtro de água, produção de proteína, levedura para panificação e antibiótico (ALCARDE, 2013).

A composição do melaço com relação aos açúcares presentes pode variar em função do tempo de armazenamento, conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3. Composição do melaço em função do tempo de armazenamento

Índices	Idade (meses)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Brix	89,2	88,9	88,6	88,4	88,2	87	88	88
Sacarose	37,8	37,3	37	36,2	35,8	35,4	35,1	35
Glicose	11,5	11	10,7	10,5	10,3	9,8	10,5	10,1
Açúcares Totais	49,2	48,3	47,7	46,7	46	45,2	45,6	45,6
pH	5,9	5,7	5,6	5,5	5,3	5,3	5,2	5,2

Perdas de açúcares totais: 3,67%

Fonte:

<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Materias%20primas%20da%20fermentacao%20etanolica.pdf>.

Matérias-primas da fermentação etanólica. Clóvis Parazzi. Acessado em 20/09/2011.

A composição do melaço produzido em relação à quantidade de cana-de-açúcar processada varia em relação às variedades de cana-de-açúcar, como exemplificado na Tabela 4.

Tabela 4. Açúcar mascavo, rapadura e melaço produzidos em quilogramas por tonelada de cana-de-açúcar

Variedades	Açúcar Mascavo	Rapadura	Melaço
RB835486	81,02	79,46	93,5
RB855113	90,72	79,05	98,96
RB85536	78,01	81,31	83,82

Fonte: Margarido et al., 2005.

Pesquisas são desenvolvidas para aplicação do melaço produzido devido seu elevado teor em açúcares totais e baixo custo, sendo muito utilizada em processos fermentativos na forma em pó ou líquida em substituição à utilização da sacarose ou da glicose.

2.5. Métodos Fermentativos

Atualmente são utilizados vários tipos de biorreatores e as fermentações são conduzidas na forma batelada, batelada alimentada, batelada alimentada repetida ou contínua (HERMANN, 2003).

A configuração mais simples de reator para qualquer reação é a forma em batelada, na qual o reator é abastecido com os reagentes e a descarga é feita após o término da reação, sendo utilizado para operações em pequena escala.

A síntese de aminoácidos em modo descontínuo é amplamente empregada, porém tem como desvantagem a produtividade relativamente baixa devido à extensão da fase lag (HERMANN, 2003).

O método de batelada alimentada é utilizado amplamente na produção de etanol, antibióticos, enzimas e aminoácidos (SCHMIDELL et al., 2001). Ele tem como principais vantagens: o controle da concentração dos nutrientes, reduzindo a sua influência no rendimento e produtividade do processo (GOURDON; LINDLEY, 1999); a redução do estresse osmótico das células; o melhor controle da transferência de oxigênio no biorreator (HERMANN, 2003); simplicidade dos equipamentos e condições experimentais e facilidade na repetição de várias

condições iniciais e na análise dos dados para o cálculo das diferentes taxas de reação.

Alguns outros fatores devem ser controlados além do modo de condução da fermentação. Entre eles podemos citar o controle de alguns fatores físicos (temperatura), químicos (pH, oxigenação) e microbiológicos (espécie, linhagem, concentração do micro-organismo, contaminações). O controle de todos estes fatores é fundamental para garantir a eficiência do processo.

2.6. Artigo de Revisão Publicado

Um artigo de revisão foi publicado conforme apresentado no Anexo 1.

3. Material e Métodos

3.1. Micro-organismos e Manutenção

Os micro-organismos utilizados neste trabalho para a síntese do γ -PGA são espécies de *Bacillus*, fornecidos pela Agricultural Research Service Culture Collection (também conhecidos como NRRL Collection), ou seja, *Bacillus subtilis* NRRL NRS-1270, *Bacillus subtilis* NRRL B-14819, *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, *Bacillus subtilis* NRRL B-41094, *Bacillus negevensis* NRRL B-41288, *Bacillus subtilis* NRRL B-41294 e *Bacillus subtilis* NRRL B-41337.

O meio utilizado para crescimento e manutenção dos micro-organismos (Tabela 5) foi o meio de cultura BHI (brain heart infusion) utilizado conforme instruções do fabricante, junto com ágar bacteriológico na concentração final de 20 g/L, ambos da marca OXOID. A mistura foi aquecida até a homogeneização da solução e depois foi adicionado em tubos de vidro fechados e autoclavados a 121 °C por 15 minutos.

Para o estudo no processo fermentativo de produção do γ -PGA, foram testadas as 7 diferentes *Bacillus* spp, no meio proposto por Bajaj e colaboradores (2008) com algumas modificações e com as mesmas condições iniciais, 72 h de fermentação, na temperatura de 37 °C, pH_{inicial} 6,5 e agitação de 200 rpm.

Tabela 5. Composição do meio BHI

Composição	Quantidade (g.L ⁻¹)
Infusão de (sólidos) cérebro	12,5 %
Infusão de (sólidos) coração	5,0
Proteose peptone	10,0
Glicose	2,0
Cloreto de Sódio	5,0
Difosfato de Sódio	2,5

pH 7,4 ± 2 a 25 °C; Fonte: Oxoid, Manual do fabricante.

Após a autoclavagem, os tubos foram inclinados até resfriamento, e posteriormente inoculados com o micro-organismo em ambiente asséptico, incubados a 30 °C por 48 h e estocados a 4 °C. Para melhor conservação das culturas, foram feitos repiques a cada três meses.

3.2. Preparo do Inóculo

Um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio BHI esterilizado foi inoculado com alça da cultura do micro-organismo em meio semi-sólido. Após incubação a 30 °C por 12 horas e agitação a 200 rpm em shaker (TECNAL, mod. TE 421), o conteúdo deste frasco foi utilizado como inóculo nas concentrações de aproximadamente 2×10^{-3} g/mL do micro-organismo.

3.3. Cultivo Submerso em Incubadora de Agitação Orbital (shaker)

Para a realização do processo fermentativo foi utilizado o método de batelada que é um método descontínuo. Utilizou-se inicialmente como base o meio reportado por Bajaj et al. (2008) com algumas modificações. Todos os meios eram compostos por K_2HPO_4 , 1,0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,5 g/L, $CaCl_2 \cdot H_2O$, 0,2 g/L e $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,05 g/L, diferindo entre si com relação a fonte de carbono e nitrogênio, quantidades de ácido cítrico e ácido glutâmico utilizados.

O pH_{inicial} do meio foi ajustado para 6,5 usando NaOH 6N e/ou HCl 2N. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. A fermentação ocorreu em frascos de Erlenmeyer com capacidade para 250 mL contendo 45 mL do meio de cultura com composição descrita posteriormente, previamente esterilizada a 121 °C por 15 min. Os frascos foram inoculados com 10% de inóculo conforme o item preparo do inóculo e incubados por 72 h, agitação de 200 rpm.

Todas as fermentações foram realizadas em duplicata. Amostras foram coletadas ao final das 72 h para análises de pH_{final}, biomassa, detecção de ácido glutâmico, quantificação de γ -PGA e substrato residual.

3.3.1. Avaliação das Composições do Meio de Cultura para Produção do γ -PGA

Para a escolha do melhor meio fermentativo no processo de produção do γ -PGA utilizou-se o meio reportado por Bajaj e colaboradores (2008) com algumas modificações. A concentração do ácido cítrico manteve-se constante para todos os meios de cultivo, 15,2 g/L, assim como a concentração do sulfato de amônio, 8 g/L e a temperatura foi estabelecida 37 °C. A Tabela 6 mostra as concentrações de glicerol e ácido glutâmico utilizados nos meios de fermentação.

O micro-organismo utilizado foi o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, escolhido ao acaso. Posteriormente novas cepas serão estudadas.

Tabela 6. Produção do γ -PGA por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 em meio com diferentes concentrações de glicerol e ácido glutâmico

Meio	Glicerol bruto (g.L ⁻¹)	Ácido glutâmico (g.L ⁻¹)
A	62,5	4,0
C	62,5	-
E	62,5	4,0
F	62,5	4,0
G	62,5	-
H	62,5	-
I	100,0	4,0
J	100,0	4,0
K	100,0	-
L	100,0	-
M	150,0	4,0
N	150,0	4,0
O	150,0	-
P	150,0	-
X	Solução do aminoácido ácido glutâmico em metanol 4,0	

meio A e C: controle, meios sem fermentar; - : ausência.

3.3.2. Avaliação dos Micro-organismos, da Composição do Meio, da Temperatura e do pH_{inicial} para Utilização no Processo Fermentativo

3.3.2.1. Escolha dos Micro-organismos

O meio utilizado para seleção dos micro-organismos era baseado no meio reportado por Bajaj e colaboradores (2008) com algumas modificações. A concentração do glicerol bruto foi 62,4 g/L, ácido cítrico, 15,2 g/L e sulfato de amônio, 8 g/L. A temperatura foi estabelecida em 37 °C durante todo o processo fermentativo.

Os micro-organismos estudados foram *Bacillus subtilis* NRRL NRS-1270, *Bacillus subtilis* NRRL B-14819, *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, *Bacillus subtilis* NRRL B-41094, *Bacillus negevensis* NRRL B-41288, *Bacillus subtilis* NRRL B-41294 e *Bacillus subtilis* NRRL B-41337.

3.3.2.2. Escolha do Meio, pH_{inicial} e Temperatura

Depois de selecionados os micro-organismos aplicou-se um planejamento experimental fatorial fracionado 2^{4-1} com 4 variáveis. As variáveis independentes foram concentração do glicerol bruto, concentração do ácido cítrico, pH_{inicial} e temperatura. Já as variáveis dependentes foram pH_{final}, biomassa e produção do γ -PGA. Os demais componentes do meio não foram testados por estarem presentes em pequenas quantidades.

Os níveis das variáveis estudadas foram os mesmos para todos os micro-organismos e podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7. Níveis estudados no planejamento experimental 2^{4-1} , 72 h de fermentação e agitação de 200 rpm.

Variáveis/Níveis		-1	0	+1
Glicerol (g.L ⁻¹)	(x1)	40	60	80
Ácido Cítrico (g.L ⁻¹)	(x2)	10	15	20
pH _{inicial}	(x3)	5,5	6,5	7,5
Temperatura (°C)	(x4)	27	32	37

3.3.3. Efeito da Temperatura e do pH_{inicial}

Um DCCR (delineamento composto central rotacional) foi realizado para observar o efeito das variáveis temperatura e pH_{inicial}. Os níveis estudados no DCCR com 2 variáveis estão especificados na Tabela 8.

Tabela 8. Níveis de temperatura e pH_{inicial} estudados no DCCR, 72 h de fermentação e agitação de 200 rpm.

Variáveis/Níveis		-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura (°C)	(x1)	24,95	27	32	37	39,05
pH _{inicial}	(x2)	5,09	5,50	6,50	7,50	7,91

3.3.4. Estudo da Adição de Diferentes Fontes de Nitrogênio e Diferentes Concentrações de Ácido Cítrico no Meio de Fermentação de *Bacillus velezensis* NRRL B-23189

Para o estudo das diferentes fontes de nitrogênio realizaram-se duas fermentações em diferentes temperaturas, 27 e 32 °C. Fixou-se a concentração de glicerol em 80 g/L com o objetivo de maior produção do γ -PGA. Testou-se duas concentrações de ácido cítrico, 0 e 15 g/L, variando as fontes de nitrogênio de acordo com a Tabela 9.

Tabela 9. Diferentes formulações de meio variando a composição de nitrogênio e a presença e ausência do ácido cítrico

Meio	Fontes de Nitrogênio (g.L ⁻¹)	Ácido Cítrico (g.L ⁻¹)
A	Sulfato de amônio: 8,0	15
B	Sulfato de amônio: 8,0	-
C	AMM: 20,0	15
D	AMM: 20,0	-
E	Uréia: 3,7	15
F	Uréia: 3,7	-
G	Branco	15
H	Branco	-

AMM: água de maceração de milho (proveniente da indústria Refinações de Milho Brasil Ltda)

3.3.5. Estudo das Variáveis Glicerol/Melaço, Sulfato de Amônio e Ácido Cítrico no Processo Produtivo do γ -PGA com *Bacillus velezensis* NRRL-23189

Um DCCR foi realizado para o estudo das variáveis glicerol, sulfato de amônio e ácido cítrico nas condições descritas anteriormente, mas com a temperatura fixada em 27 °C. Posteriormente, um segundo DCCR foi realizado para o estudo das variáveis melaço, sulfato de amônio e ácido cítrico nas mesmas condições. O micro-organismo analisado foi o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189.

A Tabela 10 mostra as variáveis estudadas pelo novo DCCR com seus níveis reais e codificadas, quando utilizou-se glicerol como fonte de carbono.

Tabela 10. Tabela variáveis e níveis estudados no DCCR 2³

Variáveis/Níveis		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Glicerol (g.L⁻¹)	(x1)	66,40	80	100	120	133,60
Ácido Cítrico (g.L⁻¹)	(x2)	11,60	15	20	25	28,40
Sulfato de Amônio (g.L⁻¹)	(x3)	1,28	4	8	12	14,72

Pela Tabela 11 observam-se as variáveis estudadas pelo novo DCCR com seus níveis reais e codificados, quando utilizou-se melaço como fonte de carbono.

Tabela 11. Tabela variáveis e níveis estudados no DCCR 2³

Variáveis/Níveis		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Melaço (g.L ⁻¹)	(x1)	100	140,5	200	259,5	300
Ácido Cítrico (g.L ⁻¹)	(x2)	0	5,06	12,5	19,94	25
Sulfato de Amônio (g.L ⁻¹)	(x3)	1,28	4	8	12	14,72

3.4. Cultivo Submerso em Biorreator

Após determinada às composições ideais do meio fermentativo, Tabela 12, foram realizadas fermentações em biorreator de tanque agitado (New Brunswick Scientific, mod. Bio Flow III), com capacidade de 5 L, objetivando a determinação da produtividade do γ -PGA em escala maior.

Tabela 12. Composição dos meios utilizados nos biorreatores de 5 L.

Composição (Meio com melaço)	Concentração (g.L ⁻¹)	Composição (Meio com glicerol)	Concentração (g.L ⁻¹)
Melaço	200	Glicerol	100
Ácido Cítrico	12,5	Ácido Cítrico	20
Sulfato de Amônio	8	Sulfato de Amônio	8
K ₂ HPO ₄	1	K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,05	MnSO ₄ .7H ₂ O	0,05

A tomada de amostras para determinação do melaço residual, concentração do γ -PGA, biomassa e oxigênio dissolvido foi realizada durante toda a fermentação quando possível. Antiespumante (Dow Corning FG-10 Antifoam Emulsion) à base de silicone diluído 1:10 foi adicionado, sempre que necessário, para controlar a formação de espuma (total inferior a 2% do volume do meio). As condições de operação utilizadas foram agitação de 500 rpm, a uma taxa de aeração de 2 VVM, a 27 °C por 96 h, para fermentação utilizando melaço como fonte de carbono, ou 84 h, para fermentação utilizando glicerol como fonte de carbono.

3.5. Análise da Hidrólise e Consumo de γ -PGA

Duas diferentes metodologias foram realizadas para análise do consumo e hidrólise de γ -PGA. Ambos os experimentos foram realizados em duplicatas.

Na primeira metodologia, consumo do γ -PGA, uma solução contendo γ -PGA de concentração desconhecida foi preparada. Sulfato de amônio, 8 g/L, K_2HPO_4 , 1 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,2 g/L, $MgSO_4$, 0,5 g/L e $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05 g/L foram adicionados. Uma fermentação foi realizada utilizando *Bacillus velezensis* NRRL-23189 em frascos Erlenmeyers 250 mL contendo 45 mL da solução e 5 mL do inóculo. O inóculo foi preparado conforme o item 3.2. e as condições fermentativas foram 27 °C e 200 rpm. O período da fermentação foi de 84 h para fermentação do γ -PGA proveniente do melaço e de 96 h para a fermentação do γ -PGA proveniente do glicerol. Amostras foram coletadas a cada 24 h para observação da degradação do γ -PGA.

A segunda metodologia, degradação do γ -PGA, baseou-se na análise de hidrólise realizada por Goto e Kunioka (1992) com algumas modificações. Uma nova fermentação igual à anterior foi preparada durante 48 h. O meio fermentado foi centrifugado e 10 mL do sobrenadante foi adicionado em tubos contendo 40 mL da solução do γ -PGA com concentração desconhecida. As amostras foram submetidas a banho ultratermostatizado (Marconi, mod. MA 184) a diferentes temperaturas, ou seja, 30 °C, 35 °C, 40 °C e 45 °C. Amostras foram coletadas em diferentes intervalos de tempo, de 0 h, 5 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h para análise do γ -PGA.

3.6. Métodos Analíticos

3.6.1. Isolamento de γ -PGA (Diálise e Liofilização)

O γ -PGA foi purificado a partir do meio de cultivo dos micro-organismos utilizando o método reportado por Goto e Kunioka (1992). Amostras do meio fermentado foram centrifugadas por 20 min a 2300 g para a separação das

células, utilizando centrífuga Excelsa Baby II (Fanem, mod. 206-R). O sobrenadante contendo γ -PGA foi separado e misturado com uma alíquota de metanol (quando utilizou-se glicerol como fonte de carbono no meio fermentativo) de volume 4 vezes maior ou etanol (quando utilizou-se melaço como fonte de carbono no meio fermentativo) na mesma proporção e estocado em seguida por 12 h a 4 °C. O γ -PGA bruto formado, formato de rede, foi coletado por centrifugação por 30 min a 2300 g e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado dissolvido em água destilada para que quaisquer impurezas insolúveis fossem removidas por centrifugação. A solução aquosa de γ -PGA foi dializada com 1L de água destilada durante 12 h, com 3 trocas de água durante este período.

Após a diálise, a solução foi liofilizada para o preparo do γ -PGA puro liofilizador (Liofilizador Enterprise, mod. MOD 1).

3.6.2. Determinação da Biomassa Seca

A biomassa microbiana foi estimada através da determinação do peso seco da massa celular. Uma amostra de 10 mL dos meios fermentados foi centrifugada a 2300 g por 20 minutos (Centrífuga Centribio, mod. 80-2B). A massa celular decantada foi lavada com água destilada e novamente centrifugada, repetindo-se este procedimento por 2 vezes. Por fim, a massa celular foi seca em estufa à vácuo (Suprilab, mod. EST-920), a 60 °C até peso constante. O primeiro sobrenadante foi reservado para as demais análises.

3.6.3. Determinação de pH_{final}

O pH_{final} foi determinado através de leitura direta em potenciômetro (Digimed, mod. DM20).

3.6.4. Determinação de ART (Açúcares Redutores Totais) no Melaço

Uma alíquota do sobrenadante obtido pela centrifugação das amostras foi hidrolisada com igual volume de HCl 2M por 15 minutos em banho de H₂O em ebulição, seguindo-se neutralização com volume igual de solução de NaOH 2M. Após a hidrólise, determinou-se os açúcares redutores totais (ART) através da metodologia de Somogyi-Nelson (SOMOGYI, 1945). A resposta foi denominada Melaço Residual.

3.6.5. Determinação do Ácido Glutâmico (Cromatografia em Camada Delgada)

A análise do ácido glutâmico foi realizada segundo Bajaj e colaboradores (2008), onde uma amostra de 10 mL do meio fermentativo contendo supostamente γ -PGA foi centrifugada a 2300 g por 20 min e 4 °C. O sobrenadante contendo o γ -PGA foi separado da massa celular, sendo misturado com volume de metanol 4 vezes maior. O γ -PGA separado por centrifugação e lavado com água destilada foi hidrolisado com HCl 6N a 110 °C por 6 h em tubo fechado antes da análise de aminoácidos livres por cromatografia em camada com placa de sílica gel 60 (Merck, F254). A fase móvel foi composta de butanol - ácido acético - água (3:1:1), sendo os aminoácidos detectados com spray de solução ninidrina em acetona 0,2%. Como padrão utilizou-se solução de ácido glutâmico e água.

3.6.6. Determinação do γ -PGA

Uma alíquota do sobrenadante obtido pela centrifugação das amostras foi utilizado para a determinação do γ -PGA pela metodologia de quantificação via espectrofotometria a 400 nm descrita por Silva et al.(2010).

4. Resultados e Discussão

Os resultados estão apresentados neste capítulo, bem como as discussões pertinentes. São mostrados os resultados do estudo das possíveis composições do meio de cultura (item 4.1.) seguido dos resultados da escolha dos micro-organismos, temperatura e do pH_{inicial} a serem utilizados no processo fermentativo (item 4.2.). A seguir está apresentado o efeito da aplicação de diferentes fontes de nitrogênio e diferentes concentrações do ácido cítrico no meio fermentado usando o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 (item 4.3.). Após determinação destes parâmetros, são mostrados os resultados do estudo das variáveis Glicerol/Melaço, Sulfato de Amônio e Ácido Cítrico no processo produtivo do γ -PGA com *Bacillus velezensis* NRRL-23189 (item 4.4.) e um possível aumento de escala utilizando biorreator de 5 L (item 4.5.). Por fim, são apresentados os resultados da hidrólise do γ -PGA utilizando a enzima γ -PGA depolimerase em diferentes temperaturas produzida pelo próprio *Bacillus velezensis* NRRL-23189.

4.1. Avaliação das Composições do Meio de Cultura para Produção do γ -PGA

Utilizando a metodologia de separação do γ -PGA do meio de cultura descrita por Goto e Kunioka (1992), observa-se através da Tabela 13 quais amostras apresentaram formação de γ -PGA em forma de material gelatinoso. Através dos resultados é possível afirmar que nos sobrenadantes obtidos através do cultivo de *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 nos meios A, C, M, N, O e P não houve precipitação do γ -PGA em presença de metanol, indicando sua ausência, como mostra a Tabela 13.

Tabela 13. Presença de γ -PGA no sobrenadante de diversos meio de cultura precipitado metanol em meio com diferentes concentrações de glicerol e ácido glutâmico

Meio	Glicerol bruto (g.L ⁻¹)	Ácido glutâmico (g.L ⁻¹)	Formação de precipitado
A	62,5	4,0	A
C	62,5	-	A
E	62,5	4,0	P
F	62,5	4,0	P
G	62,5	-	P
H	62,5	-	P
I	100,0	4,0	P
J	100,0	4,0	P
K	100,0	-	P
L	100,0	-	P
M	150,0	4,0	A
N	150,0	4,0	A
O	150,0	-	A
P	150,0	-	A
X	Solução do aminoácido ácido glutâmico em metanol 4,0		

meio A e C: controle, meios sem fermentar; **-** : ausência; **A:** ausente, **P:** presente.

O resultado encontrado foi novamente avaliado para sua confirmação utilizando a metodologia de cromatografia em camada delgada. Para tanto, utilizou-se a metodologia de isolamento do γ -PGA e sua posterior hidrólise com HCl 6N. O γ -PGA hidrolisado em ácido glutâmico foi analisado por cromatografia em camada delgada (BAJAJ et al., 2008) conforme demonstrado na Figura 5.

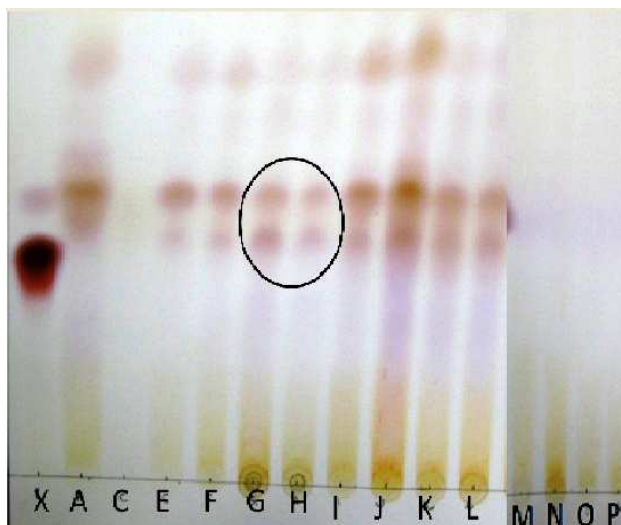


Figura 5. Cromatografia em camada delgada do ácido γ -PGA hidrolisado com HCl 6N, obtido dos meios fermentados por *Bacillus velezensis* NRRL-B 23189.

Pela Figura 5 conclui-se que nos meios A, E, F, G, H, I, J, K e L ocorreu produção do ácido glutâmico que foi evidenciado pela presença da coloração na mesma altura (mesmo Rf) que a amostra padrão X. Já as amostras M, N, O e P não a coloração e assim pode-se afirmar o mesmo não estava presente nestes meios fermentados e que para as amostras M e N, o ácido glutâmico adicionado inicialmente foi consumido pelo micro-organismo durante a fermentação.

Pode-se também observar que o micro-organismo estudado não produziu γ -PGA nos meios M, N, O e P, meios com alta concentração do glicerol. Estudos mostram que o aumento da concentração da fonte de carbono no meio de cultura influencia no incremento da produção do γ -PGA (Goto e Kunioka, 1992; Kunioka e Goto, 1994; Richard e Margaritis, 2003a; Wu et al., 2010). Shi e colaboradores (2006 a, b) estudaram a influência da fonte de carbono sacarose na produção do γ -PGA. Os autores observaram que existia um valor ideal da concentração de sacarose para obter máxima produtividade do γ -PGA. Acima deste valor, foi observada uma diminuição nos valores do γ -PGA por causa da inibição por substrato. Resultados semelhantes podem ser observados nas análises descritas acima onde, após determinada concentração, o incremento da fonte de carbono influenciou negativamente na produção do γ -PGA. Chen e colaboradores (2010)

estudaram a influencia da glicose no meio de cultura e chegaram à conclusão que a partir de 120 g/L o custo da produção do γ -PGA não era favorável e sugerem que o aumento da concentração de glicose, aumenta a produção de γ -PGA de alto peso molecular contribuindo para aumento da viscosidade do meio.

Os dados de produção de biomassa pela espécie *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 após 72 h de fermentação estão apresentadas na Tabela 14. Os melhores valores, acima de 2 g/L, foram observados para os meios F, G e H. Foi realizado o teste de Tukey, e as médias seguidas por uma mesma letra não diferem estatisticamente entre si ao nível de 5 % de probabilidade, sugerindo que os meios F e H não diferiram estatisticamente entre si e que o meio G diferiu estatisticamente de todos os outros meios, o que indica que os maiores valores de biomassa foram obtidos nos meios F e H.

Tabela 14. Biomassa produzida por *Bacillus velezensis* NRRL-B 23189 após 72 h de fermentação

Meio	Biomassa (g.L ⁻¹)
A	0,001 ± 0,0001 ^a
C	0,001 ± 0,0001 ^a
E	1,672 ± 0,0024 ^b
F	2,622 ± 0,0024 ^c
G	2,215 ± 0,0071 ^d
H	2,646 ± 0,0005 ^c
I	1,683 ± 0,0001 ^b
J	1,522 ± 0,0212 ^e
K	1,908 ± 0,0068 ^f
L	1,776 ± 0,0005 ^g
M	0,967 ± 0,0001 ^h
N	1,522 ± 0,0071 ^e
O	1,846 ± 0,0005 ^j
P	1,783 ± 0,0002 ^g

Também foi realizada a análise do pH_{final} após cultivo do micro-organismo nos diferentes meios. Segundo a literatura diversos estudos sugerem que o pH de crescimento do *Bacillus* spp está na faixa de 6 a 8. Richard & Margaritis (2003a)

estudaram uma faixa que variava entre 6 a 8 para o *Bacillus subtilis*. Chen e colaboradores (2010) estudaram a faixa de pH entre 6,8 e 7,4 para *Bacillus subtilis*.

Como se pode observar através da Tabela 15, os valores de pH utilizados foram dentro desta faixa ideal. Além disso, os valores obtidos não diferiram entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey. Desta forma qualquer destes meios poderiam ser utilizados para cultivo do *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 e posterior produção do γ -PGA, se fosse levado em consideração somente a faixa de pH.

Tabela 15. Valores de pH_{final} obtido após 72h de fermentação com *Bacillus velezensis* NRRL-B 23189

Meio	pH _{final}
A	6,25 ± 0,050 ^a
C	6,13 ± 0,099 ^a
E	7,03 ± 0,050 ^b
F	7,45 ± 0,106 ^c
G	7,43 ± 0,057 ^c
H	7,24 ± 0,042 ^c
I	7,32 ± 0,007 ^c
J	7,31 ± 0,014 ^c
K	7,45 ± 0,007 ^c
L	7,43 ± 0,007 ^b
M	7,03 ± 0,007 ^b
N	7,03 ± 0,007 ^b
O	7,01 ± 0,014 ^b
P	7,00 ± 0,001 ^c

A partir dos resultados prévios obtidos para o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, os meios G e H foram escolhidos para uso nas fermentações posteriores. Estes meios foram selecionados por não utilizar o ácido glutâmico em sua composição, por precisar de menor quantidade do substrato e produzir maior quantidade de biomassa após 72 h de fermentação. Assim, o requerimento de

baixa concentração do glicerol e não utilização do ácido glutâmico no meio pelo *Bacillus velezensis* NRRL-23189 poderia diminuir o custo referente ao substrato.

4.2. Avaliação dos Micro-organismos, da Composição do meio, da Temperatura e do pH_{inicial} para Utilização no Processo Fermentativo

4.2.1. Escolha do Micro-organismo

Diversos micro-organismos, especificados no item 3.3.2.1. de Material e Métodos, foram utilizados para o estudo da produção do γ -PGA, visando selecionar o melhor produtor. A análise que teve maior influência para escolha do micro-organismo foi a de quantificação do γ -PGA (SILVA, 2010).

Conforme os resultados da Tabela 16 os micro-organismos escolhidos foram *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, *Bacillus subtilis* NRRL B-41094 e o *Bacillus subtilis* NRRL B-41294. O *Bacillus subtilis* NRRL B-14819 produziu mais γ -PGA que o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41294, mas, estatisticamente o erro da concentração do γ -PGA, assim como o erro da concentração do γ -PGA dos micro-organismos *Bacillus subtilis* NRRL NRS-1270, *Bacillus negevensis* NRRL B-41288 e o *Bacillus subtilis* NRRL B-41337, foi maior que 5% de probabilidade, não fornecendo dados estatisticamente satisfatórios para a aplicação de um teste de média. Visualmente a precipitação do γ -PGA do sobrenadante com o metanol também não foi satisfatória. No entanto, o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-14819 apresentou uma concentração de biomassa próximas às obtidas com outras bactérias (Tabela 17) e seu pH_{final} (Tabela 18) continuou dentro da faixa considerada satisfatória para o *Bacillus* spp.

