

THALES AUGUSTO DE MIRANDA MEDEIROS

**ANÁLISE DA CAPACIDADE DE *Bacillus* spp. NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO
 γ -POLIGLUTÂMICO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO UTILIZANDO
GRÃOS DE SOJA COMO SUBSTRATO**

Sorocaba
2020

THALES AUGUSTO DE MIRANDA MEDEIROS

**ANÁLISE DA CAPACIDADE DE *Bacillus* spp. NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO
 γ -POLIGLUTÂMICO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO UTILIZANDO
GRÃOS DE SOJA COMO SUBSTRATO**

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Valquíria de Campos
Coorientador: Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho

Sorocaba
2020

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

ciências
ambientais



unesp
Sorocaba

M488a Medeiros, Thales Augusto de Miranda
Análise da capacidade de Bacillus spp. na produção de ácido gama-poliglutâmico em diferentes condições de cultivo utilizando grãos de soja como substrato / Thales Augusto de Miranda Medeiros. -- Sorocaba, 2020
99 f. : il., tabs., fotos
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba
Orientadora: Valquíria de Campos
Coorientador: Natan de Jesus Pimentel Filho
1. Ácido gama-poliglutâmico. 2. Bacillus spp.. 3. Fermentação em estado sólido. 4. Soja. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia, Sorocaba.

Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Sorocaba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ANÁLISE DA CAPACIDADE DE *Bacillus* spp. NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO γ -POLIGLUTÂMICO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO UTILIZANDO GRÃOS DE SOJA COMO SUBSTRATO

AUTOR: THALES AUGUSTO DE MIRANDA MEDEIROS

ORIENTADORA: VALQUIRIA DE CAMPOS

COORIENTADOR: NATAN DE JESUS PIMENTEL FILHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS AMBIENTAIS, área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Prof^a. Dr^a. VALQUIRIA DE CAMPOS

Departamento Engenharia Ambiental / Instituto de Ciência e Tecnologia, Câmpus de Sorocaba, Unesp

Prof. Dr. LEANDRO CARDOSO DE MORAIS

Departamento de Engenharia Ambiental / Unesp - Instituto de Ciência e Tecnologia - Câmpus de Sorocaba

Prof^a. Dr^a. IOLANDA CRISTINA SILVEIRA DUARTE

Departamento de Biologia / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar - Sorocaba

Prof^a. Dr^a. ROBERTA BARROS LOVAGLIO

Centro de Ciências da Natureza / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Câmpus Lagoa do Sino

Dr. UESLEI DA CONCEIÇÃO LOPES

Centro de Ciências da Natureza / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Câmpus Lagoa do Sino

Sorocaba, 19 de agosto de 2020.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Clementino Leonel de Medeiros Junior e Ana Maria Alves de Miranda,
dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Instituto de Ciência e Tecnologia - *campus* de Sorocaba, através dos docentes e técnicos administrativos que atuam no Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais.

À Prof.^a Dr.^a Valquíria de Campos, minha orientadora, pela e dedicação e contribuição para minha formação acadêmica, durante os seis anos de pós-graduação *stricto sensu* (mestrado e doutorado).

Ao Prof. Dr. Natan de Jesus Pimentel Filho, da Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, *campus* Lagoa do Sino, meu coorientador, pela importante colaboração e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo Auxílio à Pesquisa (processo n° 2015/02650-8), que possibilitou aquisição de materiais necessários à realização desta tese.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo recurso financeiro (processo n° 400040/2016-6), que muito auxiliou na execução deste projeto.

Ao Instituto Granado de Tecnologia da Poliacrilonitrila e a seu presidente, M^o Nilton Pereira Alves Granado, pelo suporte no desenvolvimento da pesquisa.

À Universidade Federal de São Carlos, UFSCar, na pessoa do Prof. Dr. Luiz Manoel de Moraes Camargo Almeida, que disponibilizou a estrutura do *campus* Lagoa do Sino e permitiu o meu afastamento das atividades laborais para o desenvolvimento desta tese.

Aos meus colegas de trabalho, Dr. Ueslei da Conceição Lopes, Ma. Sinara Oliveira Dal Farra e M^o Caetano Afonso Lanzoni Troiani, que em algum momento contribuíram para o desenvolvimento desta tese.

Ao Prof. Dr. Moisés Naves De Moraes, pela disposição e apoio para elaboração do delineamento composto central rotacional (DCCR).

Aos meus colegas do Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais, pela convivência.

Aos meus pais, Clementino Leonel de Medeiros Junior e Ana Maria Alves de Miranda, por sempre me apoiarem e acreditarem em meus objetivos.

Ao meu irmão, Thiago Henrique de Miranda Medeiros, pela amizade.

À minha namorada, Laura Tie Vieira de Paula Oguchi, pelo apoio, compreensão e companheirismo.

EPÍGRAFE

“A terra produziria sempre o necessário, se com o necessário soubesse o homem contentar-se. Se o que ela produz não lhe basta a todas as necessidades, é que ele emprega no supérfluo o que poderia ser aplicado no necessário”

O Livro dos Espíritos, capítulo V, Lei de Conservação

RESUMO

O ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) recebeu considerável atenção em aplicações ambientais. Dentre os métodos de produção deste biopolímero a fermentação microbiana é a mais vantajosa economicamente. O objetivo deste trabalho é aumentar a produção de γ -PGA utilizando soja