Os demais micro-organismos foram descartados devido apresentarem baixa produção do γ -PGA.

Tabela 16. γ -PGA obtido após 72 h de fermentação, pH_{inicial} 6,5, temperatura de 37 °C e agitação de 200 rpm

Micro-organismos	γ -PGA (g.L ⁻¹)
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL NRS-1270	0,115 ± 0,0376
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-14819	0,257 ± 0,0376
<i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189	0,567 ± 0,0250
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094	0,779 ± 0,0501
<i>Bacillus negevensis</i> NRRL B-41288	0,177 ± 0,0501
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41294	0,230 ± 0,0501
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41337	0,142 ± 0,0250

Tabela 17. Biomassa obtida após 72 h de fermentação, pH_{inicial} 6,5, temperatura de 37 °C e agitação de 200 rpm.

Micro-organismos	Biomassa (g.L ⁻¹)
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL NRS-1270	2,063 ± 0,0896 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-14819	1,812 ± 0,0118 ^a
<i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189	1,793 ± 0,1791 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094	1,755 ± 0,259 ^a
<i>Bacillus negevensis</i> NRRL B-41288	4,182 ± 0,2758 ^b
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41294	2,622 ± 0,0919 ^c
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41337	2,978 ± 0,0354 ^c

Tabela 18. pH_{final} obtido após 72 h de fermentação, pH_{inicial} 6,5, temperatura de 37 °C e agitação de 200 rpm.

Micro-organismos	pH _{final}
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL NRS-1270	7,4 ± 0,007 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-14819	6,5 ± 0,035 ^b
<i>Bacillus velezensis</i> NRRL B-23189	7,4 ± 0,007 ^a
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41094	7,3 ± 0,085 ^a
<i>Bacillus negevensis</i> NRRL B-41288	6,1 ± 0,141 ^c
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41294	5,4 ± 0,120 ^d
<i>Bacillus subtilis</i> NRRL B-41337	5,3 ± 0,050 ^e

4.2.2. Escolha do Meio, pH_{inicial} e Temperatura

A concentração do glicerol estudada foi escolhida baseada em análises anteriores, quando foi possível observar que altas concentrações do glicerol não aumentaram a produção do γ -PGA utilizando o *Bacillus velezensis* NRRL-23189 e assim testou-se uma concentração ao redor da concentração que foi considerada satisfatória, 62,5 g/L. Já para o ácido cítrico, o interesse era diminuir sua concentração no meio por ser um reagente de alto custo. Para o pH_{inicial}, o objetivo foi acompanhar os resultados dentro da faixa adequada para o crescimento do micro-organismo e estudada por outros pesquisadores, sabendo que seu valor um pouco mais baixo influenciaria o crescimento do *Bacillus species* ou a produção do γ -PGA.

Pode-se observar que a faixa de temperatura escolhida foi ampla, uma vez que vários trabalhos (SILVA, 2010; BAJAJ; SINGHAL, 2009) mencionam a faixa ideal para multiplicação do *Bacillus* spp está entre 30 e 37 °C, além disso, observou-se também o crescimento em faixas inferiores.

4.2.2.1. Planejamento Experimental 2⁴⁻¹ Realizado para o Micro-organismo *Bacillus velezensis* NRRL B-23189

Na Tabela 19 estão expressos os valores obtidos para concentração de γ -PGA, biomassa e pH_{final} nos diferentes ensaios conduzidos com *Bacillus velezensis* NRRL B-23189.

Tabela 19. Concentração do γ -PGA, pH_{final} e biomassa obtidos após 72 h de fermentação com o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, agitação de 200 rpm

Ensaio	x1	x2	x3	x4	γ -PGA (g.L ⁻¹)	pH_{final}	Biomassa (g.L ⁻¹)
1	-1(40)	-1(10)	-1(5,5)	-1(27)	1,301	7,7	0,740
2	+1(80)	-1(10)	-1(5,5)	+1(37)	0,204	7,6	1,620
3	-1(40)	+1(20)	-1(5,5)	+1(37)	0,363	7,9	1,025
4	+1(80)	+1(20)	-1(5,5)	-1(27)	1,354	7,6	0,795
5	-1(40)	-1(10)	+1(7,5)	+1(37)	0,186	7,7	1,580
6	+1(80)	-1(10)	+1(7,5)	-1(27)	0,575	7,7	0,115
7	-1(40)	+1(20)	+1(7,5)	-1(27)	0,558	7,8	0,140
8	+1(80)	+1(20)	+1(7,5)	+1(37)	0,381	7,5	2,175
9	0(60)	0(15)	0(6,5)	0(32)	0,558	7,4	2,100
10	0(60)	0(15)	0(6,5)	0(32)	0,434	7,6	2,000
11	0(60)	0(15)	0(6,5)	0(32)	1,009	7,5	2,320
12	0(60)	0(15)	0(6,5)	0(32)	0,744	7,6	2,320

x1: concentração do glicerol bruto (g.L⁻¹); x2: concentração do ácido cítrico (g.L⁻¹); x3: $\text{pH}_{\text{inicial}}$; x4: temperatura durante a fermentação (°C).

De acordo com os resultados, observou-se que ocorreu aumento na concentração de γ -PGA em relação ao encontrado anteriormente. Em alguns ensaios, como 1 e 4, a produção do γ -PGA chegou a 1 g/L. A partir desse resultado decidiu-se analisar os efeitos conforme Tabela 20.

Tabela 20. Estimativa dos efeitos para a concentração do γ -PGA

Fatores	Efeitos	p-valor	Estimativa por intervalo	Estimativa por intervalo
			Limite Inferior (95%)	Limite Superior (95%)
Média	0,639	0,000075	0,456	0,822
Glicerol	0,027	0,892333	-0,422	0,475
Ácido Cítrico	0,097	0,623178	-0,351	0,546
$\text{pH}_{\text{inicial}}$	-0,381	0,084738	-0,829	0,068
Temperatura	-0,664	0,009991	-1,113	-0,215

Os resultados mostraram que a produção do γ -PGA foi afetada pelo $\text{pH}_{\text{inicial}}$ ($p = 0,084738$) e pela temperatura ($p = 0,009991$) ao nível de 10% de significância, onde ambos tiveram um efeito negativo, sendo que um incremento no valor do $\text{pH}_{\text{inicial}}$ e na temperatura (nível -1 para +1) conduziu a um decréscimo

na concentração do γ -PGA. Ao elevar a temperatura de 27 °C para 37 °C, houve uma redução na concentração do γ -PGA, em média de 0,664 g/L. Pode-se observar que a maioria dos ensaios realizados à 27 °C, apresentaram valores superiores de concentração do γ -PGA.

Através da análise das Figuras 6, 7 e 8 verifica-se que o ácido cítrico não mostrou ser significativo para nenhuma resposta estudada ao nível de 10% de significância. Somente o glicerol afetou o pH_{final} do meio fermentativo indicando que quanto maior a quantidade de glicerol adicionado no meio, menor seria o pH_{final} . Este resultado não está relacionado com o $\text{pH}_{\text{inicial}}$ do glicerol adicionado, este foi padronizado durante todo o experimento em pH 7, além disto o meio fermentativo teve seu $\text{pH}_{\text{inicial}}$ padronizado de acordo com a Tabela 15. Sugere-se que o aumento do glicerol no meio fermentativo, aumenta a biomassa que produz algum composto ácido que leve a redução deste pH_{final} , tal afirmação pode ser comprovada pela Figura 8, apesar de o glicerol não influenciar na biomassa final ao nível de 10% de significância. Observa-se também que a temperatura afeta positivamente a produção de biomassa. Este resultado era esperado, pois a faixa de crescimento do *Bacillus* spp é na faixa entre 30 e 37 °C (SILVA, 2010; BAJAJ; SINGHAL, 2009).

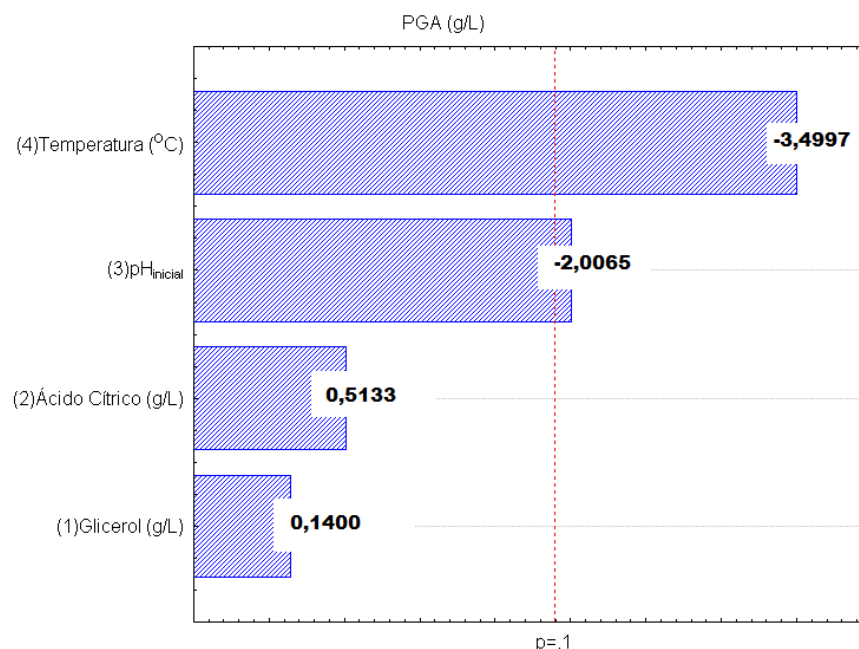


Figura 6. Diagrama de Pareto para a produção do γ -PGA, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus velezensis* NRRL B-23189.

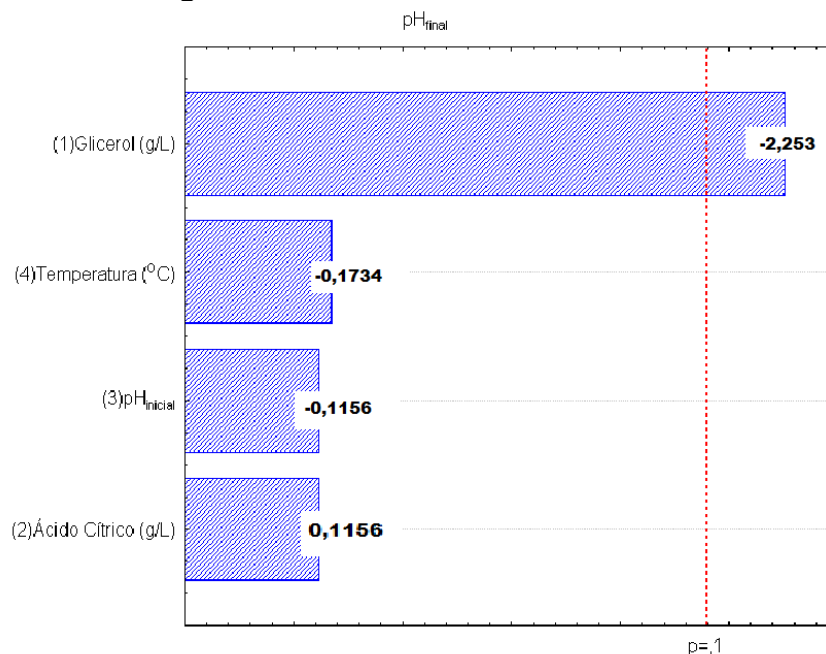


Figura 7. Diagrama de Pareto avaliando o pH_{final} , ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus velezensis* NRRL B-23189.

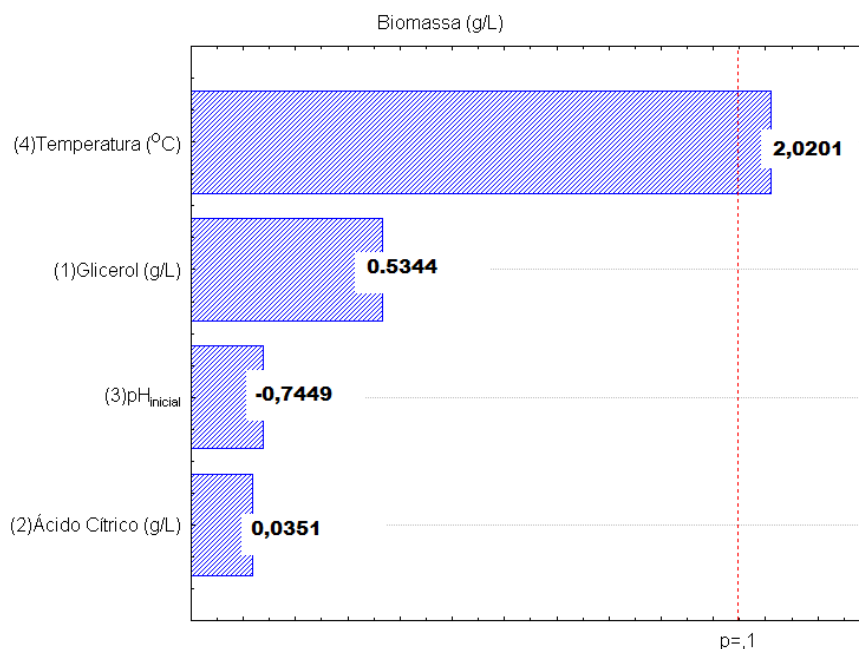


Figura 8. Diagrama de Pareto para a produção de biomassa, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus velezensis* NRRL B-23189.

Com os resultados obtidos e levando em consideração a produção do γ -PGA conclui-se que o micro-organismo *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 não deveria ser descartado nos próximos planejamentos. Como as variáveis temperatura e pH_{inicial} foram estatisticamente significativas a 10% de significância, elas foram avaliadas posteriormente.

4.2.2.2. Planejamento Experimental 2⁴⁻¹ Realizado para o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41094

Pela Tabela 21 pode-se observar os valores obtidos para concentração de γ -PGA, biomassa e pH_{final} nos diferentes ensaios realizados com o micro-organismo.

Tabela 21. Concentração do γ -PGA, biomassa e pH_{final} obtidos após 72 h de fermentação com o *Bacillus subtilis* NRRL B-41094, agitação de 200 rpm

Ensaio	x1	x2	x3	x4	γ -PGA (g.L ⁻¹)	pH_{final}	Biomassa (g.L ⁻¹)
1	-1(40)	-1(10)	-1(5,5)	-1(27)	0,770	7,8	1,845
2	+1(80)	-1(10)	-1(5,5)	+1(37)	0,159	7,5	1,705
3	-1(40)	+1(20)	-1(5,5)	+1(37)	0,126	7,7	1,835
4	+1(80)	+1(20)	-1(5,5)	-1(27)	1,735	7,7	1,150
5	-1(40)	-1(10)	+1(7,5)	+1(37)	0,248	7,8	1,080
6	+1(80)	-1(10)	+1(7,5)	-1(27)	0,646	7,7	1,230
7	-1(40)	+1(20)	+1(7,5)	-1(27)	0,806	7,5	1,805
8	+1(80)	+1(20)	+1(7,5)	+1(37)	0,336	7,6	1,655
9	0(60)	0(15)	0(6,5)	0(32)	0,106	7,7	1,275
10	0(60)	0(15)	0(6,5)	0(32)	0,089	8,1	1,380
11	0(60)	0(15)	0(6,5)	0(32)	0,106	7,8	1,700
12	0(60)	0(15)	0(6,5)	0(32)	0,044	7,8	1,870

x1: concentração do glicerol bruto (g.L⁻¹); **x2:** concentração do ácido cítrico (g.L⁻¹); **x3:** $\text{pH}_{\text{inicial}}$; **x4:** temperatura durante a fermentação (°C).

O micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41094 também apresentou uma concentração de γ -PGA próximas ou superiores a 1 g/L em diferentes ensaios. Foram analisados os efeitos das variáveis para as respostas desejadas (Tabela 22). A única variável que interferiu na produção do γ -PGA foi a temperatura ($p < 0,05$). As demais variáveis não foram estatisticamente significativas ao nível de 10% de significância o que pode ser visualizado através do gráfico de Pareto (Figuras 9, 10, 11). Também foi realizado teste de Pareto para as variáveis dependentes biomassa e pH_{final} , no entanto nenhuma das variáveis estudadas foi estatisticamente significativa ao nível de 10% de significância.

Tabela 22. Estimativa dos efeitos para a concentração do γ -PGA

Fatores	Efeitos	p-valor	Estimativa por intervalo	Estimativa por intervalo
			Limite Inferior (95%)	Limite Superior (95%)
Média	0,431	0,007755	0,155	0,707
Glicerol	0,232	0,444954	-0,445	0,908
Ácido Cítrico	0,295	0,336692	-0,381	0,971
pH_{inicial}	-0,189	0,530962	-0,865	0,488
Temperatura	-0,772	0,030685	-1,448	-0,096

Um incremento no valor da temperatura (nível -1 para +1) conduziu a um decréscimo na concentração do γ -PGA. A temperatura teve um efeito negativo, indicando que ao passar de 27 para 37 °C houve uma redução na concentração do γ -PGA, em média de 0,772 g/L.

É importante salientar que os valores de pH_{final} estavam dentro da faixa ideal para o desenvolvimento de *Bacillus* spp, fator importante que pode afetar tanto a concentração de γ -PGA quanto de biomassa.

Como a concentração de γ -PGA atingiu a 1 g/L e esta resposta foi considerada a mais relevante, optou-se por continuar com este micro-organismo nos planejamentos posteriores.

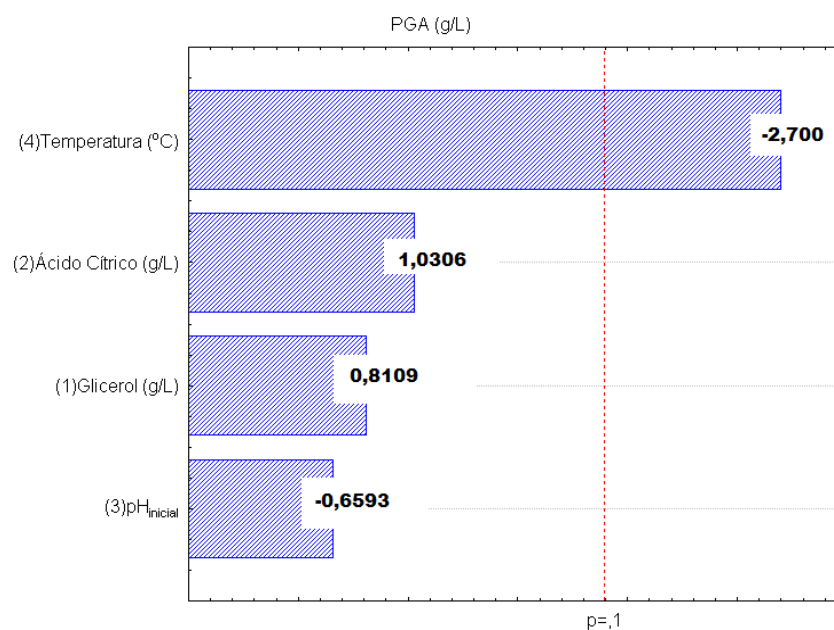


Figura 9. Diagrama de Pareto para a produção do γ -PGA, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41094.

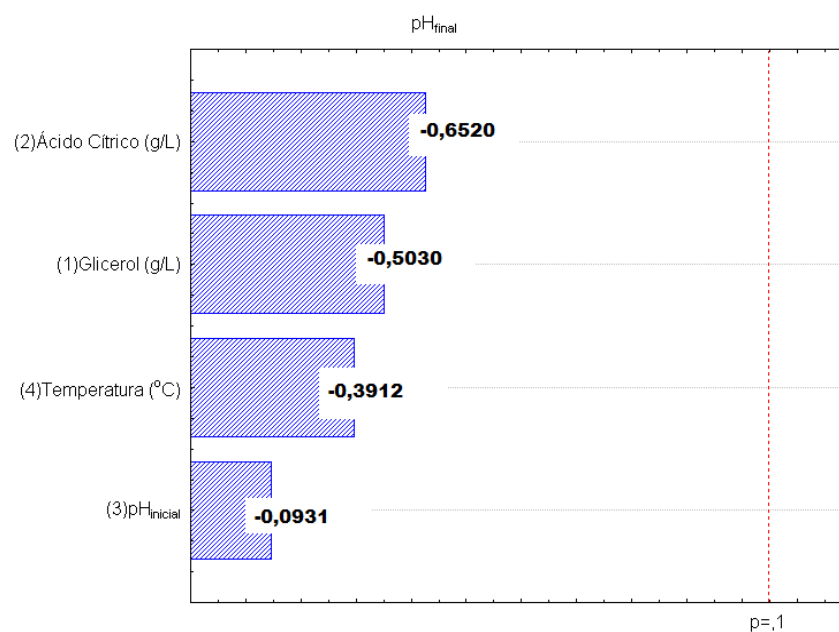


Figura 10. Diagrama de Pareto avaliando o pH_{final} , ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41094.

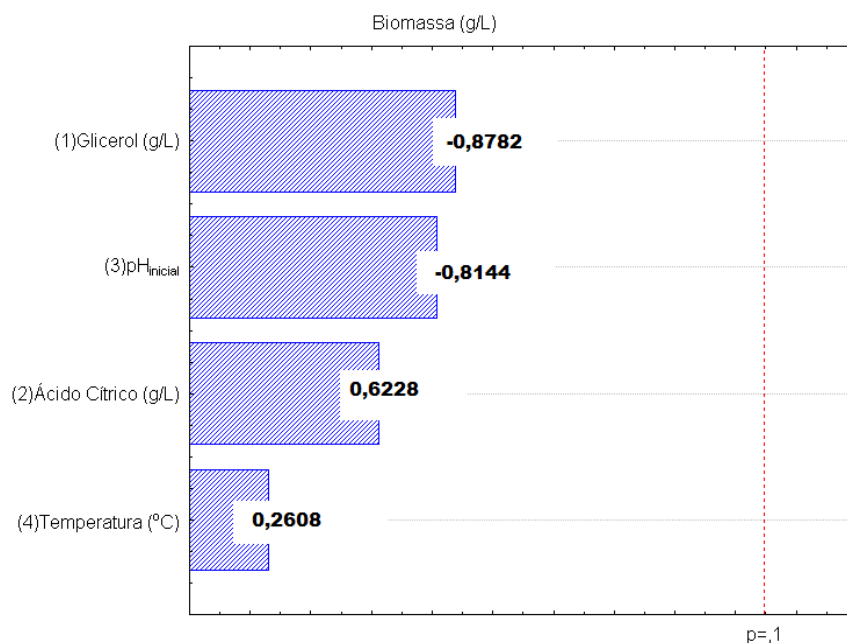


Figura 11. Diagrama de Pareto para a produção de biomassa, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41094.

4.2.2.3 Planejamento Experimental 2^{4-1} Realizado para o Micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41294

Na Tabela 23 podemos observar os valores obtidos para concentração de γ -PGA, biomassa e pH_{final} nos diferentes ensaios realizados utilizando o *Bacillus subtilis* NRRL B-41294.

Tabela 23. Concentração do γ -PGA, biomassa e pH_{final} obtidos após 72 h de fermentação com o *Bacillus subtilis* NRRL B-41294, agitação de 200 rpm

Ensaio	x1	x2	x3	x4	γ -PGA (g.L ⁻¹)	pH_{final}	Biomassa (g.L ⁻¹)
1	-1(40)	-1(10)	-1(5,5)	-1(27)	0,027	6,5	1,765
2	+1(80)	-1(10)	-1(5,5)	+1(37)	0,239	7,38	1,720
3	-1(40)	+1(20)	-1(5,5)	+1(37)	0,283	7,44	1,120
4	+1(80)	+1(20)	-1(5,5)	-1(27)	0,062	5,52	1,930
5	-1(40)	-1(10)	+1(7,5)	+1(37)	0,053	7,72	1,275
6	+1(80)	-1(10)	+1(7,5)	-1(27)	0,018	5,69	2,135
7	-1(40)	+1(20)	+1(7,5)	-1(27)	0,027	5,23	1,154
8	+1(80)	+1(20)	+1(7,5)	+1(37)	0,292	7,44	1,565
9	0(60)	0(15)	0(6,5)	0(32)	0,018	5,94	2,475
10	0(60)	0(15)	0(6,5)	0(32)	0,027	6,22	2,550
11	0(60)	0(15)	0(6,5)	0(32)	0,035	5,85	2,020
12	0(60)	0(15)	0(6,5)	0(32)	0,053	5,97	2,615

x1: concentração do glicerol bruto (g.L⁻¹); x2: concentração do ácido cítrico (g.L⁻¹); x3: $\text{pH}_{\text{inicial}}$; x4: temperatura durante a fermentação (°C).

Pela Tabela 23, observa-se que as concentrações de γ -PGA obtidas após 72 h de fermentação nas condições determinadas pelo planejamento experimental não atingiram a 1 g/L. Além disso, os valores do pH_{final} extrapolaram a faixa de pH ideal para crescimento, que é entre pH 6 e pH 8, fator que pode ter contribuído para diminuição da produção do γ -PGA.

Observa-se pelas Figuras 12, 13, e 14 que somente a biomassa não foi afetada por nenhuma variável ao nível de 10% de significância. Já a produção do γ -PGA e pH_{final} foram afetados positivamente pela variável temperatura. Um incremento no valor da temperatura (nível -1 para +1) conduziu a um acréscimo na concentração do γ -PGA e a um acréscimo no valor do pH_{final} .

Ao comparar com os micro-organismos *Bacillus subtilis* NRRL B-41094 e *Bacillus velezensis* NRRL-23189, para o *Bacillus subtilis* NRRL B-41294 a temperatura interferiu de forma diferente, afetando positivamente a produção do γ -PGA. Apesar do aumento da temperatura aumentar a concentração do γ -PGA, este aumento foi pequeno, podendo ter sido ocasionado por um stress térmico, diferente dos outros micro-organismos no qual a diminuição da temperatura

provocou um aumento na produção do γ -PGA chegando a um valor considerável, 1 g/L.

Para a produção de Biomassa, nenhuma variável estudada teve efeito significativo ($p < 0,1$). Apesar dos dados de produção de Biomassa serem elevados decidiu-se não continuar com o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41294, pois o objetivo principal era a produção do γ -PGA e não de Biomassa.

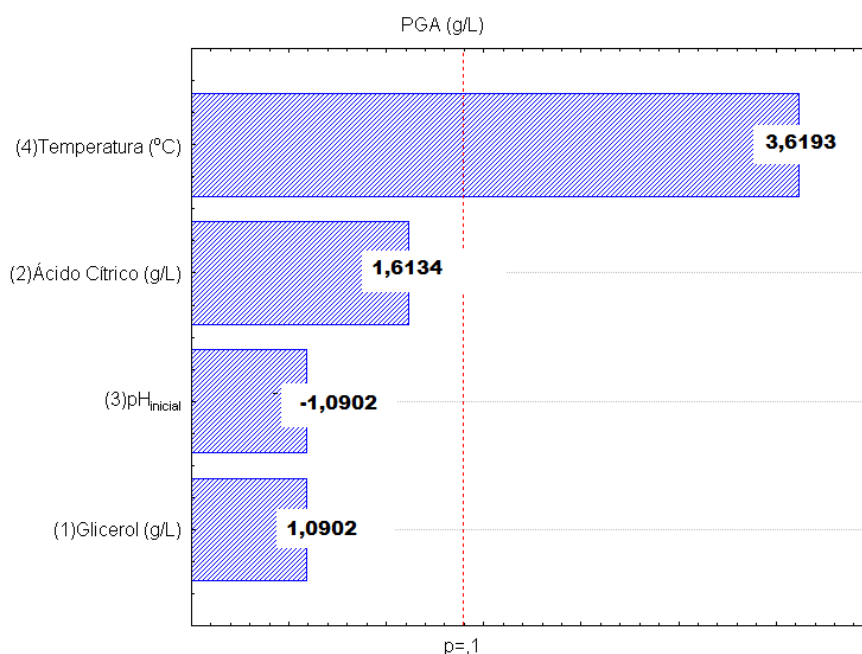


Figura 12. Diagrama de Pareto para a produção do γ -PGA, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41294.

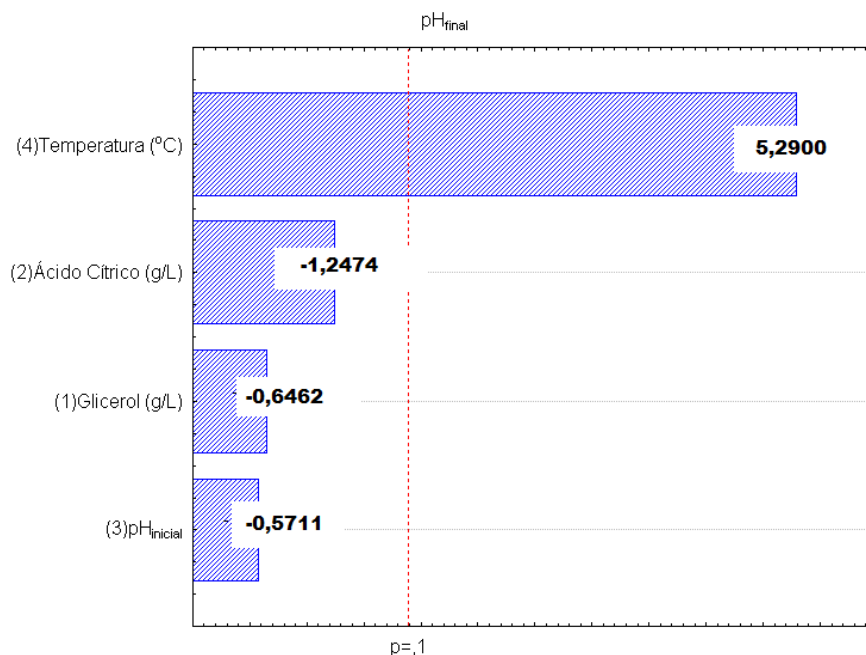


Figura 13. Diagrama de Pareto avaliando o pH_{final} , ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41294.

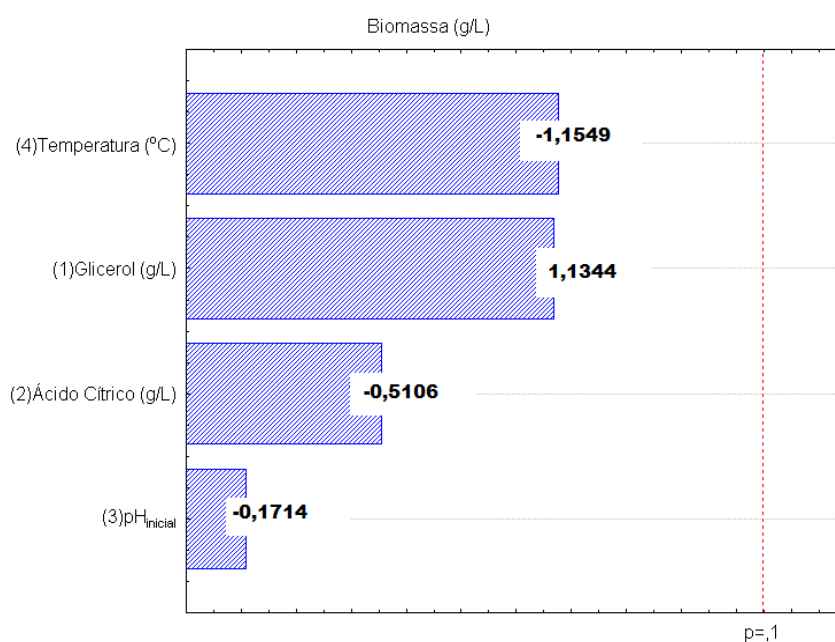


Figura 14. Diagrama de Pareto para a produção de biomassa, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41294.

4.2.3. DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional) para as Variáveis Temperatura e do pH_{inicial} na Produção do γ -PGA por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 e *Bacillus subtilis* NRRL B-41094

As variáveis independentes estudadas no DCCR foram temperatura e pH_{inicial}. O ácido cítrico não foi significativo em nenhum dos ensaios estudados no planejamento experimental 2^{4-1} , sendo, portanto fixado em 10 g/L. Já a concentração de glicerol afetou a resposta pH_{final} para o micro-organismo *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, mas sua concentração foi fixada em 62,5 g/L e foi posteriormente analisada.

Os níveis estudados no DCCR com 2 variáveis para os micro-organismos *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 e *Bacillus subtilis* NRRL B-41094 estão especificados na Tabela 8, em Material e Métodos.

4.2.3.1. DCCR Realizado para o Micro-organismo *Bacillus velezensis* NRRL B-23189

As respostas obtidas nos diferentes ensaios do DCCR podem ser observadas na Tabela 24.

Tabela 24. Concentração de γ -PGA, biomassa e pH_{final} obtidos após 72 h de fermentação com o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, agitação de 200 rpm

Ensaio	x1	x2	γ -PGA (g.L ⁻¹)	pH_{final}	Biomassa (g.L ⁻¹)
1	-1(27)	-1(5,5)	0,903	7,8	9,360
2	+1(37)	-1(5,5)	0,257	7,6	2,085
3	-1(27)	+1(7,5)	0,912	7,9	1,575
4	+1(37)	+1(7,5)	0,097	7,7	8,545
5	-1,41(24,95)	0(6,5)	1,000	7,7	2,710
6	+1,41(39,05)	0(6,5)	0,062	7,6	1,400
7	0(32)	-1,41(5,09)	0,319	7,6	2,650
8	0(32)	+1,41(7,91)	0,035	7,8	1,995
9	0(32)	0(6,5)	0,398	7,4	1,935
10	0(32)	0(6,5)	0,363	7,6	1,615
11	0(32)	0(6,5)	0,407	7,5	1,980

x1: temperatura durante a fermentação (°C); x2: $\text{pH}_{\text{inicial}}$.

Observa-se pela Tabela 24 que os valores de pH_{final} permaneceram dentro da faixa ótima para o crescimento de *Bacillus* spp. Em alguns ensaios, 1 e 4, obteve-se alta concentração de biomassa e as concentrações de γ -PGA ficaram em torno de 1 g/L nos ensaios 1, 3 e 5.

Ao estudar a resposta concentração de γ -PGA, observou-se uma boa repetibilidade nos pontos centrais com um R^2 de 0,8805. Os ensaios não se encontram dispersos em relação a reta $Y = X$, mostrada na Figura 15.

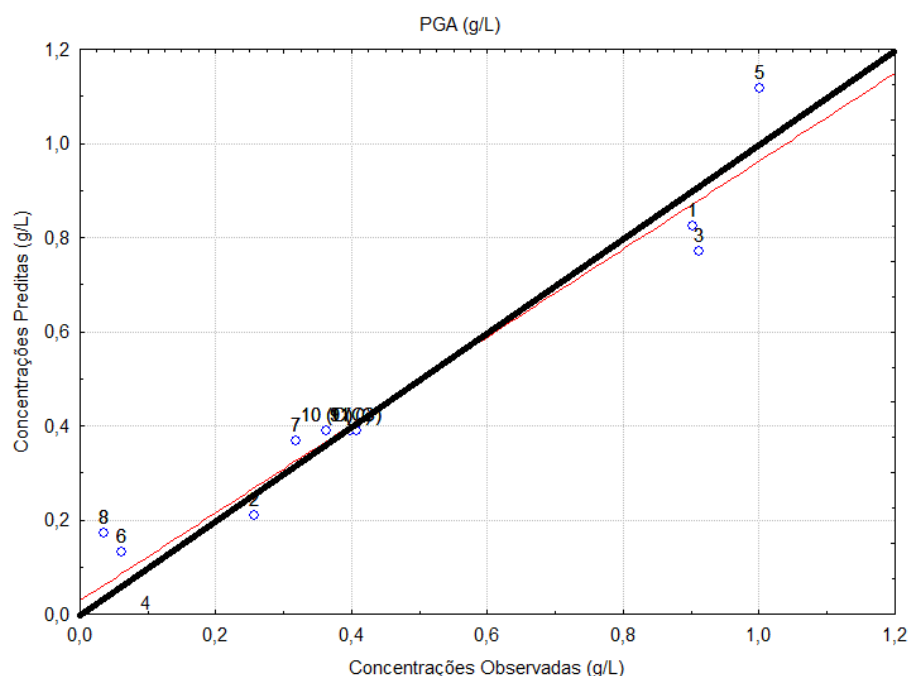


Figura 15. Concentrações preditas X concentrações observadas para a resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, após 72 h, agitação de 200 rpm.

A Tabela 25 apresenta os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para a concentração do γ -PGA. Os termos não significativos foram retirados para os resíduos.

Tabela 25. Coeficientes de regressão do DCCR para a concentração do γ -PGA

Fatores	Coef. de regressão	p-valor	Estimativa por intervalo	
			Limite Inferior (90%)	Limite Superior (90%)
Média	0,389	0,003289	0,240	0,538
x1	-0,348	0,000592	-0,440	-0,257
x1²	0,118	0,080423	0,009	0,227
x2	-0,069	0,187757	-0,160	0,0222
x2²	-0,059	0,322926	-0,168	0,050
x1*x2	-0,042	0,538702	-0,171	0,087

x1: temperatura durante a fermentação (°C); **x2:** pH_{inicial}.

Verificou-se que para produção do γ -PGA foram significativos o termo linear e quadrático para a temperatura a 10% de significância ($p < 0,1$). A ANOVA para a

concentração do γ -PGA considerando somente os termos estatisticamente significativos está apresentada na Tabela 26. O coeficiente de determinação para concentração do γ -PGA foi igual a 88,05%.

Tabela 26. Análise de variância para a produção do γ -PGA

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F _{cal}	F _{tab} (0,10;2;8)
Regressão	1,084	2	0,542	29,486	3,110
Resíduo	0,147	8	0,018		
Falta de Ajuste	0,146	6	0,0243	45,044	F _{tab} (0,10;6,2)
Erro Puro	0,001	2	0,001		
Total	1,234	10	90% de confiança		9,330

$$R^2 = 88,05\%$$

O teste F foi altamente significativo para ambos os casos, sendo os modelos adequados para descrever os resultados através da superfície de resposta.

Assim pode-se ajustar um modelo de segunda ordem para a resposta produção do γ -PGA que pode ser representada pela equação (1).

$$Y = 0,389 - 0,348 x_1 + 0,118 x_1^2 \quad (1)$$

A Figura 16 mostra a superfície de resposta gerada pela resposta concentração de γ -PGA.

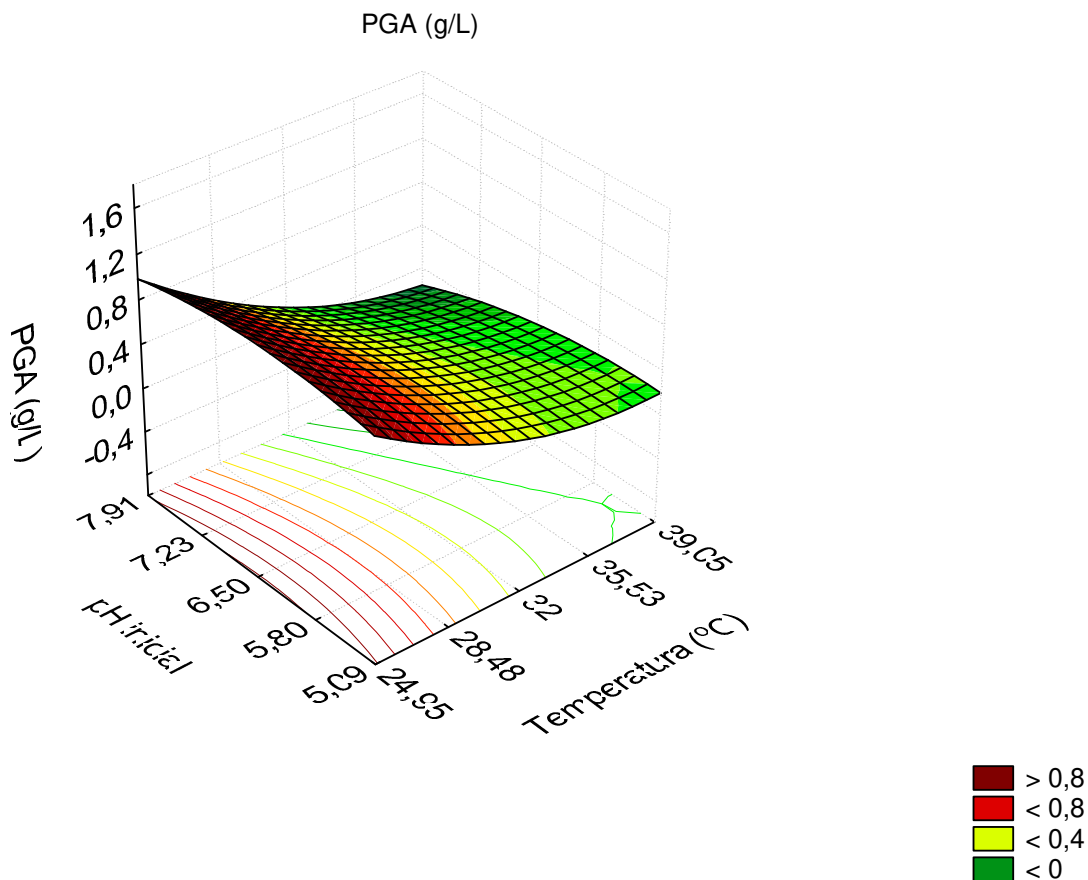


Figura 16. Superfície de resposta gerada pela resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, após 72 h, agitação de 200 rpm.

Pela Figura 16 verifica-se que os melhores resultados foram obtidos em temperaturas menores, resposta inesperada porque a maior parte dos estudos reportados na literatura (BAJAJ; SINGHAL, 2011; HOPPENSACK ET al., 2003; RICHARD; MARGARITIS, 2003a) afirmam que a produção do γ -PGA ocorre em temperaturas de fermentação entre 30 e 37 $^{\circ}\text{C}$.

Observa-se que o $\text{pH}_{\text{inicial}}$ não apresentou influência significativa na concentração de γ -PGA.

Para as outras variáveis resposta não foi possível construir as superfícies de resposta porque os resultados estão dispersos em relação aos valores preditos e valores observados, o que pode ser confirmado pelas Figuras 17 e 18.

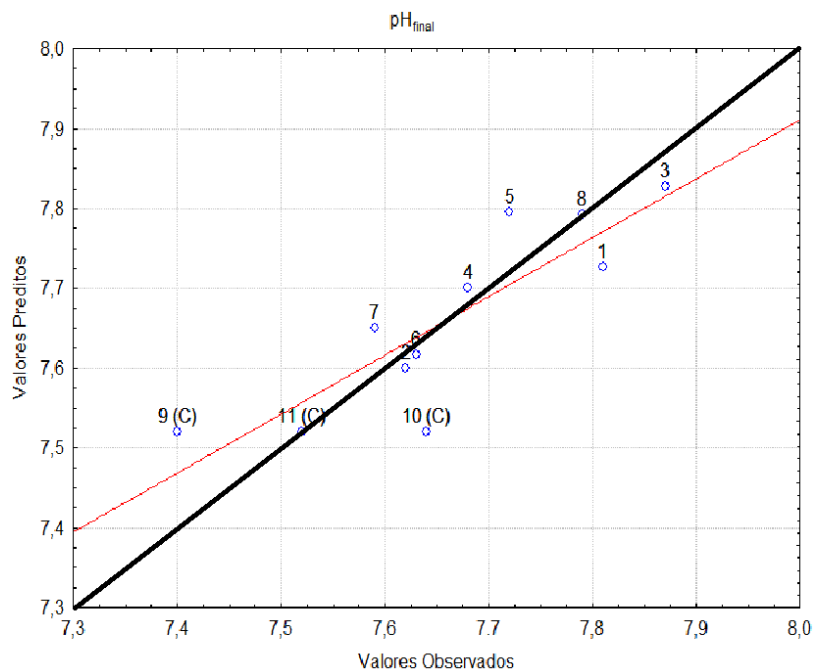


Figura 17. Valores preditos X valores observados para a resposta pH_{final} do meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, após 72 h, agitação de 200 rpm.

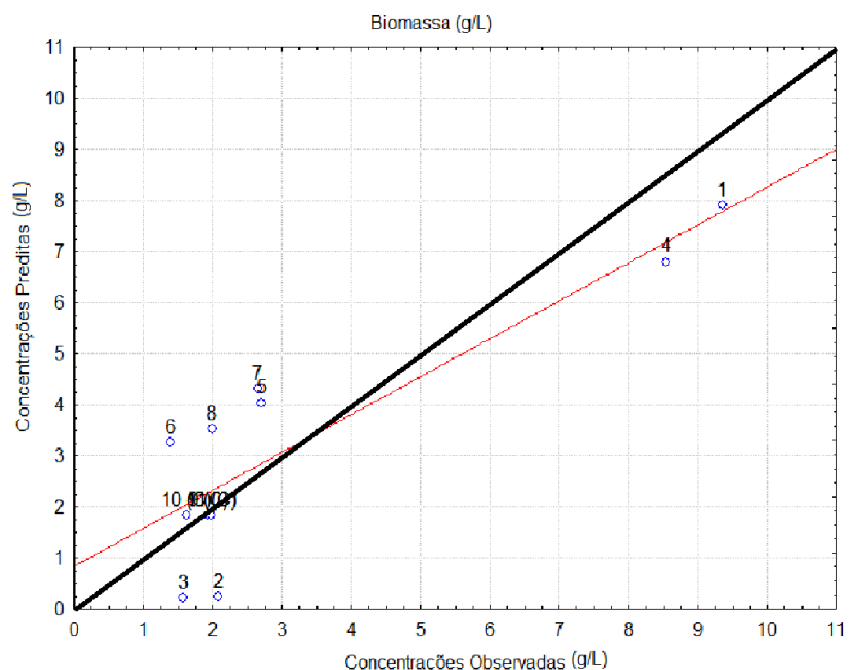


Figura 18. Concentrações preditas X concentrações observadas para a resposta Biomassa em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, após 72 h, agitação de 200 rpm.

4.2.3.2. DCCR Realizado para o Micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41094

A Tabela 27 mostra as respostas do DCCR obtidas para o micro-organismo em meio fermentado contendo glicerol como substrato por 72 h e agitação de 200 rpm.

Tabela 27. Concentração de γ -PGA, biomassa e pH_{final} obtidos após 72 h de fermentação com o *Bacillus subtilis* NRRL B-41094, agitação de 200 rpm

Ensaio	x1	x2	γ -PGA (g.L^{-1})	pH_{final}	Biomassa (g.L^{-1})
1	-1(27)	-1(5,5)	0,691	7,95	2,785
2	+1(37)	-1(5,5)	0,062	7,35	1,455
3	-1(27)	+1(7,5)	1,009	7,67	4,360
4	+1(37)	+1(7,5)	0,186	7,60	1,790
5	-1,41(24,95)	0(6,5)	1,000	7,98	2,150
6	+1,41(39,05)	0(6,5)	0,151	7,73	1,078
7	0(32)	-1,41(5,09)	0,664	7,30	2,340
8	0(32)	+1,41(7,91)	0,286	7,75	17,035
9	0(32)	0(6,5)	0,868	7,51	2,090
10	0(32)	0(6,5)	0,868	7,34	5,780
11	0(32)	0(6,5)	1,009	7,43	3,675

x1: temperatura durante a fermentação ($^{\circ}\text{C}$); **x2:** $\text{pH}_{\text{inicial}}$

Pode-se observar que as maiores concentrações do γ -PGA foram obtidas em temperaturas iguais ou inferiores a 32 $^{\circ}\text{C}$. Todos os valores de pH_{final} permaneceram dentro da faixa sugerida para crescimento de *Bacillus* spp pela literatura.

Pela Figura 19 pode-se afirmar que houve boa repetibilidade no ponto central apesar dos dados estarem dispersos com um R^2 de 0,8908.

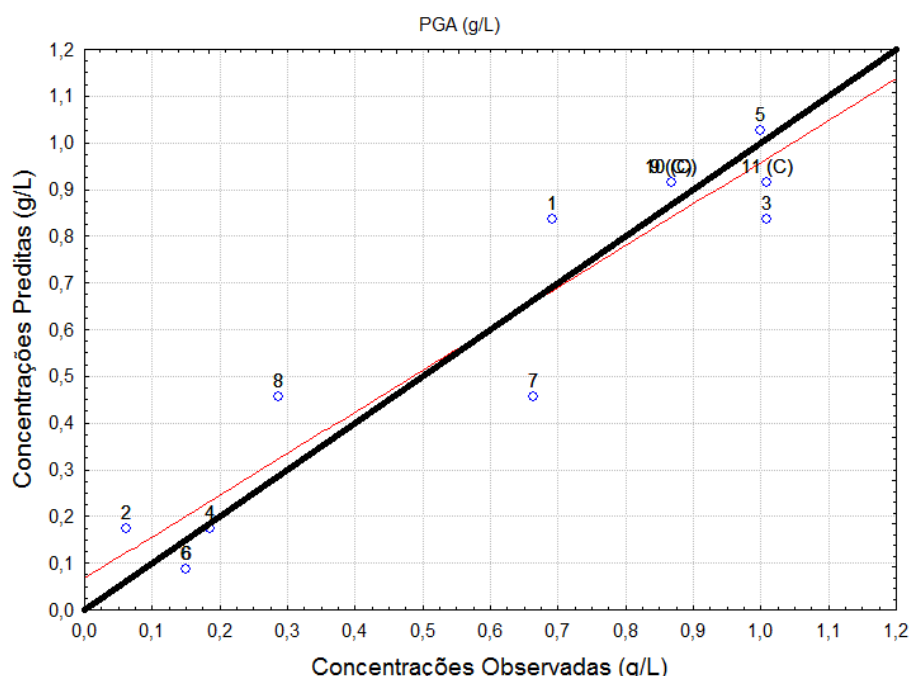


Figura 19. Concentrações preditas X concentrações observadas para a resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o *Bacillus subtilis* NRRL B-41094, após 72 h, agitação de 200 rpm.

Os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para produção do γ -PGA estão apresentados na Tabela 28.

Tabela 28. Coeficientes de regressão do DCCR para a resposta pH_{final}

Fatores	Coef. de regressão	p-valor	Estimativa por intervalo	
			Limite Inferior (90%)	Limite Superior (90%)
Média	0,915	0,000234	0,718	1,112
x1	-0,332	0,002630	-0,452	-0,211
x1²	-0,179	0,053363	-0,323	-0,036
x2	-0,012	0,854302	-0,132	0,109
x2²	-0,230	0,023401	-0,373	-0,086
x1*x2	-0,049	0,591402	-0,219	0,122

x1: temperatura durante a fermentação (°C); **x2:** $\text{pH}_{\text{inicial}}$.

Os parâmetros estatisticamente não significativos foram eliminados. O modelo pode ser escrito pela equação 2.

$$Y = 0,915 - 0,332 x_1 - 0,179 x_1^2 - 0,230 x_2^2 \quad (2)$$

A ANOVA para a produção do γ -PGA, considerando somente os termos estatisticamente significativos, está apresentada na Tabela 29.

Tabela 29. Análise de variância para a produção do γ -PGA

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F _{cal}	F _{tab} (0,10;3;7)
Regressão	1,359	3	0,453	20,618	3,070
Resíduo	0,154	7	0,022		
Falta de Ajuste	0,141	5	0,028	4,241	F _{tab} (0,10;5,2)
Erro Puro	0,013	2	0,007		9,290
Total	1,512	10	90% de confiança		

$$R^2 = 89,08\%$$

Os resultados da ANOVA foram demonstrados através de superfície de resposta. A Figura 20 mostra a superfície de resposta para produção de γ -PGA. Observa-se por esta figura que a maior produção ocorreu em pH_{inicial} entre 5,5 e 7,5 e temperaturas menores que 32 °C.

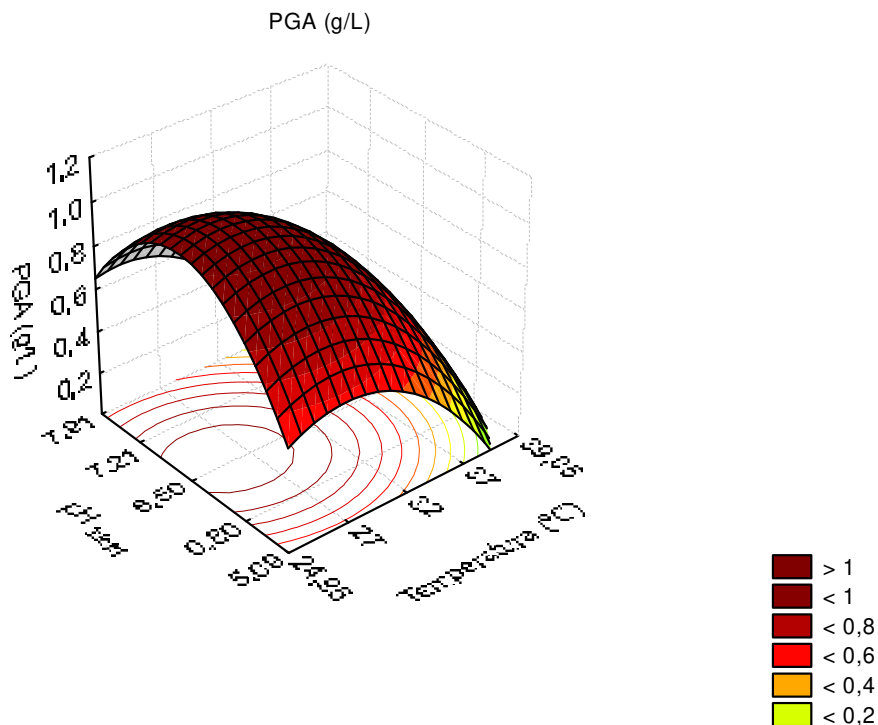


Figura 20. Superfície de resposta gerada pela resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o *Bacillus subtilis* NRRL B-41094, após 72 h, agitação de 200 rpm.

As Figuras 21 mostra os valores de pH_{final} preditos e observados e sua dispersão, já a Figura 22 apresenta a superfície de resposta gerada pelo modelo. Através da superfície pode-se constatar que entre a faixa de temperatura 27 e 37 °C o pH_{final} se manteve dentro da sua faixa ótima de crescimento de *Bacillus subtilis* NRRL B-41094.

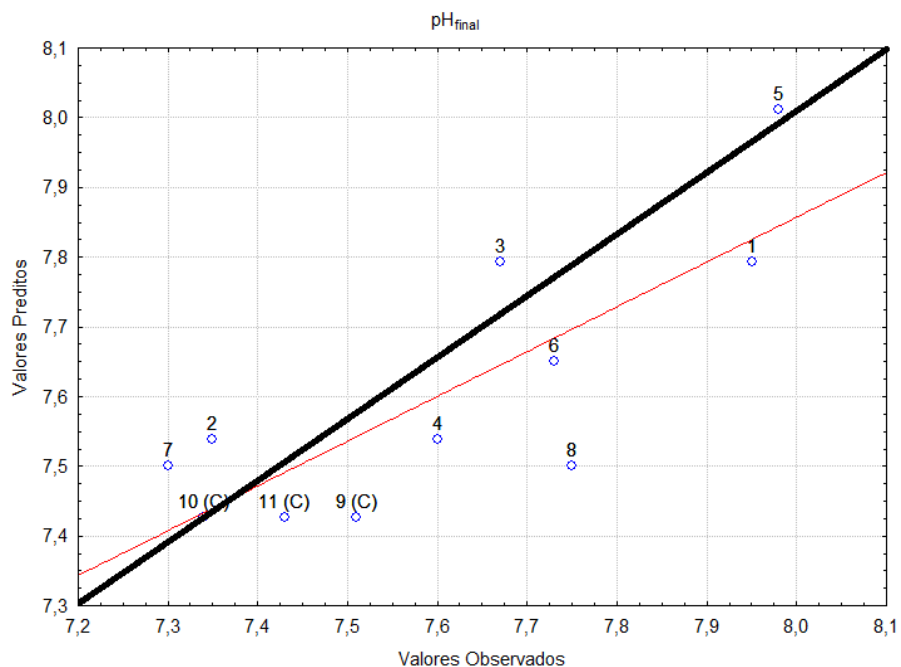


Figura 21. Valores Preditos X valores Observados para a resposta pH_{final} em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o *Bacillus subtilis* NRRL B-41094, após 72 h, agitação de 200 rpm.

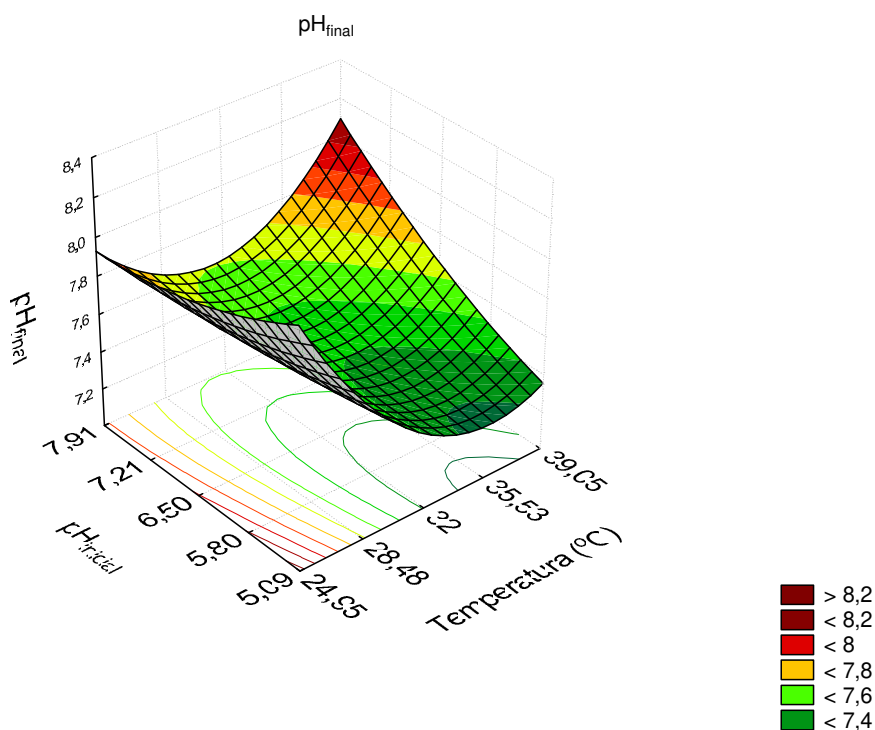


Figura 22. Superfície de resposta gerada pela resposta pH_{final} em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o *Bacillus subtilis* NRRL B-41094, após 72 h, agitação de 200 rpm.

Em relação a resposta biomassa, suas concentrações ficaram dispersas e por isso não foram analisadas (Figura 23), a análise da ANOVA não foi atendida e não se conseguiu plotar uma superfície de resposta.

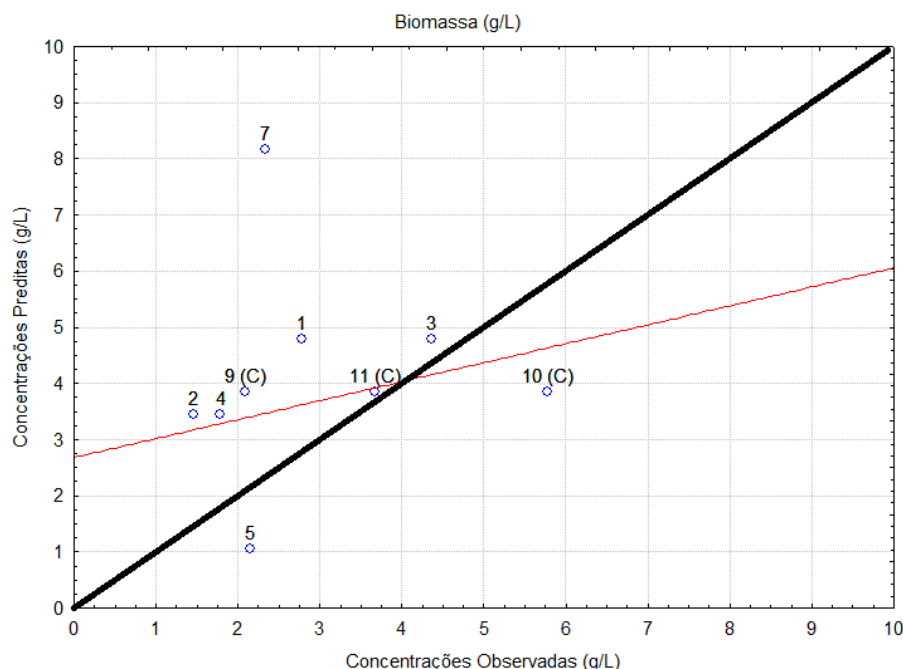


Figura 23. Concentrações preditas X concentrações observadas para a resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o *Bacillus subtilis* NRRL B-41094, após 72 h, agitação de 200 rpm.

Através da análise da superfície de resposta, Figura 20, verifica-se que o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B- 41094 apresenta concentrações de γ -PGA máxima dentro das faixas de temperatura e $\text{pH}_{\text{inicial}}$ estudadas, não sendo necessário realizar novos estudos para otimização de produção do γ -PGA para este micro-organismo.

Após observar os resultados obtidos com os micro-organismos utilizados, decidiu-se que as temperaturas a serem estudadas posteriormente deveriam estar entre 27 e 32 °C e o $\text{pH}_{\text{inicial}}$ fixado em 6,5.

4.3. Estudo da Adição de Diferentes Fontes de Nitrogênio e Diferentes Concentrações de Ácido Cítrico no Meio de Fermentação de *Bacillus velezensis* NRRL B-23189

Com o objetivo de diminuir o custo relativo ao substrato, fontes de nitrogênio mais baratas foram estudadas em substituição a triptona, peptona ou extrato de levedura utilizadas por outros autores, entre eles Chen e colaboradores (2010). Foram feitas duas fermentações, em duplicatas, em diferentes temperaturas, 27 e 32 °C.

A resposta estudada para as diferentes formulações de meio foi a concentração de γ -PGA. Os resultados foram tratados estatisticamente pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. A Tabela 30 apresenta os resultados obtidos na temperatura de 27 °C.

Tabela 30. Concentração média de γ -PGA produzido em meio fermentado por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, utilizando glicerol como substrato e diferentes concentrações de ácido cítrico e diferentes fontes de nitrogênio, temperatura de 27 °C, 72 h, agitação de 200 rpm

Meio	γ -PGA (g.L ⁻¹)
A	1,009 $\pm$ 0,0250 ^a
B	0,044 $\pm$ 0,0125 ^b
C	0,133 $\pm$ 0,0125 ^{c, d}
D	0,080 $\pm$ 0,0125 ^{b, c}
E	0,239 $\pm$ 0,1252 ^e
F	0,575 $\pm$ 0,1252 ^f
G	0,186 $\pm$ 0,1252 ^{e, d}
H	0,156 $\pm$ 0,1252 ^d

Para as diferentes formulações estudadas na temperatura de 27 °C o único meio realmente significativo para a concentração de γ -PGA, que permitiu obter acima de 1 g/L foi o meio A, que empregou o sulfato de amônio como fonte de nitrogênio. Pelo teste de Tukey, o meio A foi estatisticamente diferente de todas as outras formulações de meio ($p > 5\%$). As demais formulações de meios demonstraram baixa produção de γ -PGA pelo *Bacillus velezensis* NRRL B-23189.

Assim a única fonte de nitrogênio realmente importante foi o sulfato de amônio, meio A na presença de ácido cítrico, conforme descrito na Tabela 9 do item 3.3.4. de Material e Métodos.

Já para o estudo das diferentes formulações do meio empregando a temperatura de 32 °C pode-se observar pelos resultados apresentados na Tabela 31 que todas as médias obtidas para a concentração de γ -PGA foram baixas, abaixo de 1 g/L. Assim, os resultados obtidos para as mesmas não foram analisadas estatisticamente pelo teste de Tukey.

Diversos autores relatam que quando utilizado sulfato de amônio como fonte de nitrogênio não obteve-se resultados satisfatórios para produção do γ -PGA (CHEN et al., 2010; SHI et al., 2006b;), o que nos causa surpresa, pois nos nossos estudos, o sulfato de amônio foi a fonte de nitrogênio que apresentou os melhores resultados para produção do γ -PGA. Os autores não produziram γ -PGA quando utilizaram o sulfato de amônio.

Tabela 31. Concentração de γ -PGA produzido em meio fermentado por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, utilizando glicerol como substrato e diferentes concentrações de ácido cítrico e diferentes fontes de nitrogênio, temperatura de 32 °C, 72 h, agitação de 200 rpm

Meio	γ -PGA (g/L ⁻¹)
A	0,319
B	0,162
C	0,134
D	0,080
E	0,575
F	0,035
G	0,204
H	0,097

Através dos resultados encontrados neste estudo, ficou definido utilizar somente o meio A à 27 °C que contém sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e ácido cítrico na concentração de 15 g/L nos ensaios subsequentes.

4.4. Otimização do Meio de Cultivo Utilizado no Processo Fermentativo e Validação dos Resultados Através do Estudo das Variáveis Concentração Glicerol/Melaço, Sulfato de Amônio e Ácido Cítrico Utilizando *Bacillus velezensis* NRRL-23189

Para o novo estudo do meio fermentativo para produção de γ -PGA por *Bacillus velezensis* NRRLB-23189 utilizou-se concentração maior de ácido cítrico que a estudada inicialmente, para verificar sua interferência na produção. O ácido cítrico faz parte do ciclo de produção de γ -PGA (Figura 2), sugerindo que quanto maior sua concentração no meio maior será sua produção de γ -PGA. Também foi incrementada a concentração de glicerol, mas esta não ultrapassou os 150 g/L estudados inicialmente, visto que nesta concentração não houve produção do γ -PGA, provavelmente por inibição por excesso de substrato. Já a faixa de concentração de sulfato de amônio variou ao redor de 8 g/L.

Em um segundo momento avaliou-se a substituição do glicerol proveniente da fabricação do biodiesel pelo melaço de cana-de-açúcar contendo 54% de açúcares redutores totais. Uma nova faixa de concentração foi determinada para a fermentação do meio de cultivo contendo melaço como fonte de carbono para que a quantidade de açúcar fosse semelhante ao estabelecido anteriormente para o glicerol. Já para a concentração do ácido cítrico, verificou-se que o ácido cítrico interfere na produção do γ -PGA em meio de cultivo contendo glicerol como fonte de carbono e não se sabe a interferência do ácido cítrico em meio de cultivo contendo melaço. Assim, para o estudo destas 3 variáveis utilizou-se um delineamento composto central rotacional (DCCR) do tipo 2^3 , com 4 repetições no ponto central.

4.4.1. Estudo do Efeito da Concentração de Glicerol, Ácido Cítrico e Sulfato de Amônio na Produção de γ -PGA por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189

A Tabela 32 mostra os resultados obtidos para o micro-organismo *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 na temperatura de 27 °C, durante 72 h e agitação de

200 rpm. O pH_{inicial} dos meios fermentativos foi 6,5 e a única resposta analisada foi concentração do γ -PGA.

Tabela 32. Produção do γ -PGA no DCCR 2³ utilizando *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, temperatura de 27 °C, 72 h, pH_{inicial} de 6,5 e agitação de 200 rpm

Ensaio	x1	x2	x3	γ -PGA (g.L ⁻¹)
1	-1(80)	-1(15)	-1(4)	2,709
2	+1(120)	-1(15)	-1(4)	4,311
3	-1(80)	+1(25)	-1(4)	3,727
4	+1(120)	+1(25)	-1(4)	2,877
5	-1(80)	-1(15)	+1(12)	3,116
6	+1(120)	-1(15)	+1(12)	2,583
7	-1(80)	+1(25)	+1(12)	3,700
8	+1(120)	+1(25)	+1(12)	3,559
9	-1,68(66,4)	0(20)	0(8)	3,329
10	+1,68(133,6)	0(20)	0(8)	3,753
11	0(100)	-1,68(11,6)	0(8)	3,329
12	0(100)	+1,68(28,4)	0(8)	3,939
13	0(100)	0(20)	-1,68(1,28)	3,116
14	0(100)	0(20)	+1,68(14,72)	3,408
15	0(100)	0(20)	0(8)	4,205
16	0(100)	0(20)	0(8)	4,205
17	0(100)	0(20)	0(8)	4,046
18	0(100)	0(20)	0(8)	4,258

x1: glicerol (g.L⁻¹); x2: ácido cítrico (g.L⁻¹); x3: sulfato de amônio (g.L⁻¹).

Analisando a Tabela 32 verifica-se que os ensaios que apresentaram maior produção do γ -PGA foram os ensaios realizados nos pontos centrais, 15, 16, 17 e 18, juntamente com o ensaio 2.

O gráfico das Concentrações Preditas X Concentrações Observadas (Figura 24) para a resposta γ -PGA mostra que os dados ficaram dispersos em relação à reta $Y = X$, apesar disto, conseguiu-se uma boa repetibilidade dos pontos centrais e decidiu-se tratar estatisticamente utilizando a metodologia de

superfície de resposta. O coeficiente de determinação para a concentração do γ -PGA foi igual a 75,62%.

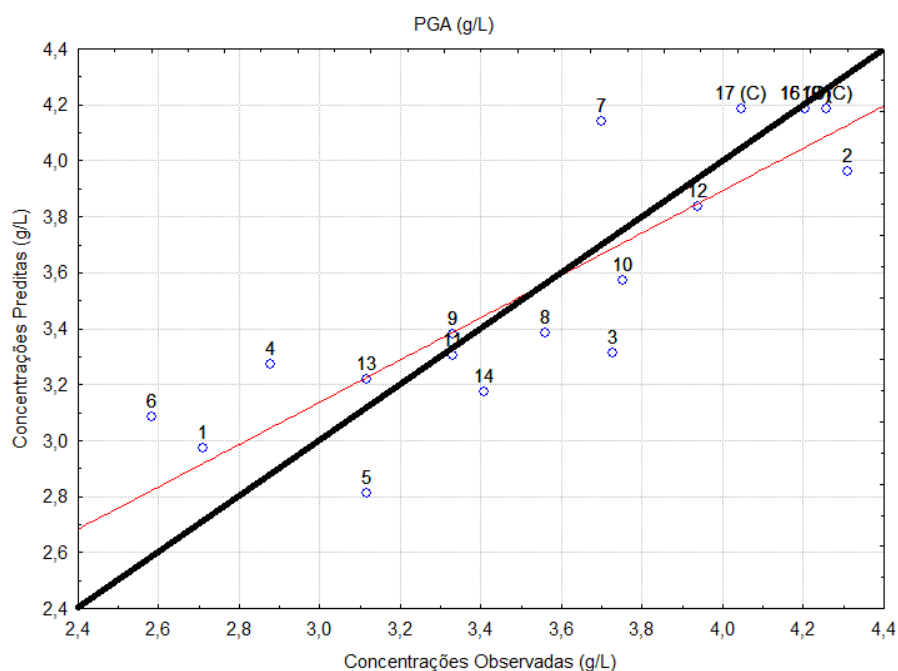


Figura 24. Concentrações preditas X concentrações observadas para a resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

Coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para a resposta produção do γ -PGA foram determinados utilizando o Statistic software, Tabela 33.

Tabela 33. Coeficientes de regressão do DCCR para γ -PGA

Fatores	Coef. de regressão	p-valor	Estimativa por intervalo	
			Limite Inferior (90%)	Limite Superior (90%)
Média	4,184	0,000000	3,821	4,547
x1	0,058	0,599007	-0,139	0,255
x1²	-0,250	0,052545	-0,454	-0,046
x2	0,159	0,171592	-0,038	0,356
x2²	-0,217	0,083677	-0,422	-0,013
x3	-0,013	0,906639	-0,210	0,184
x3²	-0,349	0,013167	-0,553	-0,144
x1*x2	-0,258	0,099532	-0,515	-0,001
x1*x3	-0,178	0,233302	-0,435	0,079
x2*x3	0,247	0,111810	-0,010	0,504

x1: glicerol (g/L); **x2:** ácido cítrico (g/L); **x3:** sulfato de amônio (g/L).

Conforme a Tabela 33 pode-se verificar que para a produção do γ -PGA, foram significativos os termos quadráticos para glicerol, ácido cítrico e sulfato de amônio e $x_1 \times x_2$, glicerol e ácido cítrico respectivamente, a 10% de significância ($p < 0,10$).

A ANOVA demonstrada pela Tabela 34 considerou todos os termos presentes na Tabela 33. Pela Tabela 34 observa-se que houve boa repetibilidade dos pontos centrais, uma vez que 90% dos resultados são explicadas pela regressão, sendo possível construir as superfícies de resposta relativas às Figuras 25, 26 e 27.

O modelo ajustado pode ser representado pela equação 3.

$$Y = 4,184 + 0,058x_1 - 0,250x_1^2 + 0,159x_2 - 0,217x_2^2 - 0,013x_3 - 0,349x_3^2 - 0,285x_1 \times x_2 - 0,178x_1 \times x_3 + 0,247x_2 \times x_3 \quad (3)$$

Tabela 34. ANOVA para a resposta γ -PGA produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, temperatura de 27 °C, 72 h, pH_{inicial} de 6,5 e agitação de 200 rpm

FV	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab (0,10;9;8)
Regressão	4,590	9	0,510	3,336	2,56
Resíduo	1,223	8	0,153		
Falta de Ajuste	1,198	5	0,240	28,430	Ftab (0,10;5;3)
Erro Puro	0,0253	3	0,008		5,31
Total	5.814	17	90%		

$$R^2 = 75,62\%$$

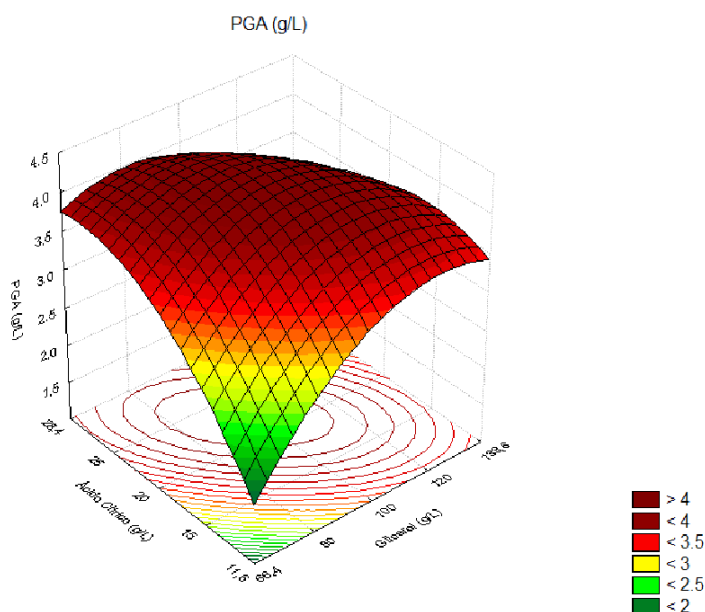


Figura 25. Superfície de resposta gerada pela resposta concentração de γ -PGA, em função da concentração de sulfato de amônio no ponto central, em meio fermentado contendo glicerol como substrato, produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

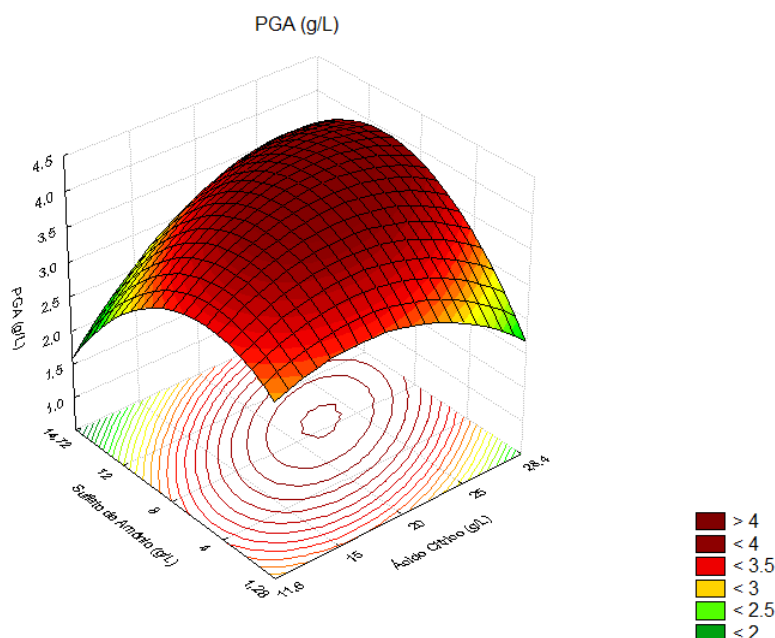


Figura 26. Superfície de resposta para a resposta γ -PGA, em função da concentração de glicerol no ponto central, em meio fermentado contendo glicerol como substrato, produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

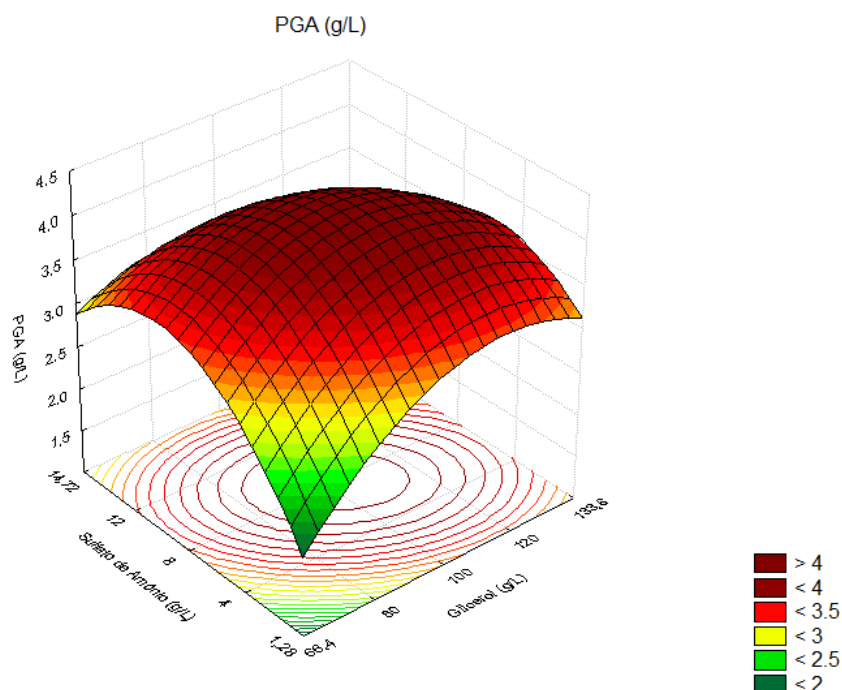


Figura 27. Superfície de resposta para a resposta γ -PGA, em função da concentração de ácido cítrico no ponto central, em meio fermentado contendo glicerol como substrato, produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

As superfícies de respostas mostradas nas Figuras 25, 26 e 27 demonstram que foi possível otimizar o processo fermentativo nas condições experimentais estudadas. A máxima concentração de γ -PGA foi obtida usando 100 g/L do glicerol proveniente do biodiesel, 8 g/L do sulfato de amônio e o ácido cítrico entre 20 e 25 g/L.

Para verificar se havia diferença significativa entre o ensaio 2 e os ensaios dos pontos centrais (15, 16, 17, 18) realizou-se uma nova fermentação, em duplicata, dos ensaios 2 e 15 e aplicou-se o teste de médias em relação à resposta γ -PGA e assim poder validar os resultados obtidos.

4.4.2. Estudo do Efeito do Melaço, Ácido Cítrico e Sulfato de Amônio na Produção do γ -PGA por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189

Para o processo produtivo de γ -PGA utilizando o melaço como fonte de carbono foram avaliadas duas respostas, concentração do γ -PGA e melaço residual, que podem ser observadas na Tabela 35.

Tabela 35. Produção do γ -PGA e melaço residual no DCCR 2³ utilizando *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, temperatura de 27 °C, 72 h, pH_{inicial} de 6,5 e agitação de 200 rpm

Ensaio	x1	x2	x3	γ -PGA (g.L ⁻¹)	Melaço Residual (g.L ⁻¹)
1	-1(140,5)	-1(5,06)	-1(4)	2,284	35,205
2	+1(259,5)	-1(5,06)	-1(4)	2,036	86,804
3	-1(140,5)	+1(19,94)	-1(4)	4,444	27,094
4	+1(259,5)	+1(19,94)	-1(4)	3,700	74,034
5	-1(140,5)	-1(5,06)	+1(12)	2,319	30,200
6	+1(259,5)	-1(5,06)	+1(12)	2,674	84,215
7	-1(140,5)	+1(19,94)	+1(12)	4,550	36,413
8	+1(259,5)	+1(19,94)	+1(12)	2,355	109,929
9	-1,68(100)	0(12,5)	0(8)	3,736	14,496
10	+1,68(300)	0(12,5)	0(8)	3,665	102,853
11	0(200)	-1,68(0)	0(8)	3,063	47,630
12	0(200)	+1,68(25)	0(8)	3,559	35,205
13	0(200)	0(12,5)	-1,68(1,28)	4,338	29,683
14	0(200)	0(12,5)	+1,68(14,72)	3,700	39,347
15	0(200)	0(12,5)	0(8)	4,904	27,612
16	0(200)	0(12,5)	0(8)	4,621	22,780
17	0(200)	0(12,5)	0(8)	5,117	26,231
18	0(200)	0(12,5)	0(8)	4,630	24,160

x1: melaço (g.L⁻¹); **x2:** ácido cítrico (g.L⁻¹); **x3:** sulfato de amônio (g.L⁻¹).

Assim como no DCCR utilizando o glicerol, o DCCR utilizando o melaço também apresentou maiores concentrações de γ -PGA nos pontos centrais. É importante ressaltar que nestes pontos também ocorreu maior consumo do substrato indicado pela baixa concentração do melaço residual.

Os ensaios 3, 7 e 13 também permitiram obter boa produção do γ -PGA, mas nestes o consumo do substrato foi menor.

Nas Figuras 28 e 29 pode-se observar os gráficos das concentrações preditas X concentrações observadas para as respostas concentração de γ -PGA e concentração do melaço residual, respectivamente. O gráfico da Figura 28 mostra que há grande dispersão dos dados experimentais em relação ao eixo Y = X,

apesar disto pode-se observar pelo gráfico e pela ANOVA (Tabela 37) que houve uma boa repetibilidade dos pontos centrais. O coeficiente de determinação para a produção do γ -PGA foi de 81,0%.

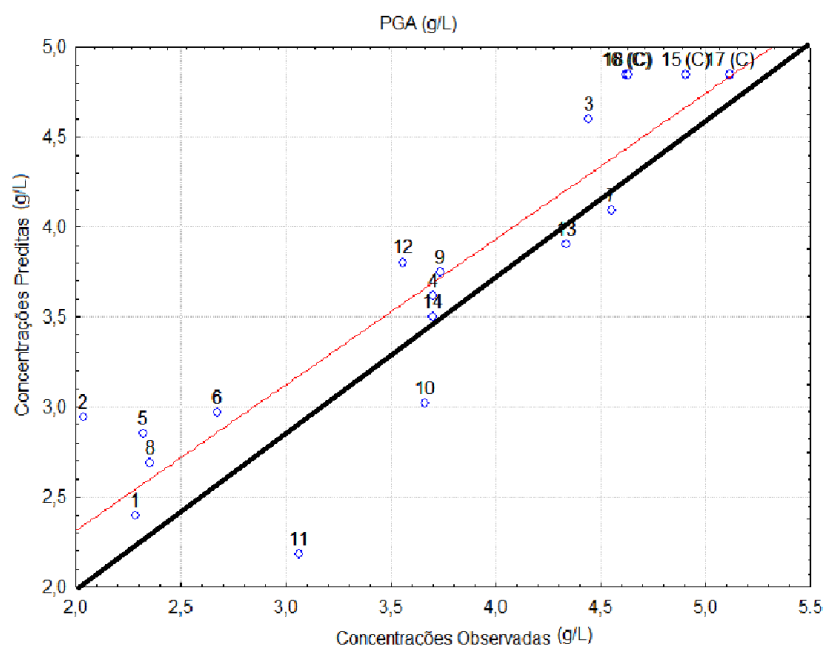


Figura 28. Concentrações preditas X concentrações observadas para a resposta concentração de γ -PGA em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

A Tabela 36 apresenta os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para a resposta do γ -PGA.

Tabela 36. Coeficientes de regressão do DCCR para a produção do γ -PGA

Fatores	Coef. de regressão	p-valor	Estimativa por intervalo	
			Limite Inferior (95%)	Limite Superior (95%)
Média	4,845	0,000000	4,117	5,573
x1	-0,216	0,241985	-0,611	0,178
x1²	-0,517	0,019643	-0,927	-0,107
x2	0,481	0,022749	0,087	0,876
x2²	-0,655	0,006192	-1,064	-0,245
x3	-0,120	0,502795	-0,514	0,274
x3²	-0,404	0,052513	-0,814	0,006
x1*x2	-0,381	0,126831	-0,896	0,135
x1*x3	-0,106	0,647948	-0,621	0,409
x2*x3	-0,239	0,316067	-0,754	0,276

x1: glicerol (g.L⁻¹); **x2:** ácido cítrico (g.L⁻¹); **x3:** sulfato de amônio (g.L⁻¹).

Uma equação para a resposta produção do γ -PGA foi desenvolvida baseada na análise dos coeficientes de regressão dos dados experimentais, os termos não significativos não foram descartados do modelo (equação 4)

$$Y = 4,845 - 0,216x_1 - 0,517x_1^2 + 0,481x_2 - 0,655x_2^2 - 0,120x_3 - 0,404x_3^2 - 0,381x_1x_2 - 0,106x_1x_3 - 0,239x_2x_3 \quad (4)$$

Tabela 37. ANOVA para a resposta γ -PGA produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, temperatura de 27°C, 72 h, pH inicial de 6,5 e agitação de 200 rpm

FV	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab (0,05;9;8)
Regressão	16,568	9	1,841	4,608	3,39
Resíduo	3,196	8	0,400		
Falta de Ajuste	3,025	5	0,605	10,618	Ftab (0,05;5;3)
Erro Puro	0,171	3	0,057		
Total	19,764	17	95%		9,01

Apesar da dispersão dos dados experimentais, foram construídas as superfícies de respostas para observar a tendência dos dados experimentais.

Para a resposta melaço residual também se observa pela Figura 29 que os dados experimentais estão dispersos em relação ao eixo Y=X. Os pontos centrais

apresentaram boa repetibilidade demonstrada pelo gráfico e também pela ANOVA, Tabela 39. O coeficiente de determinação foi de 89,7%.

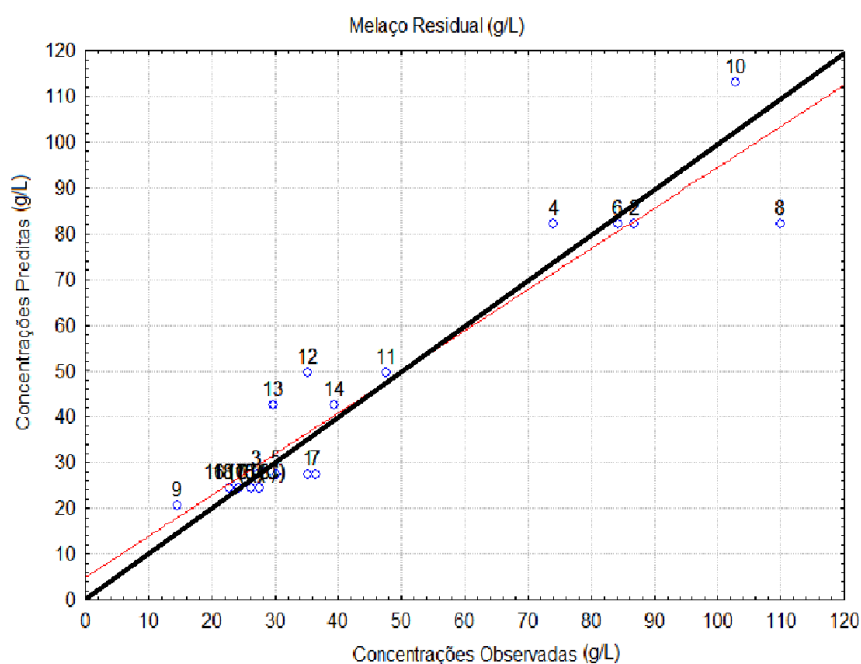


Figura 29. Concentrações Preditas X concentrações Observadas para a resposta Melaço Residual em meio fermentado contendo glicerol como substrato, utilizando o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

A Tabela 38 apresenta os coeficientes de regressão, p-valor e os limites de confiança para a resposta do γ -PGA. Os termos não significativos foram descartados.

Tabela 38. Coeficientes de regressão do DCCR para o Melaço Residual

Fatores	Coef. de regressão	p-valor	Estimativa por intervalo	
			Limite Inferior (95%)	Limite Superior (95%)
Média	24,498	0,001479	14,871	34,125
x1	27,434	0,000010	22,217	32,652
x1²	14,960	0,000895	9,538	20,381
x2	-0,721	0,803625	-5,939	4,496
x2²	8,858	0,016104	3,437	14,280
x3	3,945	0,197392	-1,273	9,163
x3²	6,418	0,058873	0,996	11,840
x1*x2	1,856	0,626465	-4,962	8,673
x1*x3	3,624	0,351851	-3,193	10,441
x2*x3	6,601	0,109461	-0,216	13,418

x1: glicerol (g/L); **x2:** ácido cítrico (g/L); **x3:** sulfato de amônio (g/L).

Uma equação para a resposta Melaço Residual foi desenvolvida baseada na análise dos coeficientes de regressão dos dados experimentais (equação 5).

$$Y = 24,498 + 27,434x_1 + 14,960x_1^2 + 8,858x_2^2 + 6,418x_3^2 \quad (5)$$

Tabela 39. ANOVA para a resposta Melaço Residual do meio fermentado por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, temperatura de 27 °C, 72 h, pH_{inicial} de 6,5 e agitação de 200 rpm

FV	SQ	GL	QM	Fcalc	Ftab (0,10;9;8)
Regressão	14623,228	4	3655,807	913,952	2,43
Resíduo	1560,985	13	120,076		
Falta de Ajuste	1547,1668	10	154,717	15,472	Ftab (0,10;5;3)
Erro Puro	13,819	3	4,606		5,23
Total	16184,213	17	90%		

A seguir as Figuras 30, 32 e 34 apresentam as superfícies de resposta para a resposta produção de γ -PGA e as Figuras 31, 33 e 35 a superfície de resposta para a resposta melaço residual. Pode-se observar que o consumo de melaço ocorreu no ponto onde houve maior produção de γ -PGA, sendo diretamente proporcionais.

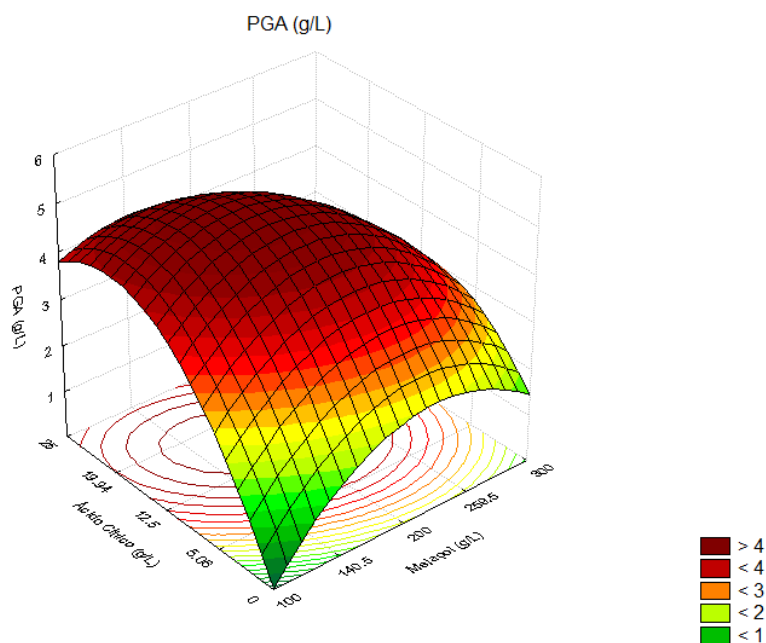


Figura 30. Superfície de resposta para a resposta γ -PGA, em função da concentração de sulfato de amônio no ponto central, em meio fermentado contendo melaço como substrato, produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

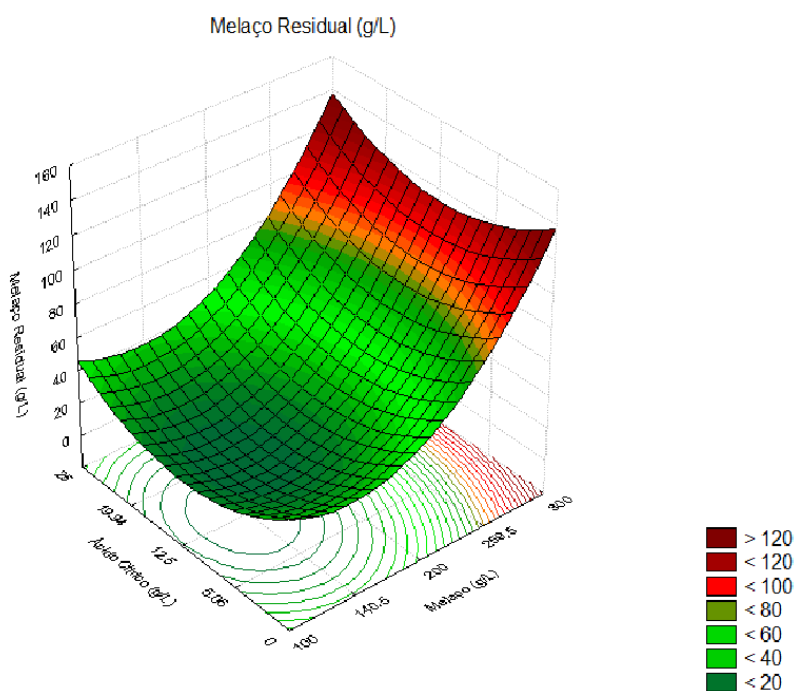


Figura 31. Superfície de resposta para a resposta Melaço Residual, em função da concentração de sulfato de amônio no ponto central, em meio fermentado contendo melaço como substrato, produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

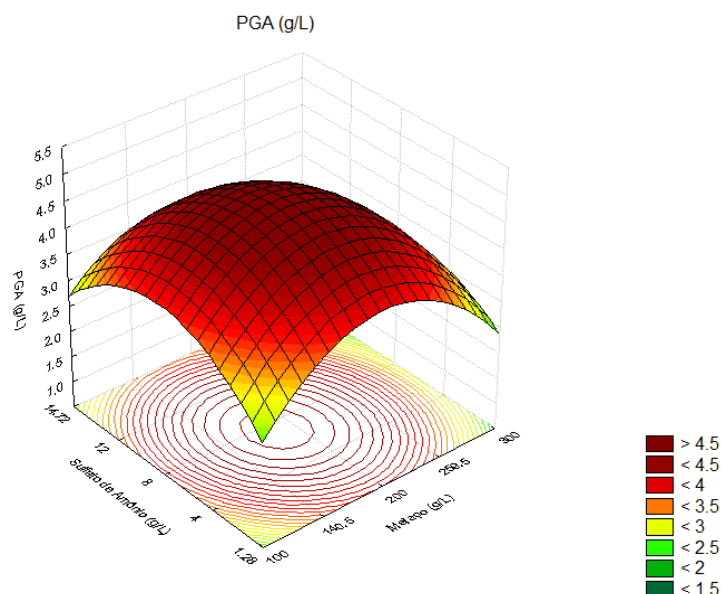


Figura 32. Superfície de resposta para a resposta γ -PGA, em função da concentração de ácido cítrico no ponto central, em meio fermentado contendo melaço como substrato, produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

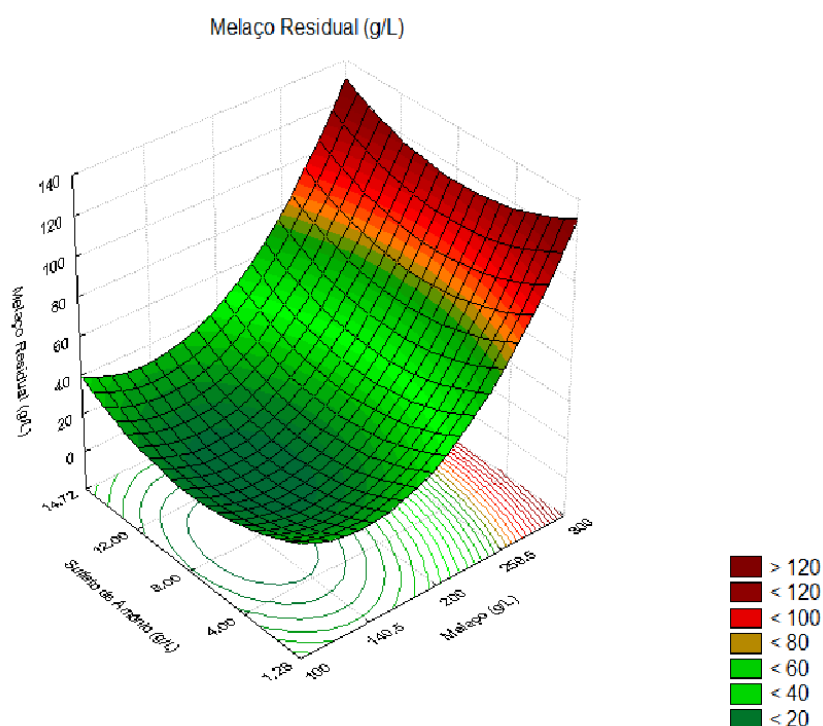


Figura 33. Superfície de resposta para a Melaço Residual, em função da concentração de ácido cítrico no ponto central, em meio fermentado contendo melaço como substrato, produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

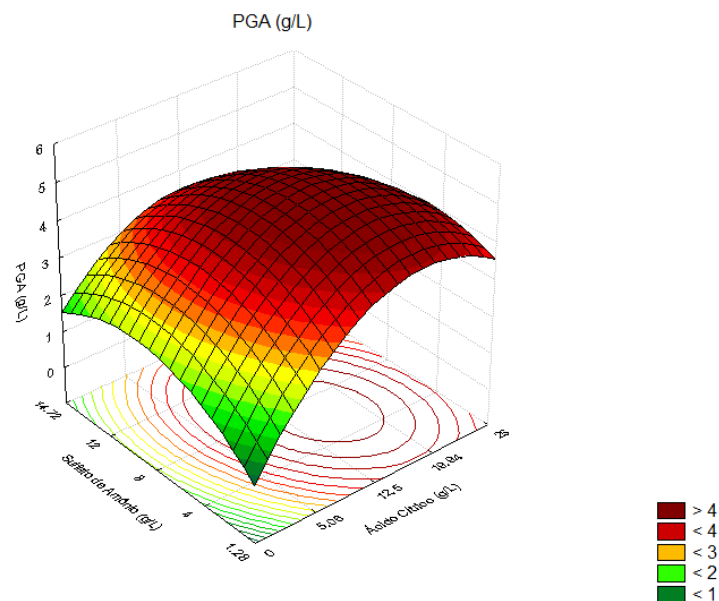


Figura 34. Superfície de resposta para a resposta γ -PGA, em função da concentração de melaço no ponto central, em meio fermentado contendo melaço como substrato, produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

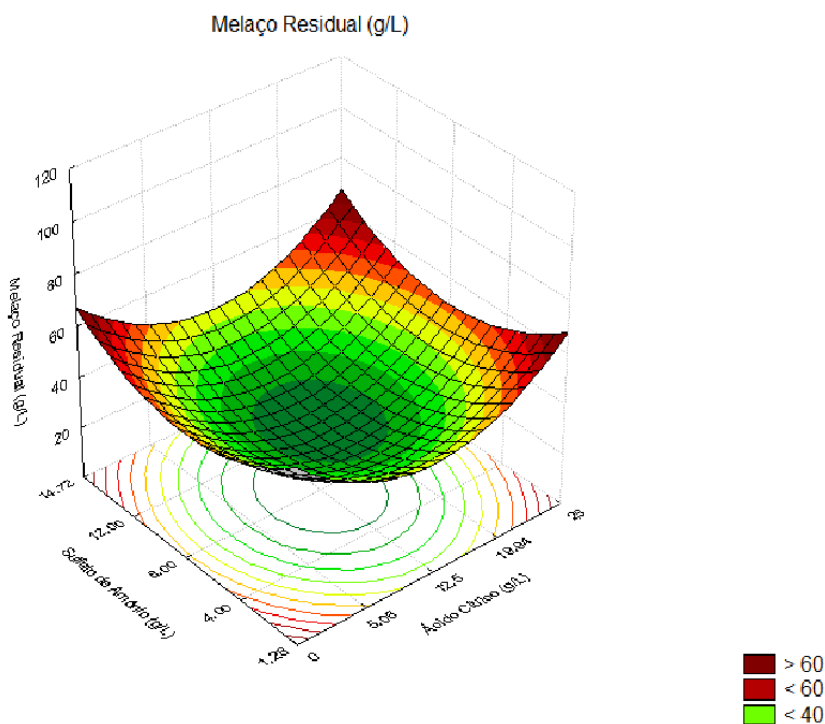


Figura 35. Superfície de resposta para a resposta Melaço Residual, em função da concentração de melaço no ponto central, em meio fermentado contendo melaço como substrato, produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

Através das Figuras pode-se afirmar que a maior produção de γ -PGA ocorreu próximo ao ponto central, com 200 g/L do melaço e 8 g/L do sulfato de amônio. Para o ácido cítrico ocorreu consumo um pouco menor que quando utilizou-se o glicerol como fonte de carbono, entre 12,5 e 19,94 g/L.

Para validar os resultados foram feitos novamente os ensaios 3, 7, 13 e 15, em duplicata, para aplicar o teste de Tukey a 5 % de probabilidade, com o objetivo de verificar se havia diferença entre as médias.

Este trabalho gerou a publicação do artigo “Optimisation of poly(γ -glutamic acid) production by *Bacillus velezensis* NRRL-23189 in liquid fermentation on molasses as carbon source without addition of glutamic acid” apresentado no Anexo 2.

4.4.3. Validação dos Resultados

Para a validação da melhor resposta foram realizadas fermentações dos ensaios que proporcionaram melhores resultados com relação à produção do γ -PGA e posteriormente aplicou-se o teste de Tukey a 5 % de probabilidade.

Os ensaios 2 e 15, que tinham como fonte de carbono a variável glicerol, foram repetidos em duplicata. As respostas para a produção do γ -PGA estão demonstradas na Tabela 40. Os resultados mostram que não houve diferença entre as médias ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 40. Produção do γ -PGA no DCCR 2³ utilizando *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, temperatura de 27 °C, 72 h, pH_{inicial} de 6,5 e agitação de 200 rpm

Ensaio	γ -PGA (g.L ⁻¹)
2	4,152 $\pm$ 0,0376 ^a
15	4,205 $\pm$ 0,0376 ^a

Os ensaios 3, 7, 13 e 15, que tinham como fonte de carbono a variável melaço, foram repetidos em duplicata. As respostas para a produção do γ -PGA

estão demonstradas na Tabela 41. Os resultados mostram que não houve diferença entre as médias ao nível de 5% de probabilidade.

Tabela 41. Produção do γ -PGA no DCCR 2³ utilizando *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, temperatura de 27 °C, 72 h, pH_{inicial} de 6,5 e agitação de 200 rpm

Ensaio	γ -PGA (g.L ⁻¹)
3	4,249 $\pm$ 0,3505 ^a
7	4,391 $\pm$ 0,0501 ^a
13	4,338 $\pm$ 0,3505 ^a
15	4,798 $\pm$ 0,2003 ^a

4.5. Produção de γ -PGA em Biorreator de 5 L

Com o objetivo de aumentar a escala do processo de produção do γ -PGA por *Bacillus velezensis* NRRL-23189, duas fermentações foram realizadas utilizando as diferentes fontes de carbono estudadas anteriormente, glicerol residual ou melaço. Os cultivos foram conduzidos em fermentador Bio Flow III com cuba de 5 L.

As fermentações foram conduzidas por 96 h utilizando as condições otimizadas pelos DCCR, ou seja, 27 °C, pH_{inicial} de 6,5. A taxa de aeração utilizada foi de 2 VVM com velocidade de agitação de 500 rpm, de forma a manter a concentração necessária de oxigênio dissolvido, uma vez que em ensaios preliminares com taxa de aeração de 1 VVM e rotação de 200 rpm não ocorreu produção do γ -PGA. Tais mudanças ocorreram para melhorar a aeração do sistema e evitar a queda do oxigênio dissolvido. Segundo Zhang e colaboradores (2011) a velocidade de agitação e taxa de aeração influenciam o nível do oxigênio no meio durante a fermentação. Sabemos que *Bacillus* species são micro-organismos aeróbios e o suplemento do oxigênio é um fator importante para fermentação aeróbica (Richard; Margaritis, 2003b).

As análises foram feitas em duplicata e os resultados de cinética da produção de γ -PGA usando glicerol ou melaço como fonte de carbono estão demonstrados nas Figuras 36 e 37.

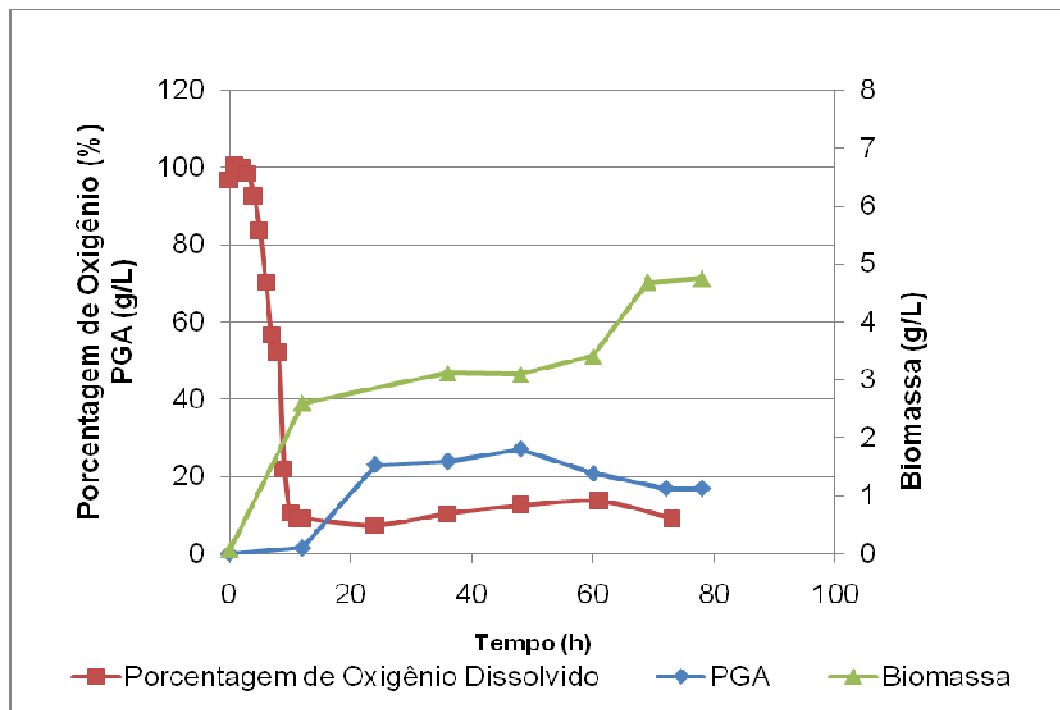


Figura 36. Cinética da produção do γ -PGA utilizando glicerol da fabricação de biodiesel como fonte de carbono e *Bacillus velezensis* NRRL B-23189

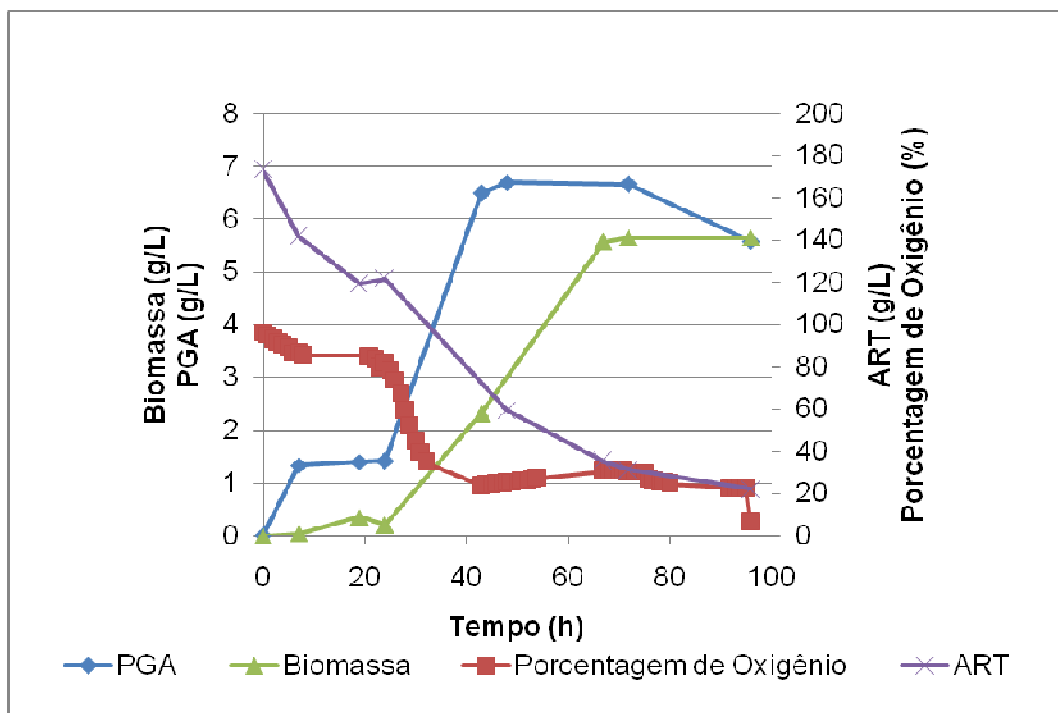


Figura 37. Cinética da produção do γ -PGA utilizando melaço como fonte de carbono e *Bacillus velezensis* NRRL B-23189

A Figura 36 mostra que a concentração de biomassa aumentou rapidamente, enquanto a concentração de γ -PGA começou a aparecer por volta de 12 horas de fermentação, ou seja, a produção de γ -PGA não ocorreu de forma associado ao crescimento celular quando se utilizou glicerol com fonte de carbono. Quando se utilizou melaço este comportamento não foi observado (Figura 37), mas sim produção de γ -PGA associada ao crescimento celular. Em ambas as fermentações ocorreu queda da concentração de γ -PGA, indicando que ele foi degradado enzimaticamente, provavelmente para ser utilizado como substrato. A concentração de oxigênio dissolvido manteve-se ao redor de 10% da saturação no ensaio da Figura 36 após 10 horas de fermentação e pouco acima de 20% após 40 horas de fermentação no ensaio da Figura 37, o que pode ser explicado pelo seu consumo e aumento da viscosidade do meio de cultura causado pela presença do γ -PGA, que dificultou a transferência do oxigênio da fase gás para a líquida. Segundo Chen e colaboradores (2010), o aumento da concentração do γ -PGA de alto peso molecular no meio fermentativo, aumenta a viscosidade do meio. Os autores também observaram que quando se utilizou alta concentração

de glicose, ou seja 120 g/L, uma alta concentração de γ -PGA, aproximadamente 46,4 g/L, foi obtida em 48 h de fermentação. Após este tempo, a produção do γ -PGA começou a decair, a viscosidade aumentou e a concentração de oxigênio dissolvido diminuiu. Outro fator que pode ter influenciado é que a biossíntese do γ -PGA foi reduzida rapidamente quando a glicose estava esgotada no meio fermentativo, assim a produção do γ -PGA foi afetada pela disponibilidade de glicose. Assim, o micro-organismo ao sofrer estresse por falta do substrato procurou uma nova fonte de carbono que seria o γ -PGA. Segundo Chen e colaboradores (2010), a biossíntese do γ -PGA foi reduzida rapidamente quando glicose estava esgotada no meio fermentativo, assim a produção do γ -PGA foi afetada pela disponibilidade de glicose.

Como podemos observar na Figura 37, a concentração de ART no meio contendo melaço residual apresentou queda continua durante todo o processo fermentativo, no entanto após determinada concentração, aproximadamente 60 g/L do melaço residual, o micro-organismo começou a utilizar também o γ -PGA como fonte de carbono para sua sobrevivência, demonstrado pela queda após 48 h de fermentação na linha que representa a concentração do γ -PGA.

Um fato importante a ser observado é a diferença final da concentração do γ -PGA entre ambas as fermentações. Utilizando glicerol oriundo da fabricação do biodiesel como fonte de carbono a concentração do γ -PGA chegou a 27,08 g/L em 48 h de fermentação. Já utilizando o melaço, a concentração do γ -PGA não ultrapassou 6,69 g/L, também obtido em 48 h. Esta diferença não foi encontrada quando as fermentações ocorreram em frascos de Erlenmeyers de 250 mL. Sugere-se que tal diferença tenha ocorrida devido à presença de muitas impurezas no melaço e/ou às condições operacionais empregadas no fermentador e/ou diferença na concentração do ácido cítrico utilizado, pois este participa do ciclo do ácido tricarboxílico que produz γ -PGA (GOTO; KUNIOKA, 1992).

Comparando os resultados acima com os obtidos por Shi e colaboradores (2006b), podemos observar que as concentrações de γ -PGA alcançadas neste

trabalho foram menores porém satisfatórias, considerando que esses autores usaram na composição do meio sacarose como substrato, 59,8 g/L, triptona, 53,54 g/L e ácido glutâmico, 81,05 g/L, para obter 58,2 g/L do γ -PGA. No entanto esta produção foi realizada empregando substratos onerosos que aumentaram o custo de produção. Já neste trabalho utilizou-se subprodutos industriais brasileiros, sulfato de amônio, sem a presença do ácido glutâmico, chegando a obter 27,08 g/L do γ -PGA. É importante salientar que quando utilizaram sulfato de amônio, mesmo componente utilizado neste trabalho como fonte de nitrogênio, esses autores não conseguiram produzir γ -PGA. Resultado similar foi observado por Chen e colaboradores (2010).

Zhang e colaboradores (2011) conseguiram produzir aproximadamente 34,4 g/L de γ -PGA utilizando a mesma concentração do sulfato de amônio, glicose como fonte de carbono e ácido glutâmico na concentração de 50 g/L, sendo apropriada a mesma comparação com relação ao menor custo do meio de cultura utilizado neste trabalho, a despeito da menor concentração de γ -PGA produzido. É importante salientar esses autores fizeram um estudo relacionando a influência da aeração no processo fermentativo, alcançando a concentração de γ -PGA mencionada acima com agitação de 600 rpm. Quando utilizaram agitação de 800 rpm, a concentração de γ -PGA caiu para 29,1 g/L. Concluíram que é melhor usar velocidade de agitação menor nas primeiras 24 h, para aumentar o número de células, e depois um valor maior para produzir do γ -PGA.

Trabalho similar foi realizado por Bajaj e Singhal (2009) com o objetivo de estudar a adição de precursores (aminoácidos e intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico) na produção do γ -PGA. O meio de composição semelhante ao estudado neste trabalho diferenciava por apresentar o glicerol industrial e ácido glutâmico em concentração de 20 g/L, além da adição de outros precursores. A concentração de γ -PGA obtido foi de 35,75 g/L, quando foram adicionados os precursores e 26,12 g/L quando estes estavam ausentes. Observa-se então que com a adição de precursores a produção de γ -PGA foi maior que a obtida neste trabalho, porém sem a adição deste componente não houve diferença significativa.

4.6. Estudo da Hidrólise de γ -PGA

4.6.1. Utilização de γ -PGA como Fonte de Carbono

O estudo da hidrólise de γ -PGA foi feito com o objetivo de obter a enzima responsável por sua hidrólise e, a partir desta obter ácido glutâmico através da hidrólise de γ -PGA.

Um meio com composição semelhante ao meio otimizado contendo γ -PGA como fonte de carbono foi preparado sem adição de ácido cítrico. O ácido cítrico não foi adicionado para não ser utilizado como fonte de carbono. Para isto uma solução de γ -PGA, produzido em meio de glicerol ou melaço, foi preparada e adicionada dos demais componentes.

De acordo com os resultados ilustrados na Figura 38 verifica-se que a concentração do γ -PGA (proveniente de meio de cultivo utilizando melaço como fonte de carbono) está associada ao crescimento de *Bacillus velezensis* NRRL-23189. O valor da concentração do γ -PGA passou de 111,542 g/L para 49,353 g/L em 84 h de fermentação a uma taxa de consumo de -14,03 g/L.h. Já a biomassa aumentou de 0 g/L para 5,73 g/L no mesmo intervalo de tempo.

Para a Figura 39 verifica-se que a concentração do γ -PGA (proveniente de meio de cultivo utilizando glicerol como fonte de carbono) também está associada ao crescimento de *Bacillus velezensis* NRRL-23189. O valor da concentração do γ -PGA passou de 2,089 g/L para 0,186 g/L em um intervalo de 96 h de fermentação a uma taxa de consumo de -0,472 g/L.h. Já a biomassa aumentou de 0 g/L para 2,010 g/L no mesmo intervalo de tempo.

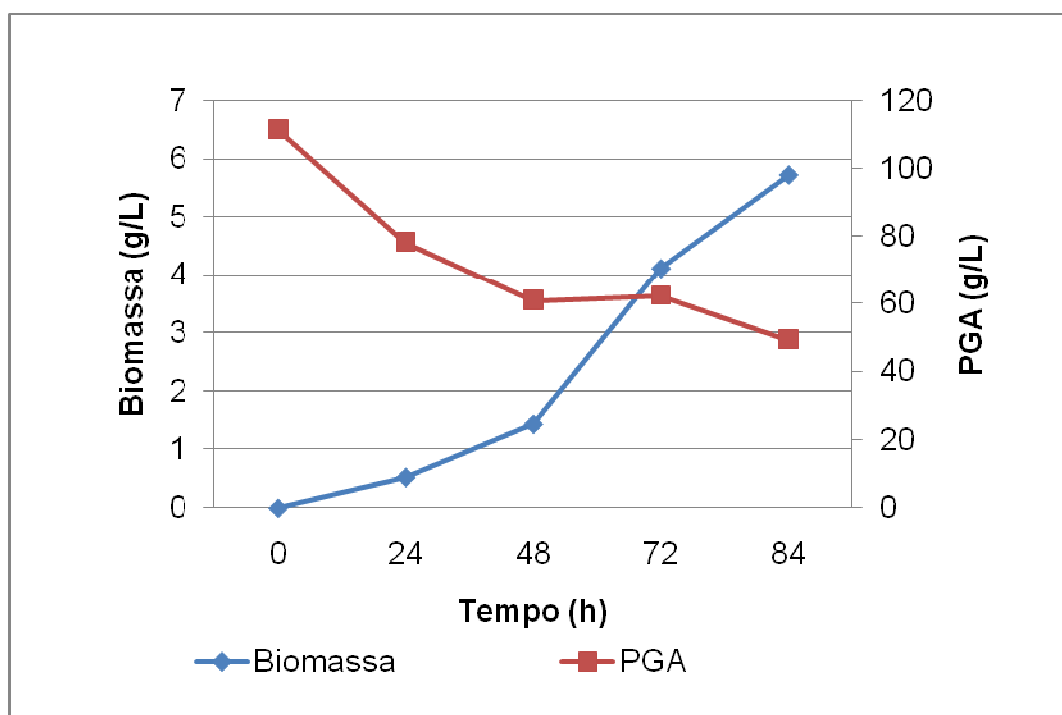


Figura 38. Consumo de γ -PGA, produzido utilizando o melão como fonte de carbono, sem ácido cítrico no meio a 27 °C

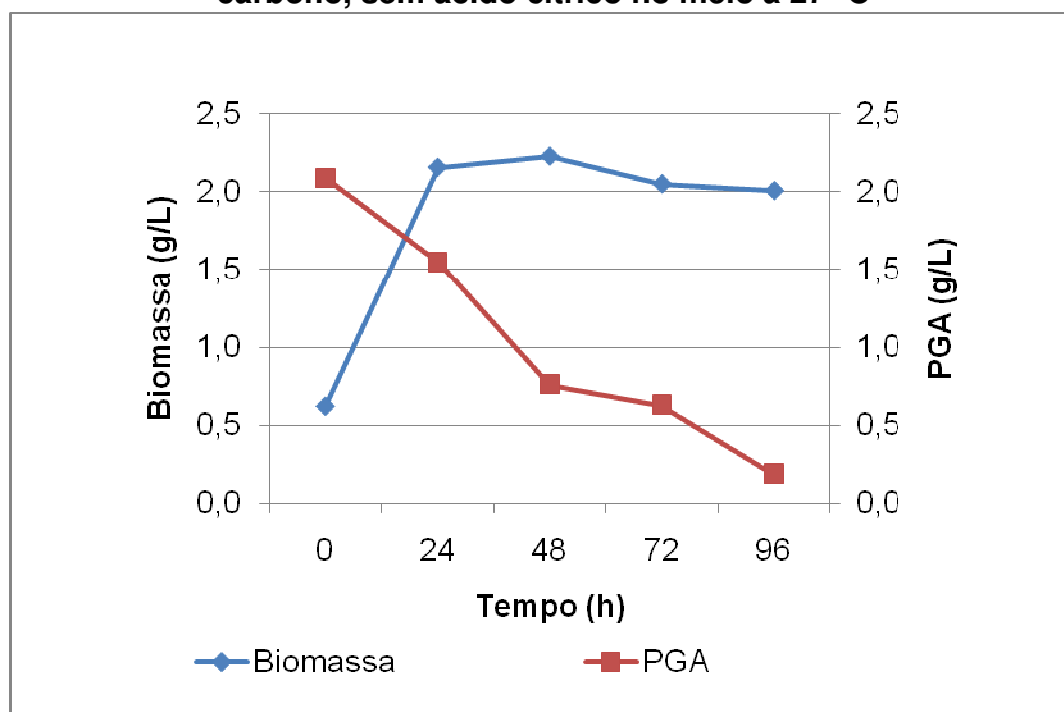


Figura 39. Consumo do γ -PGA, produzido utilizando o resíduo de glicerol como fonte de carbono, sem ácido cítrico no meio a 27 °C

É importante notar que a biomassa não ultrapassou o valor de 5,73 g/L quando utilizou-se o γ -PGA proveniente da fermentação melaço como fonte de carbono. A grande concentração do γ -PGA utilizado levou a um aumento da viscosidade do meio fermentativo e este pode ter dificultado à aeração do meio de cultivo, e consequentemente a produção da biomassa. Já a biomassa produzida quando utilizou-se γ -PGA proveniente da fermentação do glicerol não ultrapassou 2,3 g/L, obtida em 48 h de fermentação, devido a pequena quantidade de γ -PGA que estava presente no meio fermentado.

4.6.2. Estudo da Hidrólise Enzimática de γ -PGA pela Enzima Produzida pela *Bacillus velezensis* NRRL B-23189

Sabe-se que soluções de γ -PGA são relativamente estáveis a temperatura ambiente e que sua amida será degradada em temperaturas superiores a 60 °C (GOTO; KUNIOKA, 1992).

Observando a Figura 40 pode-se afirmar que em todas as temperaturas ocorreu a hidrólise de γ -PGA pela enzima presente no sobrenadante do meio de cultura que continha γ -PGA como fonte de carbono. Ao comparar a hidrólise entre as temperaturas 30 °C e 45 °C, sugere-se que o aumento da temperatura pode ter levado às condições ideais da enzima presente no meio de cultivo e assim observa-se que aumentou a taxa de hidrólise de γ -PGA pela enzima. Resultados semelhantes estão presentes na literatura relacionando temperatura e hidrólise. Goto e Kunioka (1992) estudaram a hidrólise térmica em temperaturas de 80 °C, 100 °C e 120 °C e observaram que a temperatura realmente influenciou na degradação do γ -PGA com o tempo. Já Yao e colaboradores (2009) investigaram a hidrólise enzimática utilizando temperaturas entre 30 °C e 45 °C combinadas com a faixa de pH entre 5 e 8. A condição otimizada para a hidrólise foi a 30 °C e pH 5,0 com uma redução de 98% na massa molecular do γ -PGA pela enzima presente no meio.

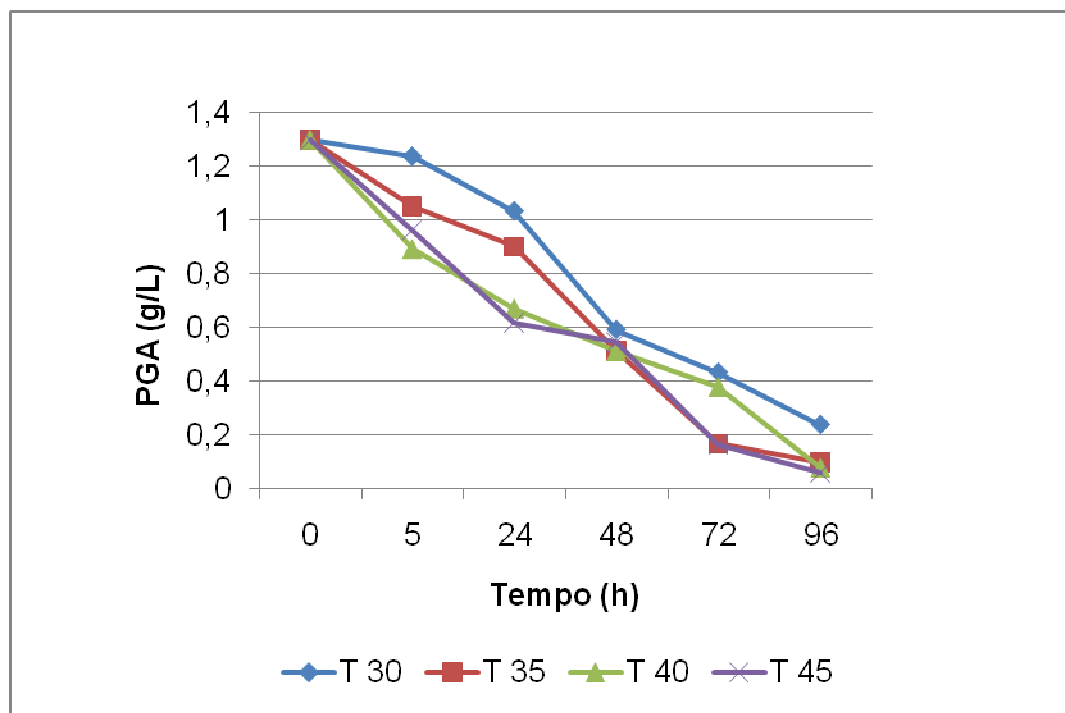


Figura 40. Concentração de γ -PGA remanescente – hidrólise pela enzima presente em sobrenadante de meio de cultivo contendo γ -PGA em diferentes temperaturas

5. Conclusões

Dentre os micro-organismos ensaiados, somente o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 apresentou uma boa produção do γ -PGA utilizando diferentes fontes de carbono, melaço e glicerol, nas condições de fermentação estudada.

Os resultados obtidos mostraram que é possível produzir γ -PGA utilizando subprodutos industriais, glicerol e melaço, como fonte de carbono pelo micro-organismos *Bacillus velezensis* NRRL-23189 sem a necessidade da utilização do ácido glutâmico no meio fermentativo.

A adição de ácido glutâmico no meio de cultivo não é necessária e a substituição de extrato de levedura e/ou peptona por sulfato de amônio reduz o custo do meio de cultivo.

A utilização de baixas temperaturas, 27 °C, a presença de sulfato de amônio como fonte de nitrogênio, a presença do ácido cítrico e a utilização do pH_{inicial} ajustado em 6,5 contribuíram para aumentar a produção do γ -PGA em frascos de Erlenmeyer.

A produção do γ -PGA através do *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 e utilizando glicerol 100 g/L como fonte de carbono, sulfato de amônio 8 g/L como fonte de nitrogênio, ácido cítrico 20 g/L, temperatura de 27°C, agitação de 200 rpm, pH_{inicial} 6,5 levou a uma produção de aproximadamente 4,17 g/L de γ -PGA sem a utilização do ácido glutâmico.

Já a produção do γ -PGA através do *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 e utilizando melaço 200 g/L como fonte de carbono, sulfato de amônio 8 g/L como fonte de nitrogênio, ácido cítrico 12,5 g/L, temperatura de 27 °C, agitação de 200 rpm, pH_{inicial} 6,5 levou a uma produção de aproximadamente 4,82 g/L do γ -PGA sem a utilização do ácido glutâmico.

A produção de γ -PGA apresentou aumento significativo quando o *Bacillus velezensis* NRRL 23189 foi cultivado em fermentador de 5 L, contudo o aumento foi maior quando a fonte de carbono era glicerol. Houve necessidade de utilizar alta taxa de aeração e alta velocidade de rotação para suprir a necessidade de oxigenação do meio de cultura.

O *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 utiliza o γ -PGA como fonte de carbono quando outras fontes não estão no meio fermentativo. Para isto o micro-organismo libera uma enzima no meio de cultura responsável pela hidrólise do γ -PGA.

6. Sugestões para Trabalhos Futuros

- Estudos para aumento da viabilidade;
- Influência da aeração durante o processo fermentativo;
- Estudos empregando novos resíduos industriais brasileiros;
- Caracterização do γ -PGA produzido e sua degradação em ácido glutâmico;
- Ampliação de escala e aplicação industrial;
- Aplicação do γ -PGA.

7. Referências Bibliográficas

AJINOMOTO ANIMAL NUTRITION. **Ajinomoto transforma o Brasil em base estratégica para aminoácidos**. Ajinomoto. Disponível em: <http://www.lisina.com.br/noticias_detalhes.aspx?id=361>. Acesso em: 02 ago 2011.

ALCARDE, A.R. **Árvore do conhecimento da cana-de-açúcar**. Ageitec. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_108_22122006154841.html>. Acesso em: 01 dez 2013.

BAJAJ, I.B.; LELE, S.S.; SINGHAL, R.S. Enhanced production of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 in solid state fermentation. **J Ind Microbiol and Biotechnol**, v. 35, p. 1581-1586, 2008.

BAJAJ, I.B.; SINGHAL, R.S. Enhanced production of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by using metabolic precursors. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 159, p. 133-141, 2009.

BAJAJ, I.; SINGHAL, R. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of comercial interest. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 5551-5561, 2011.

BASTOS, V.D.; COSTA, L.M. Déficit comercial, exportações e perspectivas da indústria química brasileira. **Química – BNDSSetorial**, v. 33, p. 163-206, 2011.

BHUNIA, B.; MUKHOPADHY, D.G.S.; MANDAL, T.; DEY, A. Improved production, characterization and flocculation properties of poly (γ)-glutamic acid produced from *Bacillus subtilis*. **J Biochem Tech**, v. 3, p. 389-394, 2012.

BISARIA, R.; MADAN, N.; VASUDEVAN, P. Utilisation of agro-residues as animal feed through bioconversion. **Bioresource Technology**, v. 59, p. 5-8, 1997.

BOVARNICK, M. The formation of extracellular *d*(-)-glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*. **J Biol Chem**, v. 145, p. 415-424, 1942.

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, p. 1-19, 2007.

CANDELA, T.; FOUET, A. Poly-gamma-glutamate in bacteria. **Molecular Microbiology**, v. 60, p. 1091-1098, 2006.

CHEN, J.; SHI, F.; ZHANG, B.; ZHU, F.; CAO, W.; XU, G.; CEN, P. Effects of cultivation conditions on the production of γ -PGA with *Bacillus subtilis* ZJU-7. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 160, p. 370-377, 2010.

CHUNG, S.; GENTILINI, C.; CALLANAN, A.; HEDEGAARD, M.; HASSING, S.; STEVENS, M.M. Responsive poly (γ -glutamic acid) fibres for biomedical applications. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, p. 1397-1401, 2013.

COSTA, R. Glicerina: o tamanho do problema. **Biodieselbr**, v. 1, p. 16-20, 2008.

CROMWICK, A.M.; BIRRER, G.A.; GROSS, R.A. Effects of pH and aeration on γ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures. **Biotechnology Bioengineering**, v. 50, p. 222-227, 1996.

DENG, S.B.; BAI, R.B.; HU, X.M. Characteristics of a bioflocculants produced by *Bacillus mucilaginosus* and its use in starch wastewater treatment. **Agric Biol Chem**, v. 60, p. 588-593, 2003.

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, p. 219-223, 2001.

DIEZ, J.C.; YOKOYA, F. Fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar por processo descontínuo utilizando *Zyomonona mobilis*. **Arq. Biol. Tecnol.**, v. 39, p. 419-426, 1996.

GERIGK, M.; BUJINICKI, R.; GANPO-NKWENKWA, E.; BONGAERTS, J.; SPRENGER, G.; TAKORS, R. Process control for enhanced L-phenylalanine production using different recombinant *Escherichia coli* strains. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 80, p. 746-754, 2002.

GOURDON, P.; LINDLEY, N.D. Metabolic analysis of glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*. **Metabolic Engineering**, v. 1, p. 224-231, 1999.

GOTO, A.; KUNIOKA, M. Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335. **Biosci. Biotech. Biochem**, v. 56, p. 1031-1035, 1992.

HERMANN, T. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. **Journal of Biotechnology**, v. 104, p. 155-172, 2003.

HOPPENSACK, A.; OPPERMANN-SANIO, F.B.; STEINBÜCHEL, A. Conversion of the nitrogen content in liquid manure into biomass and polyglutamic acid by a newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 218, p. 39-45, 2003.

HUANG, J.; DU, Y.; XU, G.; ZHANG, H.; ZHU, F.; HUANG, L.; XU, Z. High yield and cost-effective production of poly(γ -glutamic acid) with *Bacillus subtilis*. **Eng. Life Sci.**, v. 11, p. 291-297, 2011.

KAMBOUROVA, M.; TANGNEY, M.; PRIEST, F.G. Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 67, p. 1004-1007, 2001.

KING, E.C.; BLACKER, A.J.; BUGG, T.D.H. Enzymatic breakdown of poly- γ -glutamic acid in *Bacillus licheniformis*: identification of a polyglutamyl- γ -hydrolase enzyme. **Biomacromolecules**, v. 1, p. 75-83, 2000.

KO, Y.H.; GROSS, R.A. Effects of glucose and glycerol on γ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. **Biotechnology Bioengineering**, v. 57, p. 430-437, 1998.

KUBOTA, H.; MATSUNOBU, T.; UOTANI, K.; TAKEBE, H.; SATOH, A.; TANAKA, T.; TANIGUCHI, M. Production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 57, p. 1212-1213, 1993.

KUNIOKA, M. Biosynthesis and chemical reactions of poly(amino acid)s from microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 47, p. 469-475, 1997.

KUNIOKA, M.; GOTO, A. Biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 40, p. 867-872, 1994.

LI, Y.; MENG, Y.; SUN, S. Novel *Bacillus subtilis* useful for producing gamma polyglutamic acid with sufficient nutrition. **Patent Number**: CN 101109010-A, 23/01/2008; CN 101109010-B, 16/06/2010.

MARGARIDO, L.A.C.; RUAS, D.G.G.; LAVORENTI, N.A.; MATSUOKA, S.; BESKOW, P.R.; STOLF, R. Produção orgânica da cana-de-açúcar, açúcar mascavo, melão e rapadura: uma experiência. **Extensao Rural e Desenvolvimento Sustentável**, v. 1, p. 39-43, 2005.

MOTA, C.J.A.; SILVA, C.X.A.; GONÇALVES, V.L.C. Gliceroquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, p. 639-648, 2009.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, Ed. Worth Publishers, New York, p. 1152, 2000.

OLIVEIRA, R.F.; SOUSDALEFF, M. Produção fermentativa de ácido láctico a partir do melaço da cana-de-açúcar por *Lactobacillus casei*. **Brazilian Journal Food**, VII BMCFB, 2009.

OPPERMANN, F.B.; PICKARTZ, S.; STEINBÜCHEL, A. Biodegradation of polyamides. **Polymer Degradation and Stability**, v. 59, p. 337-344, 1998.

PARAZZI, C. **Matérias-primas da fermentação etanólica**. Disponível em: <<http://www.cca.ufscar.br/~vico/Materias%20primas%20da%20fermentacao%20etanolica.pdf>>. Acessado em 20 set 2011.

PEREIRA, C.L.; ANTUNES, J.C.; GONÇALVES, R.M.; FERREIRA-DA-SILVA, F.; BARBOSA, M.A. Biosynthesis of highly pure poly- γ -glutamic acid for biomedical application. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 23, p. 1583-1591, 2012.

PORTILLA-ARIAS, J.A.; GARCÍA-ALVAREZ, M.; ILARDUYA, A.M.; MUNÓZ-GUERRA, S. Thermal decomposition of microbial poly(γ -glutamic acid) and poly(γ -glutamate)s. **Polymer Degradation and Stability**, v. 92, p. 1916-1924, 2007.

RATHMANN, R.; BENEDETTI, O.; PLÁ, J.A.; PADULA, A.D. I Congresso da Rede Brasileira de Tecnologia do Biodiesel, 2006.

RICHARD, A.; MARGARITIS, A. Optimization of cell growth and poly(glutamic acid) production in batch fermentation by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 465-468, 2003a.

RICHARD, A.; MARGARITIS, A. Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly-(γ -glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. **Biotechnol Bioeng**, v. 82, p. 299-305, 2003b.

SAHM, H.; EGGELING, L.; EIKMANN, B.; KRAMER, R. Metabolic desing in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, p. 243-252, 1995.

SATO, S. Produção de Aminoácidos. IN: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; Borzani, W.; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e enzimáticos (1ª Ed). **São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA**, v. 3, p. 155-177, 2001.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica. **Ed. Edgard Blücher**, v. 2 , cap.10, 2001.

SHI, F.; XU, Z.; CEN, P. Efficient production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* ZJU-7. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 133, p. 271-281, 2006a.

SHI, F.; XU, Z.; CEN, P. Microbial production of natural poly amino acid. **Science in China Series B-Chemistry**, v. 50, p. 291-303, 2007.

SHI, F.; XU, Z.; CEN, P. Optimization of γ -polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis* ZJU-7 using a surface-response methodology. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 11, p. 251-257, 2006b.

SHIH, I-L.; VAN, Y-T. The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. **Bioresource Technology**, v. 79, p. 207-225, 2001.

SILVA, D.D.V.; CARVALHO, W.; CANILHA, L.; MANGILHA, I.M. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa. Parte 2: aminoácidos e vitaminas. **Rev. Analytica**, v. 19, p. 62-73, 2005.

SILVA, S.B. Produção e otimização de processo de obtenção de ácido γ -poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53. **Tese de doutorado**,

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Química, 2010.

SOMOGYI, M. Determination of blood sugar. **Journal of Biological Chemistry**, p. 160-169, 1945.

THORNE, C.B.; LEONARD, C.G. Isolation of D- and L-glutamyl polypeptides from culture filtrates of *Bacillus subtilis*. *Journal Biology Chemistry*, v. 233, p. 1109-1112, 1958.

TRYFONA, T.; BUSTARD, M.T. Fermentative production of lysine by *Corynebacterium glutamicum*: transmembrane transport and metabolic flux analysis. **Process Biochem**, v. 40, p. 499-508, 2005.

VASCONCELOS, Y. Glicerina, resíduo bem-vindo do biodiesel e as pesquisas em destaque. **Revista Fapesp**, edição 196, 2012.

WADA, M.; AWANO, N.; HAISA, K.; TAKAGI, H.; NAKAMORI, S. Purification, characterization and identification of cysteine desulfhydrase of *Corynebacterium glutamicum*, and its relationship to cysteine production. **FEMS Microbiology Letters**, v. 217, p. 103-107, 2002.

WANG, Q.; CHEN, S.; ZHANG, J. SUN, M.; LIU, Z. YU, Z. Co-producing lipopeptides and poly- γ -glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3318-3323, 2008.

WIKIPÉDIA. **Melaço**. Disponível em: <
<http://pt.wikipedia.org/wiki/Mela%C3%A7o>>. Acesso em: 01 dez 2013.

WU,Q.; XU,H.; YING, H.; OUYANG,P. Kinetic analysis and pH-shift control strategy for poly(γ -glutamic acid) production with *Bacillus subtilis* CGMCC 0833. **Biochemical Engineering Journal**, v. 50, p. 24-28, 2010.

YAO, H.M.; TIAN, Y.C.; TADÉ, M.O.; ANG, H.M. Variations and modeling of oxygen demand in amino acid production. **Chemical Engineering and Processing**, v. 40, p. 401-409, 2001.

YAO, J.; JING, J.; XU, H.; LIANG, J.; WU, Q.; FENG, X.; OUYANG, P. Investigation on enzymatic degradation of γ -polyglutamic acid from *Bacillus subtilis* NX-2. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, p. 158-164, 2009.

ZHANG, D.; XU, Z.; XU, H.; FENG, X.; LI, S.; CAI, H.; WEI, Y.; OUYANG, P. Improvement of poly(γ -glutamic acid) biosynthesis and quantitative metabolic flux analysis of a two-stage strategy for agitation speed control in the culture of *Bacillus subtilis* NX-2. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 16, p. 1144-1151, 2011.

8. Anexos

8.1. Artigo 1: Food and Public Health

(ISSN 2162-9412, vol. 3, p. 28-36, N. 1, 2013)

The Existing Studies on Biosynthesis of Poly(γ -glutamic acid) by Fermentation

Luana P. Moraes, Priscila N. Brito, Ranulfo M. Alegre

Laboratory of Fermentation Processes and Wastewater Treatment/Dea/Fea (School of Food Engineering)/Unicamp
(University of Campinas)
Cidade Universitária "Zeferino Vaz", R. Monteiro Lobato, 80; 13083-862, Campinas, SP, Brazil

Abstract Poly(γ -glutamic acid) known as γ -PGA, is a polymer that releases the nonessential amino acid glutamic acid upon hydrolysis. The application of poly(γ -glutamic acid) has increased in past year, as has the research to optimise its production methods with less-expensive processes, for example, the use of new substrate carbon and nitrogen sources for the fermentation processes. The following work reports the study of different fermentation processes for γ -PGA production and their implementation with regard to the fermentation and nutritional requirements of the studied microorganisms.

Keywords Poly(γ -glutamic acid), Fermentation, *Bacillus*, Biosynthesis, Nutritional Requirements

1. Introduction

Several authors report that Ivánovics et al. (1937) discovered γ -PGA as the component of the *Bacillus anthracis* capsule [1]-[4]. Later, γ -PGA was identified in other *Bacillus* species, and Bovarnick showed in 1942 that γ -PGA was produced in a culture broth by *Bacillus subtilis* as a submerged fermentation (Smf) and solid-state fermentation (SSF) product [5]; the polymer has been well studied since.

Although biopolymers formed by the union of amino acids are very similar to proteins, not being proteins, they do not have a specific sequence. Rather, they comprise a single amino acid that form polymers having molecular masses as widely diverse as those of polysaccharides [6]. These polymers can be produced by fermentation. For example, γ -PGA is present in natto, a traditional Japanese food prepared using soybeans fermented by *Bacillus* strains; the γ -PGA and polysaccharides are found on the bean surface [6].

The γ -PGA from natto consists of 50 - 80 % D- and 20 - 50 % L-glutamate as the main component of the viscous extracellular (bacterial) materials [7],[8]. The natto contains

megaterium, *Bacillus amyloliquefaciens* [5],[15],[16] and a few other organisms [17],[18].

However, problems have been reported in the γ -PGA production by *Bacillus licheniformis* 9945a: after repeated cultivation, the strain degenerates to a non-PGA-producing strain, causing different results in the γ -PGA productivity and fermentation kinetics [16],[19]. Birrer et al. solved this problem in 1994 using cryogenically frozen vegetative cells [20].

The biosynthesis of γ -PGA in bacteria is performed in two steps: in the first step, L- and D-glutamic acid are synthesised, and these glutamic acid units are joined together in the second step [1],[21].

The units of D- and L- glutamic acid are connected by amide linkages between the α -amino and γ -carboxylic acid [2],[4],[6],[10],[11],[22]-[25]. The γ -PGA polymer can be characterised by its molecular mass and the relationship between the D- and L- glutamic acid monomers and the carboxyl group (α - or γ -) connected to the peptide [26]. The structural framework is shown in Figure 1.

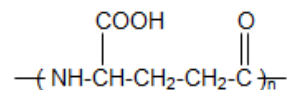


Figure 1. Structure of γ -PGA [3]

* Corresponding author:

luanapdmoraes@yahoo.com.br (L. P. Moraes)

Published online at <http://journal.sapub.org/fph>

Copyright © year Scientific & Academic Publishing. All Rights Reserve

polysaccharide-containing mucin (levan-form fructan) in addition to γ -PGA [3],[6],[9]-[11], and the consumption of natto is associated with reduced bone loss in postmenopausal Japanese women [12].

The aim of this review is discuss several of the recent developments in the application of *Bacillus* species for the production of γ -PGA. γ -PGA is biopolymer anionic, biodegradable, water-soluble with different applications and has effect on human health. In this review, the various works are briefly described. The main features and mechanisms of the γ -PGA synthesis and the results are discussed.

2. The γ -PGA synthesis

γ -PGA is synthesised by Gram-positive bacteria [13] and is produced as a polymer outside of the cell [4],[5],[14] by several *Bacillus* species, particularly wild-type isolates, including *Bacillus subtilis* IFO3335 [3], *Bacillus licheniformis*, *Bacillus*

There are two types of PGA, γ -PGA and α -PGA, which are composed of glutamic acids joined by γ or α linkages, respectively. Although α -PGA can be obtained by chemical synthesis, γ -PGA is produced only by microbial fermentation [27].

γ -PGA has a structure of 5,000 - 10,000 units of D- and L-glutamic acid that generates a highly viscous solution when it accumulates in the culture medium [28],[29] with a maximum viscosity observed under conditions of neutral pH [30] and no salt [31]. However, an increase in the viscosity reduces the volumetric oxygen mass transfer, leading to insufficient cell growth and a decrease in γ -PGA yields [32]. Published data have shown that there are several γ -PGA producers and that their respective γ -PGA polymers differ in molecular size and stereochemical composition [22]. Furthermore, the molecular size changes with the salt concentration in the culture medium: γ -PGA is produced at comparatively low molecular masses in media containing high concentrations of NaCl [32].

Approximately equal amounts of D- and L- units are present in naturally produced γ -PGA [33]. According to the existing literature, γ -PGA can contain L-glutamate or D-glutamate alone or both enantiomers [34]. It is likely that the enantiomers concentrations depend on the bivalents cations that are present in the culture medium [35].

In general, the production of γ -PGA by fermentation has been well studied [9],[28],[30],[36]-[38].

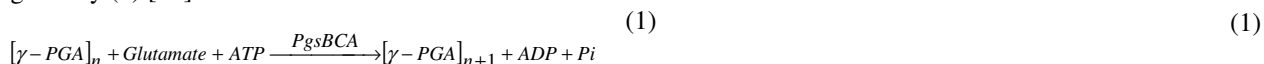
3. Enzymes involved in γ -PGA production

Several studies have been conducted to identify the enzymes of the γ -PGA biochemical pathway to increase productivity [24], and reports have shown that the key step is the production of 2-oxoglutarate, the precursor of L-glutamic acid [36], which is synthesised via glycolysis and the tricarboxylic acid cycle [24]. A transglutaminase has been reported to be involved in γ -PGA production in *Bacillus subtilis* NR-1 [39], however transglutaminase involvement has not been found in some other works [6]. Glutamate racemase is an important enzyme in γ -PGA synthesis, as it is involved in the production of the substrate, more specifically in the supply of D-glutamate [32].

In γ -PGA producing *Bacillus subtilis*, the production of abundant DL-glutamate occurs via glutamate racemase [22].

Figure 2 shows γ -PGA production, whereby L-glutamic acid is produced from citric acid, which reacts to form isocitric acid; isocitric acid then reacts to form the α -ketoglutarate of the tricarboxylic acid cycle (TCA). Thus, glutamic acid is used to form γ -PGA, and a large amount of the polymer is produced from citric acid and ammonium sulphate [6].

The *pgsBCA* genes are responsible for the synthesis of γ -PGA, with the *PgsBCA* system encoding the sole catalytic activity for γ -PGA synthesis. The polymerisation reaction in vitro is given by (1) [40]:



γ -PGA can be produced by fermentation in the presence and absence of L-glutamine. The formation of L-glutamic acid in the absence of glutamine occurs via glutamate dehydrogenase (GD). In this case, α -ketoglutaric acid and ammonium sulphate form L-glutamic acid, a process catalysed by GD [1].

In the presence of L-glutamine, glutamine synthetase (GS) and glutamine-2-oxoglutarate aminotransferase (GOGAT) are utilised for the formation of L-glutamic acid. GOGAT catalyses the reaction between L-glutamine and α -ketoglutaric acid, with the regeneration of glutamine from L-glutamic acid and ammonium sulphate by GS [4]. D-glutamic acid is produced by the indirect conversion of L-glutamic acid [1].

γ -PGA is one of the few naturally occurring polyamides that is not synthesised by ribosomal protein biosynthesis but is synthesised by enzymatic processes [41].

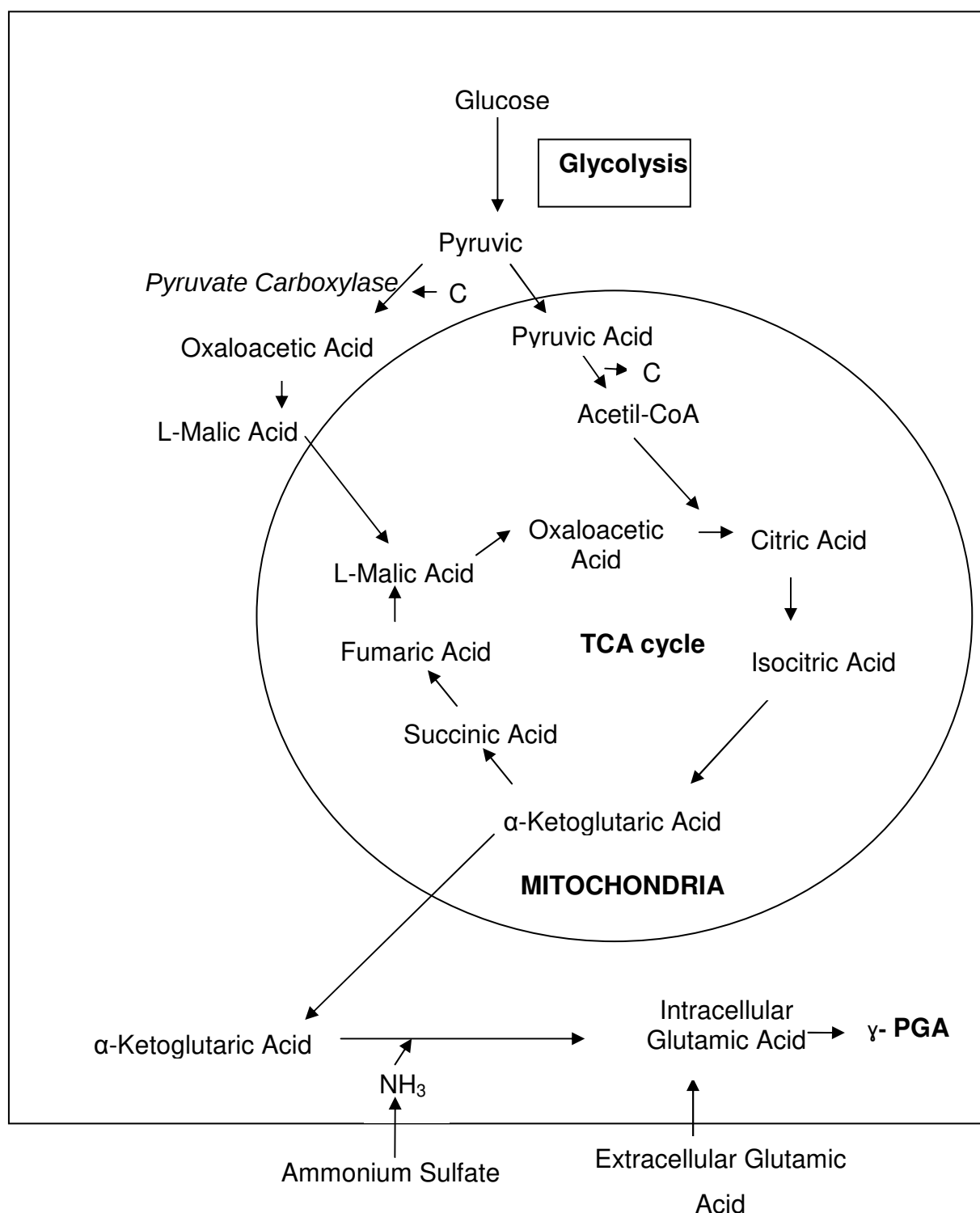


Figure 2. Biochemical pathway of γ -PGA production and some modifications [3]

4. Nutritional requirements for different *Bacillus* species

Several parameters that affect the γ -PGA yield and molecular weight have been investigated, for example, the composition of the culture medium, *Bacillus* species, fermentation conditions, viscosity and mode of reactor feeding [37]. Additionally, owing to the presence of the enzymes that catalyze

the in situ depolymerisation of γ -PGA, polyglutamyl hydrolase (PGA hydrolase), the final molecular weight of γ -PGA can decrease as the fermentation time increases [9].

The γ -PGA-producing bacteria have different nutritional requirements for γ -PGA production [3],[6]. The bacteria can require different carbon sources, and others require specific nitrogen sources, though many of these bacteria do not require glutamic acid; conversely, other bacteria grow only in the presence of glutamic acid [6] or require biotin [6]. It was found that glutamic acid was not incorporated in the γ -PGA chain when it was added to the medium and that only the glutamic acid moiety produced from citric acid and ammonium sulphate was utilised [9], whereas the addition of L-glutamate significantly stimulated γ -PGA production, and highly elongated chains were synthesised [32].

The Mg^{+2} ion was essential for *Bacillus licheniformis* to synthesise γ -PGA and could not be replaced by other divalent cations, such as Mn^{+2} [19]. However, Gross et al. showed that both the stereochemical composition and yield of the polymer were affected by the Mn^{+2} concentration [33].

The concentration of Mn^{+2} can influence the configuration of the glutamic acid in γ -PGA produced by *Bacillus subtilis*. γ -PGA is composed of 80 % or more of the D-isomer when the growth medium is composed of a high concentration of Mn^{+2} ; at a low concentration of Mn^{+2} , the proportion of the D-isomer is approximately 40 % [16].

γ -PGA increases the Ca^{+2} solubility that is associated with reduced bone loss in post-menopausal women [42] and is, thus, important in the treatment of osteoporosis [22].

The microbial biomass and γ -PGA production using the nitrogen and other nutrients contained in manure liquid as the substrate and the utilisation of the ammonium nitrogen for the production of nitrogen-containing biopolymers would provide a good use of the ammonium and nutrients presents in swine waste [43]. Other such residues used in γ -PGA production include soybean and sweet potato residues by solid-state fermentation, which are rich in proteins, carbohydrates and other nutrients [44].

One important fact is the remarkable resistance of γ -PGA to the proteolytic attack of its structural features [22]. Indeed, the degradation of γ -PGA by non-adapted microflora is expected to be very slow, which should result in a continuously low rate of free-ammonium release [43].

5. Characteristics and possible applications

γ -PGA is an anionic, biodegradable, water-soluble biopolymer [2],[21],[25],[45],[46] that is edible and non-toxic to humans or the environment [4],[37],[38],[45]. Its characteristics enable wide applications as a biodegradable thickener, humectant, sustained-release material, chemical vehicle in the food, cosmetic, medicine [21],[43] and pharmaceutical industries [24], cryoprotectant, curable biological adhesive, biodegradable fibre and biopolymer flocculant [4],[21]. γ -PGA has been suggested for medical applications in addition to drug delivery, namely as a biological glue [47],[47]. It is important to note that the γ -PGA polymers with different stereochemical composition have different applications: γ -PGA with a high content of L-glutamate is used for cosmetics due to its skin compatibility, and γ -PGA with a high content of D-glutamate is used because it degrades more slowly [49].

γ -PGA and its derivatives can be used as potential substitutes for petroleum-based hydrogels and thermoplastic polymers because it is highly water absorbent and biodegradable [50]. There are many studies concerned with modifying the chemical reactions with γ -PGA for the production of hydrogels and thermoplastic polymers. For example, the esterification of the carboxyl groups of γ -PGA produced esters that are thermoplastic [8], and a γ -PGA hydrogel has been produced through the γ -irradiation of aqueous solutions [50].

Various chemically modified derivatives have been developed for the extension of the polymer utility as an environmentally important substitute for hydrogels or non-biodegradable thermoplastics [7],[50].

Another interesting application was proposed by Hoppensack et al. who studied the conversion of the nitrogen content in liquid manure into biomass and γ -PGA by the newly isolated *Bacillus licheniformis*. These authors observed that, when the extensive spreading of liquid manure onto agricultural fields occurred, eutrophication of the ground and surface water and pollution of the atmosphere also occurred due to the high ammonium nitrogen content. The proposed solution was the production of biomass and γ -PGA in batch cultivations with swine manure and an optimised mineral salt medium using *Bacillus licheniformis* because of its ability to utilise the nitrogen source. For example, a reduction of the

ammonium content in the liquid manure from 2.83 to 0.1 g/l and the production of 0.16 g/l γ -PGA and 7.5 g cell dry mass/l were observed within 410 h. In this case, the liquid manure was modified by adding 18 g citrate and 80 g glycerol/l, producing a carbon to nitrogen ratio of 15.5:1. Approximately 33 % (w/v) of the original ammonium was lost by stripping [43].

The production of γ -PGA by *Bacillus subtilis* ZJU-7 isolated from fermented bean curd, a traditional Chinese food, was reported by Shi et al. in 1996. The production reached 58.2 g/l in a culture medium containing 81.05 g/l L-glutamic acid, 59.8 g/l sucrose and 53.54 g/l tryptone at 37 °C for 24 h [10].

Published data showed that the γ -PGA production by *Bacillus licheniformis* 9945a is affected by the concentrations of salt, glycerol, citric acid and L-glutamic acid and the ions Mn^{+2} and Ca^{+2} . The production reached 15.4 g/l in a culture medium containing 20 g/l L-glutamic acid, 12 g/l citric acid and 80 g/l glycerol, pH adjusted to 7.4 with NaOH, with the fermentation occurring for 2 - 3 days [24].

Goto and Kunioka (1992) studied the biosynthesis and hydrolysis of γ -PGA using *Bacillus subtilis* IFO 3335, a strain that requires biotin as a nutrient, and observed that there was no production of γ -PGA in a medium without L-glutamic acid. By adding citric acid as the carbon source in a medium containing L-glutamic acid and ammonium sulphate, a large amount of γ -PGA was produced (9.6 g/l) without the appearance of by-products, whereas a by-product that appeared to be a polysaccharide was generated when glucose was used as the carbon source in a medium with glutamic acid. When it is not added carbon source, but using L-malic acid, succinic acid or fumaric acid in the culture medium with glutamic acid, the γ -PGA was hardly produced and by-product predominated. It was reported that the cells did not grow when using acetic acid as the carbon source in a culture medium with glutamic acid [3].

After the production of γ -PGA, they studied its hydrolysis in aqueous solutions using different temperatures (80, 100 and 120 °C) and observing the time dependence of the changes in the molecular weight. These authors observed that the hydrolytic degradation of γ -PGA was found to proceed through a random chain scission: at the highest temperature, faster and smaller molecules were obtained in a shorter time interval [3].

Li et al. produced γ -PGA in large amounts (34.1 g/l) using *Bacillus subtilis* CGMC 2108 in a culture

medium containing sodium glutamate at a concentration of 40 - 60 g/l [52].

According to the existing literature, the γ -PGA was produced by *Bacillus subtilis* in batch fermentation using a medium with glycerol (20 g/l) as the carbon source supplemented with glutamic and citric acid, yielding 23 g/l after 30 h. This work was based on the fact that the addition of glycerol to the medium and the control of the pH have been shown to increase the carbon γ -PGA yield, findings that have not been studied in *Bacillus subtilis*. It was shown that, in a medium without glycerol supplementation with glutamic and citric acids, the maximum biomass and γ -PGA concentrations occurred at the initial pH values of 6.5 and 7.0 after 50 h of fermentation. When the initial pH was 6 or 8, the maximum biomass and γ -PGA production occurred after 90 h of fermentation in the same medium. Based on these results, a new study was conducted using glycerol in different concentrations, with the observation that the addition of glycerol had a positive effect on the maximum γ -PGA yield (23 g/l) after 30 h [37].

Bajaj and Singhal (2009) studied the effect of the addition of different amino acids and the acids of the tricarboxylic acid cycle as intermediate metabolic precursors for γ -PGA production in *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. When the medium contained 0.5 mM L-glutamine and 10 mM α -ketoglutaric acid, the maximum yield was 35.75 g/l γ -PGA, whereas the maximum yield was 26.12 g/l γ -PGA in a medium without metabolic precursors. The medium culture was composed of glycerol, citric acid, L-glutamic acid, ammonium sulphate and other components. The initial pH was adjusted to 6.5, and the fermentation occurred for 96 h on a rotary shaker at 200 rpm and 37 ± 2 °C [1].

Table 1 and 2 show the comparison between the different research conducted on the production of γ -PGA.

Table 1. Different studies performed for γ -PGA production

References	Strain	Main nutrients (g/l)	F. T. (°C)	initial pH	F. t. (h)	γ -PGA (g/l)
[50]	<i>Bacillus subtilis</i> ZJU-7	Yeast extract, L-glutamate, glucose, NaCl, CaCl ₂ , MgSO ₄ , MnSO ₄ ·7H ₂ O.	37	6.5	-	101.1
[45]	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> C1	Soybean cake, corn flour, monosodium glutamate production residues, wheat bran, rapeseed cake, citric acid, MgSO ₄ ·7H ₂ O, MnSO ₄ ·H ₂ O.	37	-	48	0.0437*
[2]	<i>Bacillus subtilis</i> ZJU-7	Glucose, tryptone, peptone, ammonium sulphate, yeast extract (paste), yeast extract (powder), maize flour, fish protein concentrate, NaCl, CaCl ₂ , MgSO ₄ , L-glutamic acid.	37	6.5	48	46.4
	<i>Bacillus subtilis</i> ZJU-7		37	6.5	72	54.4
[52]	<i>Bacillus subtilis</i> CGMCC N ^o 2108	Dextrose; yeast extract; potassium acid; phosphate; bitter salt.	37	7.0	48 - 60	34.1
[53]	<i>Bacillus subtilis</i> BL53	L-glutamic acid, 20; citric acid, 12; glycerol, 80; NH ₄ Cl, 7; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.5; FeCl ₃ ·6H ₂ O, 0.04; K ₂ HPO ₄ , 0.5; CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.15; MnSO ₄ ·H ₂ O, 0.04; ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0.35; 1.22 mM of Zn ⁺² .	37	6.9	96	10.4
[54]	<i>Bacillus subtilis</i> BL53	Citric acid, 12; glycerol residue, 97; NH ₄ Cl, 7; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.5; FeCl ₃ ·6H ₂ O, 0.04; K ₂ HPO ₄ , 0.5; CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.15; MnSO ₄ ·H ₂ O, 0.04; ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0.35; 1.22 mM of Zn ⁺² ; 3 % p/v cheese whey protein.	37	7.0	96	2.8
[1]	<i>Bacillus licheniformis</i> NCIM 2324	Glycerol, 62.4; citric acid, 15.2; L-glutamic acid, 20; ammonium sulphate, 8; K ₂ HPO ₄ , 1; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.5; CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.2; MnSO ₄ ·7H ₂ O, 0.05.	37	6.5	96	26.12
	<i>Bacillus licheniformis</i> NCIM 2324	Glycerol, 62.4; citric acid, 15.2; L-glutamic acid, 20; ammonium sulphate, 8; K ₂ HPO ₄ , 1; MgSO ₄ ·7H ₂ O, 0.5; CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.2; MnSO ₄ ·7H ₂ O, 0.05; 0.5 mM L-glutamine; 10 mM α -ketoglutaric acid.	37	6.5	96	35.75

F. T., fermentation temperature; F. t., fermentation time.

*gram γ -PGA per gram of substrate.

Table 2. Different studies performed for γ -PGA production

References	Strain	Main nutrients (g/l)	F. T. (°C)	initial pH	F. t. (h)	γ -PGA (g/l)
[24]	<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 9945a	Glutamine, 20; glycerol, 80; citric acid, 12; L-glutamic acid, 20; NH ₄ Cl, 7; MgSO ₄ , 0.5; FeCl ₃ , 0.04; K ₂ HPO ₄ , 0.5.	-	7.4	96	17 - 23
	<i>Bacillus subtilis</i> IFO3335					
	<i>Bacillus subtilis</i> TAM-4	Glutamine, 30; citric acid; 20.	-	-	48	10-20
		Fructose, 75; NH ₄ Cl, 18.	-	-	96	22
	<i>Bacillus subtilis</i> F-2-01	Glutamine, 70; glucose, 1.	-	-	96	48
	<i>Bacillus subtilis</i> ZJU-7					
		Sucrose, 60; Glutamine, 80; tryptone, 60; L-glutamic acid, 80.	37	-	24	54.4
[11]	<i>Bacillus subtilis</i> ZJU-7	Sucrose, 59.8; tryptone, 53.54; L-glutamic acid, 81.05; NaCl, 10; MgSO ₄ .7H ₂ O, 1; CaCl ₂ , 1.	37	7	24	58.2
[10]	<i>Bacillus subtilis</i>	Sucrose, 60; tryptone, 60; L-glutamic acid, 80; NaCl, 10.	37	-	24	54.4
[37]	<i>Bacillus subtilis</i> IFO3335	Glycerol, 20; L-glutamic acid, 30; citric acid, 20; (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10; K ₂ HPO ₄ , 1; Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O, 1; MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.5; FeCl ₃ . 6H ₂ O, 0.05; CaCl ₂ .2H ₂ O, 0.2; MnSO ₄ .H ₂ O, 0.02; biotin, 0.0005.	37	7	30	23
[43]	<i>Bacillus licheniformis</i>	Liquid manure; citrate, 18; glycerol, 80.	30	-	-	0.16
[55]	<i>Bacillus subtilis</i> TAM-4	Ammonium chloride, 1.8 %; fructose, 7.5 %; K ₂ HPO ₄ , 0.15 %; MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.035 %; MnSO ₄ .5H ₂ O, 0.005 %; CaCO ₃ , 3 %.	30	7	96	22.1
[14]	<i>Bacillus subtilis</i> F-2-1	L-glutamic acid, 15 %; veal infusion broth, 2 %; glucose, 0.1 %.	37	-	96	45.5
[3]	<i>Bacillus subtilis</i> IFO3335	L-glutamic acid; 0 – 5; ammonium sulphate; 0-2; citric acid, 2; K ₂ HPO ₄ , 0.1; Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O, 0.1; MgSO ₄ .7H ₂ O, 0.05; MnSO ₄ .nH ₂ O, 0.002; FeCl ₃ . 6H ₂ O, 0.005; CaCl ₂ , 0.02; biotin, 50 μ g.	37	7.5	70	9.6

F. T., fermentation temperature; F. t, fermentation time.

6. Conclusions

This review showed that there are different methods of producing γ -PGA and that important consideration include the choice of microorganism and the different nutritional requirements and fermentation conditions. The large number of γ -PGA applications have been the impetus for many studies regarding its production. We also discussed the interesting alternative of the use of industrial residues to produce γ -PGA, a compound of interest to various industries and of environmental benefit.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the CNPq for the PhD scholarship and for funding this project.

REFERENCES

- [1] Ishwar B Bajaj, Rekha S Singhal, "Enhanced production of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by using metabolic precursors", Appl. Biochem. Biotechnol., vol.159, no. 1, pp. 133-141, 2009.
- [2] Jie Chen, Feng Shi, Bin Zhang, Fan Zhu, Weifeng Cao, Zhinan Xu, Guohua Xu, Peilin Cen, "Effects of cultivation conditions on the production of γ -PGA with *Bacillus subtilis* ZJU-7", Appl. Biochem. Biotechnol., vol. 160, no. 2, pp. 370-377, 2010.
- [3] Atsuo Goto, Masao Kunioka, "Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335", Biosci. Biotech. Biochem., vol. 56, no. 7, pp. 1031-1035, 1992.
- [4] Ing-Lung Shih, Yi-Tsong Van, "The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications", Bioresource Technology, vol. 79, no. 3, pp. 207-225, 2001.
- [5] M Bovarnick, "The formation of extracellular D(-)-glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*", J. Biol. Chem., vol. 145, no. 2, pp. 415-424, 1942.
- [6] Masao Kunioka, "Biosynthesis and chemical reactions of poly(amino acid)s from microorganisms", Appl. Microbiol. Biotechnol, vol. 47, no. 5, pp. 469-475, 1997.
- [7] Makoto Ashiuchi, Kenji Soda, Haruo Misono, "A poly- γ -glutamate synthetic system of *Bacillus subtilis* IFO 3336: Gene cloning and biochemical analysis of poly- γ -glutamate produced by *Escherichia coli* Clone Cells", Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 263, no. 1, pp. 6-12, 1999.
- [8] Hidetoshi Kubota, Toshio Matsunobu, Kazumichi Uotani, Hidehi Takebe, Atsuyuki Satoh, Toshio Tanaka, Makoto Taniguchi, "Production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* F-2-01", Biosci. Biotechnol. Biochem., vol. 57, no. 7, pp. 1212-1213, 1993.
- [9] Masao Kunioka, Atsuo Goto, "Biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335", Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 40, no. 6, pp. 867-872, 1994.
- [10] Feng Shi, Zhinan Xu, Peilin Cen, "Efficient Production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* ZJU-7", Applied Biochemistry and Biotechnology, vol. 133, no. 3, pp. 271-281, 2006.
- [11] Feng Shi, Zhinan Xu, Peilin Cen, "Optimization of γ -polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis* ZJU-7 using a surface-response methodology", Biotechnology and Bioprocess Engineering, vol. 11, no. 3, pp. 251-257, 2006.
- [12] Yukihiro Ikeda, Masayuki Iki, Akemi Morita, Etsuko Kajita, Sadanobu Kagamimori, Yoshiko Kagawa, Hideo Yoneshima, "Intake of fermented soybeans, Natto, is associated with reduced bone loss in postmenopausal women: Japanese population-based osteoporosis (JPOS) study", Journal of Nutrition, vol.136, no. 5, pp. 1323-1328, 2006.
- [13] Jun Yao, Jin Jing, Hong Xu, Jinfeng Liang, Qun Wu, Xiaohai Feng, Pingkai Ouyang, "Investigation on enzymatic degradation of γ -polyglutamic acid from *Bacillus subtilis* NX-2", Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, vol. 56, no. 2-3, pp. 158-164, 2009.

- [14] Hidetoshi Kubota, Yoko Nambu, Takshi Endo, "Convenient and quantitative esterification of poly(γ -glutamic acid) produced by microorganism", *Journal of polymer science*, vol. 31, no. 11, pp. 2877-2878, 1993.
- [15] Margarita Kambourova, Martin Tangney, Fergus G Priest, "Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 67, no. 2, pp. 1004-1007, 2001.
- [16] Curtis B Thorne, C Gomez Leonard, "Isolation of D- and L-glutamyl polypeptides from culture filtrates of *Bacillus subtilis*", *J. Biol. Chem.*, vol. 233, no. 5, pp. 1109-1112, 1958.
- [17] F F Hezayen, B H A Rehm, R Eberhardt, A Steinbuchel, "Polymer production by two newly isolated extremely halophilic archaea: application of novel corrosion-resistant bioreactor", *Appl Microbiol Biotechnol*, vol. 54, no. 3, pp. 319-325, 2000.
- [18] F F Hezayen, B H A Rehm, BJ Tindall, A Steinbuchel, "Transfer of *Natrialba asiatica* BIT to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented member of the *Archaea* from Egypt that produces extracellular poly(glutamic acid)", *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 51, no. pt. 3, pp. 1133-1142, 2001.
- [19] Frederic A Troy, "Chemistry and biosynthesis of the poly(γ -D-glutamyl) capsule in *Bacillus licheniformis*. I. Properties of the membrane-mediated biosynthetic reaction", *J. Biol. Chem.*, vol. 248, no. 1, pp. 305-315, 1973.
- [20] Gregory A Birrer, Anne-Marie Cromwick, Richard A Gross, " γ -Poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a: physiological and biochemical studies", *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 16, no. 5, pp. 265-275, 1994.
- [21] Ishwar B Bajaj, Rekha S Singhal, "Poly (glutamic acid) - An emerging biopolymer of commercial interest", *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 10, pp. 5551-5561, 2011.
- [22] Makoto Ashiuchi, Haruo Misono, "Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis", *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 59, no. 1, pp. 9-14, 2002.
- [23] A C Chibnall, MW Rees, F M Richards, "Structure of the polyglutamic acid from *Bacillus subtilis*", *Biochem. J.*, vol. 68, no. 1, pp. 129-135, 1958.
- [24] Feng Shi, Zhinan Xu, Peilin Cen, "Microbial production of natural poly amino acid", *Science in China Series: Chemistry*, vol. 50, no. 3, pp. 291-303, 2007.
- [25] Dan Zhang, Zongqi Xu, Hong Xu, Xiaohai Feng, Sha Li, Heng Cai, Yan Wei, Pingkai Ouyang, "Improvement of poly(γ -glutamic acid) biosynthesis and quantitative metabolic flux analysis of a two-stage strategy for agitation speed control in the culture of *Bacillus subtilis* NX-2", *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, vol. 16, no. 6, pp. 1144-1151, 2011.
- [26] Joerg M Buescher, Argyrios Margaritis, "Microbial biosynthesis of polyglutamic acid biopolymer and applications in the biopharmaceutical, biomedical and food industries", *Critical Reviews in Biotechnology*, vol. 27, no. 1, pp. 1-19, 2007.
- [27] Hiroyuki Tanimoto, Masato Mori, Masao Motoki, Kunio Torii, Motoni Kadowaki, Tadashi Noguchi, "Natto mucilage containing poly- γ -glutamic acid increases soluble calcium in the rat small intestine", *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, vol. 65, no. 3, pp. 516-521, 2001.
- [28] Jin H Do, Ho N Chang, Sang Y Lee, "Efficient recovery of γ -poly (glutamic acid) from highly viscous culture broth", *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 76, no. 3, pp. 219-223, 2001.
- [29] Makoto Taniguchi, Kouji Kato, Ayako Shimauchi, Xu Ping, Ken-ichi Fujita, Toshio Tanaka, Yutaka Tarui, Eiji Hirasawa, "Physicochemical properties of cross-linked poly- γ -glutamic acid and its flocculating activity against kaolin suspension", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 99, no. 2, pp. 130-135, 2005.
- [30] Anne-Marie Cromwick, Gregory A Birrer, Richard A Gross, "Effects of pH and aeration on γ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* in controlled batch fermentor cultures", *Biotechnology Bioengineering*, vol. 50, no. 2, pp. 222-227, 1996.
- [31] Yoshihiro Ogawa, Fumio Yamaguchi, Katsumi Yuasa, Yasutaka Tahara, "Efficient production of γ -polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* (natto) in jar fermenters", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 61, no. 10, pp. 1684-1687, 1997.

- [32] M Ashiuchi, T Kamei, D H Baek, S Y Shin, M H Sung, K Soda, T Yagi, H Misono, "Isolation of *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*), a poly- γ -glutamate producer with high genetic competence", Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 57, no. 5-6, pp. 764-769, 2001.
- [33] R A Gross, Biopolymers from renewable resources, ed. D. L. Kaplan, Springer, chapter 8, 1998.
- [34] Thomas Candela, Agnès Fouet, "Poly-gamma-glutamate in bacteria", Molecular Microbiology, vol. 60, no. 5, pp. 1091-1098, 2006.
- [35] C Gomez Leonard, Riley D Housewright, Curtis B Thorne, "Effects of some metallic ions on glutamyl polypeptide synthesis by *Bacillus subtilis*", The Journal of Bacteriology, vol. 76, no. 5, pp. 499-503, 1958.
- [36] Young H Ko, Richard A Gross, "Effects of glucose and glycerol on γ -poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a", Biotechnol. Bioeng., vol. 57, no. 4, pp. 430-437, 1998.
- [37] Andrew Richard, Argyrios Margaritis, "Optimization of cell growth and poly(glutamic acid) production in batch fermentation by *Bacillus subtilis*", Biotechnology Letters, vol. 25, no. 6, pp. 465-468, 2003.
- [38] Sung H Yoon, Jin H Do, Sang Y Lee, Ho N Chang, "Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*", Biotechnol. Letters, vol. 22, no. 7, pp. 585-588, 2000.
- [39] Yoshihiro Ogawa, Hiroshi Hosoyama, Mitsutoshi Hamano, Hiroshi Motai, "Purification and properties of γ -glutamyltranspeptidase from *Bacillus subtilis* (*natto*)", Agricultural and Biological Chemistry, vol. 55, no. 12, pp. 2971-2977, 1991.
- [40] Massimiliano Marvasi, Pieter T Visscher, Lilliam C Martinez, "Exopolymers (EPS) from *Bacillus subtilis*: polymers and genes encoding their synthesis, FEMS Microbiol. Lett., vol. 313, no. 1, pp. 1-9, 2010.
- [41] Fred B Oppermann-Sanio, Alexander Steinbüchel, "Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production, Naturwissenschaften, vol. 89, no. 1, pp. 11-22, 2002.
- [42] Hiroyuki Tanimoto, Tom Fox, John Eagles, Hitoshi Satoh, Hiroko Nozawa, Atsushi Okiyama, Yasushi Morinaga, Susan J Fairweather-Tait, "Acute effect of poly- γ -glutamic acid on calcium absorption in post-menopausal women", Journal of the American College of Nutrition, vol. 26, no. 6, pp. 645-649, 2007.
- [43] Astrid Hoppensack, Fred B Oppermann-Sanio, Alexander Steinbüchel, "Conversion of the nitrogen content in liquid manure into biomass and polyglutamic acid by a newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*", FEMS Microbiology Letters, vol. 218, no. 1, pp. 39-45, 2003.
- [44] Qijun Wang, Shouwen Chen, Jibin Zhang, Ming Sun, Ziduo Liu, Ziniu Yu, "Co-producing lipopeptides and poly-gamma-glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects", Bioresour. Technol., vol. 99, no. 8, pp. 3318-3323, 2008.
- [45] Xiaoyu Yong, Waseem Raza, Guanghui Yu, Wei Ran, Qirong Shen, Xingming Yang, "Optimization of the production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus amyloliquefaciens* C1 in solid-state fermentation using dairy manure compost and monosodium glutamate production residues as basic substrates", Bioresource Technology, vol. 102, no. 16, pp. 7548-7554, 2011.
- [46] Xiaoyu Yong, Yaqing Cui, Lihua Chen, Wei Ran, Qirong Shen, Xingming Yang, "Dynamics of bacterial communities during solid-state fermentation using agro-industrial wastes to produce poly- γ -glutamic acid, revealed by real-time PCR and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)", Appl. Microbiol. Biotechnol., vol. 92, no. 4, pp. 717-725, 2011.
- [47] Yuto Otani, Yasuhiko Tabata, Yoshito Ikada, "A new biological glue from gelatin and poly (L-glutamic acid)", Journal of Biomedical Materials Research, vol. 31, no. 2, pp. 158-166, 1996.
- [48] Yuto Otani, Yasuhiko Tabata, Yoshito Ikada, "Sealing effect of rapidly curable gelatin-poly (L-glutamic acid) hydrogel glue on lung air leak", Ann. Thorac. Surg., vol. 67, no. 4, pp. 922-926, 1999.
- [49] Feng Jiang, Gaofu Qi, Zhixia Ji, Shuling Zhang, Jun Liu, Xin Ma, Shouwen Chen, "Expression of *glr* gene encoding glutamate racemase in *Bacillus licheniformis* WX-02 and its regulatory effects on synthesis of poly- γ -glutamic acid", Biotechnol. Lett., vol. 33, no. 9, pp. 1837-1840, 2011.
- [50] Jin Huang, Yinming Du, Guohua Xu, Huili Zhang, Fan Zhu, Lei Huang, Zhihan Xu, "High yield and cost-effective production of poly(γ -glutamic acid) with *Bacillus subtilis*", Eng. Life Sci., vol. 11, no. 3, pp. 291-297, 2011.

- [51] Hyuk J Choi, Masao Kunioka, "Preparation conditions and swelling equilibria of hydrogel prepared by γ -irradiation from microbial poly(γ -glutamic acid)", *Radiat. Phys. Chem.*, vol. 46, no. 2, pp. 175-179, 1995.
- [52] Y Li, Y Meng, S Sun, Novel *Bacillus subtilis* useful for producing gamma polyglutamic acid with sufficient nutrition. Patent Number: CN 101109010-A, 23/01/2008; CN 101109010-B, 16/06/2010, 2010.
- [53] Suse B Silva, "Produção e otimização do processo de obtenção de ácido γ -poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53", Chemistry Eng. tesis, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, 2010.
- [54] Carolina M Schmaedecke, "Produção de ácido gama-poliglutâmico através do aproveitamento de soro de leite e de glicerol residual de biodiesel", Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, 2010.
- [55] Yoshihito Ito, Takesshi Tanaka, Tetsuo Ohmachi, Yoshihiro Asada, "Glutamic acid independent production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4", *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 60, no. 8, pp. 1239-1242, 1996.

8.2. Artigo 2: International Review of Chemical Engineering (IRECHE)

(ISSN 20135, vol. 4, p. 618-623, N. 6, 2012)

Optimisation of poly(γ -glutamic acid) production by *Bacillus velezensis* NRRL B – 23189 in liquid fermentation on molasses as carbon source without addition of glutamic acid

Luana P. Moraes¹, Ranulfo M. Alegre², Priscila N. Brito³

Abstract – Poly(γ -glutamic acid), also known as γ -PGA, is an extracellular polymer produced by microbial fermentation. It is water-soluble, edible, biodegradable, non-toxic towards human and environment and it has many available sites for conjugation of drugs and powerful ability to solubilize hydrophobic molecules. This work reports the application of molasses, citric acid and ammonium sulphate in the fermentation by *Bacillus velezensis* NRRL-23189 to produce γ -PGA and the detection of molasses consumption, without the use of glutamic acid as nutrient. Different concentrations of molasses, citric acid and ammonium sulphate were studied. The fermentations was agitated at 200 rpm at 27 °C, for 72 h with and initial pH 6.5 (NaOH 2N and HCl 2N). Spectrophotometric analyses were used to measure concentrations of γ -PGA and the residual sugar from molasses degradation. The maximum production of γ -PGA (g/l) was 4.82 g/l, in a medium with molasses (200 g/l), citric acid (12.5 g/l) and ammonium sulphate (8 g/l) in a fermentation that also resulted in the maximum sugar consumption. **Copyright © 2009 Praise Worthy Prize S.r.l. - All rights reserved.**

Keywords: *Bacillus*, molasses, poly(γ -glutamic acid), fermentation, biosynthesis, nutritional requirements.

I. INTRODUCTION

Poly(γ -glutamic acid), known as γ -PGA, is a biodegradable anionic polymer that is water-soluble [1]-[5] and non-toxic to humans and environment [2], [6], [7]. γ -PGA is polymerized via γ -amide linkages between α -amino and γ -carboxylic acid groups linking subunits of D- and L- glutamic acid [3]-[6], [8]-[10]. It was discovered by Ivánovics and co-workers discovered the compound in 1937 as a capsule of *Bacillus anthracis* [1], [12]. Later γ -PGA was identified in others *Bacillus spp.* as a fermentation product, for example *Bacillus subtilis* IFO 3335 [1], *Bacillus licheniformes*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* [12]-[13][14]. After reference [12] showed that γ -PGA was produced as a fermentation product in a culture broth by *Bacillus subtilis*, numerous studies were stimulated [10]. γ -PGA is secreted by the cell wall and form capsule during growth [15] and is also excreted into culture media [15], [16]. γ -PGA biosynthesis in bacteria is carried out in two steps. The first step is the synthesis of L- and D- glutamic acid, and in the second step, D- and L- glutamic acid units are joined together [17]. γ -PGA is mainly produced from citric acid and ammonium sulfhate (Figure 1).

It is presumed that L-glutamic acid is produced from citric acid through isocitric acid and α -ketoglutaric acid in the tricarboxylic acid cycle (TCA), and γ -PGA is polymerized from this glutamic acid.

A large amount of γ -PGA is thus produced from citric acid and ammonium sulfhate [10].

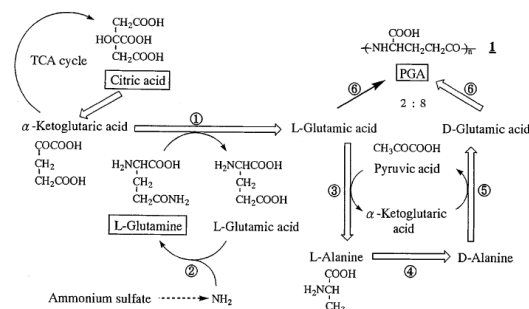


Fig. 1. γ -poly(glutamic acid) (PGA) synthesis in *Bacillus subtilis* IFO3335: 1 glutamine: 2-oxoglutarate aminotransferase; 2 glutamine synthetase; 3 L-glutamic acid: pyruvic acid aminotransferase; 4 alanine racemase; 5 D-glutamic acid: pyruvic acid aminotransferase; 6 PGA polymerase. TCA tricarboxylic acid [10].

γ -PGA's characteristics enable its wide application as a biodegradable thickener, humectants, substained release materials and drug carries in food, comestic, medicine [1], [10], [18] and pharmaceutical industries [3]. γ -PGA and its derivatives can potentially be used as substitutes of petroleum-based hydrogels and thermoplastic polymers because γ -PGA is highly water-absorvent and biodegradable [19].

γ -PGA production by bacteria has diverse nutritional requirements [1], [10]. Some microorganisms require different carbon source, others have unknown nitrogen source and many of these do not require glutamic acid. Other bacteria grow only in the presence of glutamic acid [10] and some require biotin to produce γ -PGA [1], [10]. Reference [1] found that glutamic acid was not assimilated when added to the medium. The glutamic acid subunit in γ -PGA is produced from citric acid and ammonium sulfhate. γ -PGA production is significantly induced by L-glutamate and the presence of l-glutamate results in the synthesis of highly elongated chains [20].

This paper reports the effect of molasses, citric acid and ammonium sulfhate concentrations on γ -PGA

production by *Bacillus velezensis* NRRL B – 23189 without the addition of glutamic acid in the fermentation medium. Molasses sugar consumption was also studied.

II. MATERIALS AND METHODS

II.1. Bacterial Strain and Medium

Bacillus velezensis NRRL B – 23189 from ARS Culture Collection (NRRL) was used in the study. BHI (brain heart infusion) with 20 g/l of bacteriological agar, both from Oxoid, was used for culture maintenance. Bacterial cells were incubated in agar slants at 32 °C for 48 h and stored at 4 °C.

A medium reported by Bajaj and co-authors (2009) was modified for use in γ -PGA production as follow (g/l): K_2HPO_4 , 1; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.2; $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05. The molasses, citric acid and ammonium sulphate concentrations used are shown in Table I. The initial pH was adjusted to 6.5 by using 6 N NaOH, 2 N NaOH and/or 2 N HCl. The medium was sterilized in an autoclave for 15 min at 121 °C.

II.2. Inoculum and Fermentation

The inoculum was produced as describe below. A loopful of cells from slant was collected and transferred to 50 ml of the BHI medium in a 250-ml conical flask and incubated at 32 °C and 200 rpm for 12 h in a shaking incubator (TECNAL, mod. TE 421).

Fermentation was carried out in 250-ml Erlenmeyer flasks, each containing 45 ml of the sterile production medium. The medium was inoculated with 10 % (v/v) of 12-h-old *Bacillus velezensis* NRRL 23189 culture containing approximately 2×10^{-3} g cells/ml BHI medium. The flasks were incubated for 72 h on a rotary

shaker at 27 ± 2 °C and 200 rpm. Each fermentation assay was repeated twice. The samples were collected at the end of 72 h fermentation for γ -PGA and residual sugar quantification.

III. SURFACE-RESPONSE METHODOLOGY

The surface-response methodology (SRM) was used to obtain a model for γ -PGA production and sugar consumption.

A Central Composite Design (CCD) was used to formulate a medium that provides optimal support for the γ -PGA production by *Bacillus velezensis*.

The factorial planning had 4 central points and yielded a total of 18 treatments. The factors or levels studied are described in Table I.

TABLE I
FACTORS AND LEVELS STUDIED IN CCD WITH 18

Factors	OBSERVATIONS		
	Factor level* ²		
	-1	0	+1
Molasses - 54 % TRS* ¹ (x1)	140.5	200	259.5
Citric Acid (x2)	5.06	12.5	19.94
Ammonium Sulfate (x3)	4	8	12

*¹TRS: Total reducing sugars.

*² Components (g/l).

The results were analyzed using Statistic 5.0 software.

When several factors are involved, the model can be expressed as follows:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^4 b_i x_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^4 \sum_{j=1}^4 b_{ij} x_i x_j$$

where b_0 , b_i , b_{ii} and b_{ij} are the intercept term, linear, quadratic coefficient and interactive coefficient, respectively; and x_i , x_j are coded independent variables.

III.1.1. Determination of γ -PGA and the residual sugar from molasses

Cells were separated from the broth by centrifugation for 20 min at 2300 g (Excelsa Baby II , FANEM, model 206-

R). The supernatant was collected for determination of γ -PGA and residual sugar concentrations.

The γ -PGA concentrations were determined according to the method reported by [21].

The residual sugar concentration was monitored turbidometrically at 540 nm according to the method reported by [22].

IV. RESULTS AND DISCUSSION

The Table II shows the γ -PGA production and sugar consumption.

Reference [2] and reference [1] showed that when the glycerol concentration or other carbon source was increased in fermentation broth, a large amount of γ -PGA production occurred. When molasses was used as the carbon source, increased concentrations did not increase γ -PGA biosynthesis. When the concentration of molasses was 200 g/l or more, a decrease in γ -PGA production occurred.

An important observation is that sugar consumption was high when γ -PGA production was high.

TABLE II
 γ -PGA PRODUCTION AND SUGAR CONSUMPTION

Treatments	Factors			γ -PGA (g.l ⁻¹)	TRS* (g.l ⁻¹)
	x1	x2	x3		
1	-1(140.5)	-1(5.06)	-1(4)	2.284	35.205
2	+1(259.5)	-1(5.06)	-1(4)	2.036	86.804
3	-1(140.5)	+1(19.94)	-1(4)	4.444	27.094
4	+1(259.5)	+1(19.94)	-1(4)	3.700	74.034
5	-1(140.5)	-1(5.06)	+1(12)	2.319	30.200
6	+1(259.5)	-1(5.06)	+1(12)	2.674	84.215
7	-1(140.5)	+1(19.94)	+1(12)	4.550	36.413
8	+1(259.5)	+1(19.94)	+1(12)	2.355	109.929
9	-1.68(100)	0(12.5)	0(8)	3.736	14.496
10	+1.68(300)	0(12.5)	0(8)	3.665	102.853
11	0(200)	-1.68(0)	0(8)	3.063	47.630
12	0(200)	+1.68(25)	0(8)	3.559	35.205
13	0(200)	0(12.5)	-1.68(1.28)	4.338	29.683
14	0(200)	0(12.5)	+1.68(14.72)	3.700	39.347
15	0(200)	0(12.5)	0(8)	4.904	27.612
16	0(200)	0(12.5)	0(8)	4.621	22.780
17	0(200)	0(12.5)	0(8)	5.117	26.231
18	0(200)	0(12.5)	0(8)	4.630	24.160

*TRS: Total reducing sugars

The maximum γ -PGA production occurred in treatments 15, 16, 17 e 18. These treatments are central points at level 0, and correspond to 200 g/l

molasses, 12.5 g/l citric acid and 8 g/l ammonium sulphate. Assays 3, 7 and 13 showed similar γ -PGA production but with different media compositions.

The minimum γ -PGA production occurred in trials with low molasses, citric acid and/or ammonium sulphate concentrations or in which all the concentrations were maximum (Figures 2, 4, 6). An equation for γ -PGA production was developed based on a regression analysis of the experimental data:

$$Y = 4,845 - 0,216x_1 - 0,517x_1^2 + 0,481x_2 - 0,655x_2^2 - 0,120x_3 - 0,404x_3^2 - 0,381x_1.x_2 - 0,106x_1.x_3 - 0,239x_2.x_3 \quad (2)$$

Eqn. (2) produced results that were highly significant ($P < 0.05$), as shown in Table III, and the value of the coefficient of determination ($R^2 = 0.810$) was satisfactory.

TABLE III
REGRESSION COEFFICIENTS OF CCD

Factor	Regression Coefficients	Pure error	t	p	95 % Confidence interval	
					Lower bound	Upper bound
Interception/Mean	4,845	0,316	15,353	0,000	4.117	5.573
Molasses (L*)	-0,216	0,171	-1,263	0,242	-0.611	0.178
Molasses (Q*)	-0,517	0,178	-2,908	0,020	-0.927	-0.107
Citric Acid (L)	0,481	0,171	2,813	0,023	0.087	0.876
Citric Acid (Q)	-0,655	0,178	-3,683	0,006	-1.064	-0.243
Ammonium Sulfate (L)	-0,120	0,171	-0,702	0,503	-0.514	0.274
Ammonium Sulfate (Q)	-0,404	0,1780	-2,275	0,053	-0.814	0.006
Molasses X Citric Acid	-0,381	0,223	-1,704	0,127	-0.896	0.135
Molasses X Ammonium Sulfate	-0,106	0,223	-0,474	0,648	-0.621	0.409
Citric Acid X Ammonium Sulfate	-0,239	0,223	-1,069	0,316	-0.754	0.276

*L = linear, Q = quadratic

An equation for sugar consumption was developed based on a regression analysis

$$Y = 24.497 + 27.434x_1 + 14.960x_1^2 + 8.858x_2^2 + 6.418x_3^2 \quad (3)$$

Eqn. (3) produced results that were highly significant ($P < 0.10$) (Table IV), and the value of the coefficient of determination ($R^2 = 0.897$) was satisfactory.

TABLE IV
REGRESSION COEFFICIENTS OF CCD

Factor	Regression Coefficients	Pure error	t	p	90 % Confidence interval	
					Lower bound	Upper bound
Interception/Mean	24.498	5.471	4.478	0.0006	14.809	34.186
Molasses (L*)	27.434	2.965	9.252	0.0000	22.183	32.686
Molasses (Q*)	14.960	3.081	4.855	0.0003	9.503	20.416
Citric Acid (Q)	8.858	3.081	2.875	0.0130	3.402	14.315
Ammonium Sulfate (Q)	6.418	3.081	2.083	0.0576	0.962	11.874

*L = linear, Q = quadratic.

All factors, in the Table IV, influenced sugar consumption ($p < 0.10$). The effects of molasses, citric acid and ammonium sulphate on γ -PGA production and residual sugar concentrations are shown in Figures 2-7, respectively. The non-explicit variables were fixed at the central point (level 0) for surface construction.

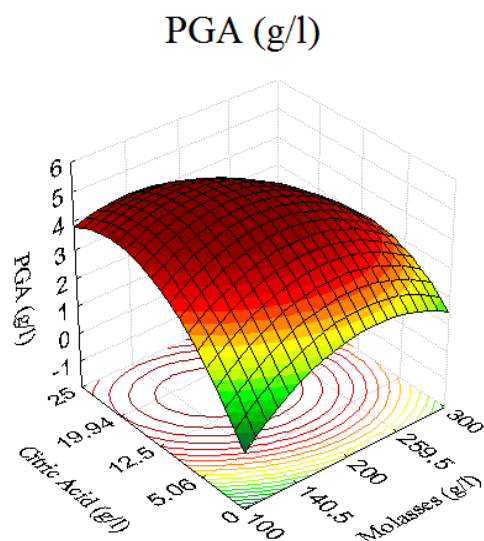


Fig. 2. Surface-response plot for the effect of molasses (x1) and citric acid (x2) on γ -PGA production.

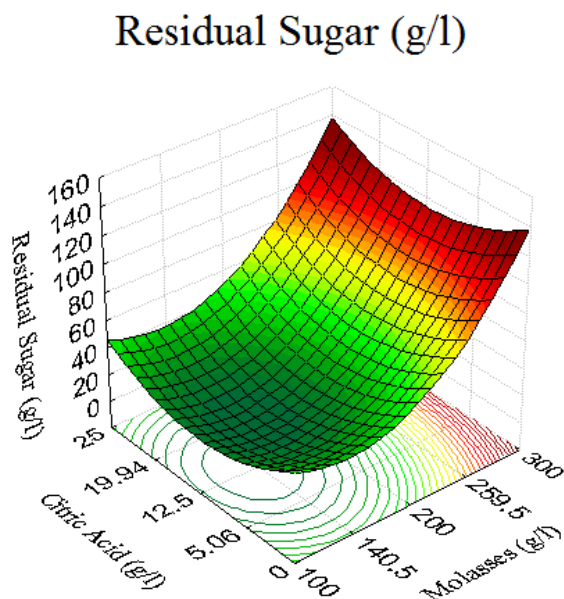


Fig. 3. Surface-response plot for the effect of molasses (x1) and citric acid (x2) on Sugar consumption. The molasses had 54% total reducing sugar.

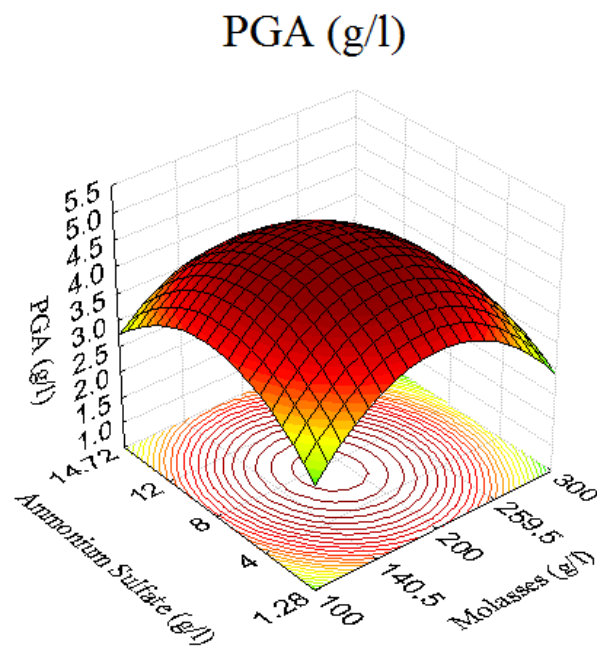


Fig. 4. Surface-response plot for the effect of molasses (x1) and ammonium sulfate (x3) on γ -PGA production.

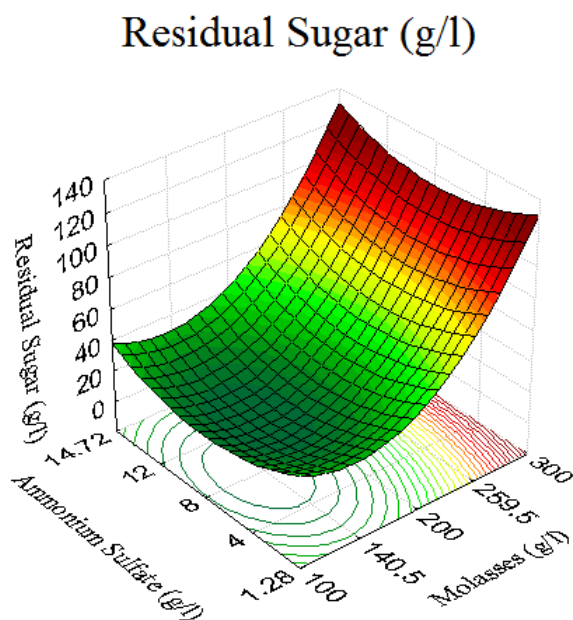


Fig. 5. Surface-response plot for the effect of molasses (x1) and ammonium sulfate (x3) on Sugar consumption. The molasses had 54% total reducing sugar..

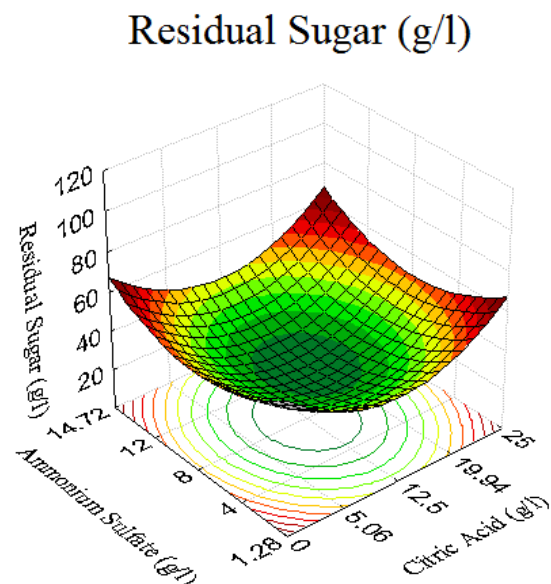


Fig. 7. Surface-response plot for the effect of citric acid (x2) and ammonium sulfate (x3) on Sugar consumption. The molasses had 54 % total reducing sugar.

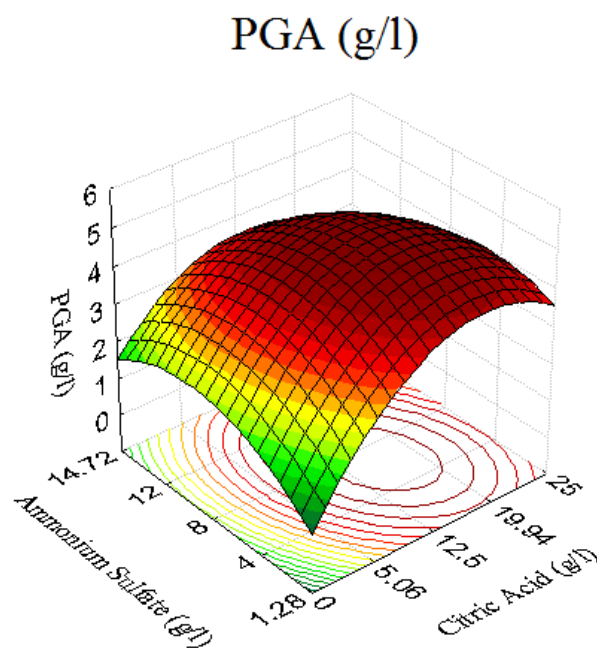


Fig. 6. Surface-response plot for the effect of citric acid (x2) and ammonium sulfate (x3) on γ -PGA production.

Maximum γ -PGA productivity was obtained in 4 different formulations of the initial concentrations of molasses, citric acid and ammonium sulphate. The figures show that maximum γ -PGA production occurred when the initial concentrations of molasses, citric acid and ammonium sulphate were between 140 and 200 g/l, 12.5 and 19.94 g/l, 4 and 12 g/l, respectively.

The maximum γ -PGA production was obtained when sugar consumption was at his maximum.

To choose the best result, assays, 3, 7, 13 and 15 were duplicated. The results for γ -PGA production were analyzed by Tukey test 5% with Statistic 5.0 software. The results are shown Table V.

TABLE V
 γ -PGA PRODUCTION BY *BACILLUS VELEZENSIS* NRRL B -
 23189, AT 27 °C FOR 72 H, INITIAL PH 6,5 AND 200 RPM

Treatments	γ -PGA (g.L ⁻¹)
3	4,249 $\pm$ 0,351 ^a
7	4,391 $\pm$ 0,050 ^a
13	4,338 $\pm$ 0,351 ^a
15	4,798 $\pm$ 0,200 ^a

Matching letters indicate samples that did not differ statistically, and different letters indicate samples that differed at 95 % confidence level.

These experiments show that the amounts of molasses, citric acid and ammonium sulphate in the culture medium are important determinants for γ -PGA productivity by *Bacillus velezensis* NRRL 23189.

Increased concentrations of the carbon source increased the γ -PGA production only at the benning of the fermentation, contrary of the observations of some references [2] and [16]. At concentrations of molasses, citric acid and ammonium sulphate above 200, 19.94 and 12 g/l, respectively, there was not increase in γ -PGA production. Several bacterial strains have been recently studied to γ -PGA production. Reference [21] reported a maximum productivity of 10.4 g/l using *Bacillus subtilis* BL53 cultivated at 37 °C for 96 h. Reference [11] reported a maximum productivity of 46.4 g/l using *Bacillus subtilis* ZJU-7 strain cultivated at 37 °C for 48 h. In other reported work [23], γ -PGA was produced using *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 strain cultivated at 37 °C for 96 h with maximum productivity of 26.12 g/l. *Bacillus velezensis* NRRL 23189 produces γ -PGA in media without glutamic acid, which is an advantage when compared with others *Bacillus* strain. The fact is important for industrial cost reduction because glutamic acid is a fermentation product, and the cost of the

molasses is cheaper than that of the purified sugars.

V. CONCLUSIONS

Molasses, citric acid and ammonium sulphate in a fermentation medium without glutamic acid yielded γ -PGA production in batch fermentations using *Bacillus velezensis* NRRL 23189. A maximum γ -PGA concentration of approximately 4.8 g/l was achieved with 4 different formulations of the fermentation medium that also showed maximum sugar consumption. The production of γ -PGA without glutamic acid in the culture medium is advantageous.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the CNPq for the PhD scholarship and for funding this project.

REFERENCES

- [1] A. Goto, M. Kunioka, Biosynthesis and hydrolysis of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IFO3335, *Biosci. Biotech. Biochem.* 56 (1992) 1031-1035.
- [2] R. Richard, A. Margaritis, Optimization of cell growth and poly(glutamic acid) production in batch fermentation by *Bacillus subtilis*, *Biotechnology Letters* 25 (2003) 465-468.
- [3] F. Shi, Z. Xu, P. Cen, Microbial production of natural poly amino acid, *Sci China Ser B-Chem*, 50 (2007) 291-303.
- [4] F. Shi, Z. Xu, P. Cen, Efficient production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* ZJU-7, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 133 (2006) 271-281.
- [5] F. Shi, Z. Xu, P. Cen, Optimization of γ -polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis* ZJU-7 using a surface-response methodology, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11 (2006) 251-257.
- [6] I. L. Shih, Y. T. Van, The production of poly-(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications, *Bioresource Technology*, 79 (2001) 207-225.

- [7] S. H. Yoon, J. H. Do, S. Y. Lee, H. N. Chang, Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*, *Biotechnology Letters*, 22, (2000) 585-588.
- [8] M. Ashiuchi, H. Misono, Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 (2002) 9-14.
- [9] A. C. Chibnall, M. W. Ress, F. M. Richards, Structure of the polyglutamic acid from *Bacillus subtilis*, *Bioch.* 68 (1958) 129-135.
- [10] M. Kunioka, Biosynthesis and chemical reactions of poly(amino acid)s from microorganisms, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47 (1997) 469-475.
- [11] J. Chen, F. Shi, B. Zhang, F. Zhu, W. Cao, Z. Xu, G. Xu, P. Cen, Effects of cultivation conditions on the production of γ -PGA with *Bacillus subtilis* ZJU-7, *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2010) 370-377.
- [12] M. Bovarnick, The formation of extracellular d(-)-glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*, *J. Biol. Chem.* 145 (1942) 415-424.
- [13] M. Kambourova, M. Tangney, F. G. Priest, Regulation of polyglutamic acid synthesis by glutamate in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*, *Applied and Environmental Microbiology*, 67 (2001) 1004-1007.
- [14] C. B. Thorne, C. G. Leonard, Isolation of D- and L-glutamyl polypeptides from culture filtrates of *Bacillus subtilis*, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 1109-1112.
- [15] J. H. Do, H. N. Chang, S. Y. Lee, Efficient recovery of γ -poly (glutamic acid) from highly viscous culture broth, *Biotechnology and Bioengineering*, 76 (2001) 219-223.
- [16] M. Kunioka, A. Goto, Biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) from L-glutamic acid, citric acid, and ammonium sulfate in *Bacillus subtilis* IFO3335, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40 (1994) 867-872.
- [17] I. B. Bajaj, R. S. Singhal, Enhanced production of poly (γ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by using metabolic precursors, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159 (2009) 133-141.
- [18] A. Hoppensack, F. B. Oppermann-sanio, A. Steinbüchel, Conversion of the nitrogen content in liquid manure into biomass and polyglutamic acid by a newly isolated strain of *Bacillus licheniformis*, *FEMS Microbiology Letters* 218 (2003) 39-45.
- [19] H. J. Choi, M. Kunioka, Preparation conditions and swelling equilibria of hydrogel prepared by γ -irradiation from microbial poly(γ -glutamic acid), *Radiat. Phys. Chem.* 46 (1995) 175-179.
- [20] M. Ashiuchi, T. Kamei, D. H. Baek, S. Y. Shin, M. H. Sung, K. Soda, T. Yagi, H. Misono, Isolation of *Bacillus subtilis* (*chungkookjang*), a poly- γ -glutamate producer with high genetic competence, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57 (2001) 764-769.
- [21] S. B. Silva, Produção e otimização de processo de obtenção de ácido γ -poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53, PhD. Teses, Dept. Chemistry Engineering, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RGS, 2010.
- [22] M. Somogyi, Determination of blood sugar, *Journal of Biological Chemistry* (1945) 160-169.
- [23] I. B. Bajaj, S. S. Lele, R. S. Singhal, Enhanced production of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM2324 in solid state fermentation, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 35 (2008) 1581-1586.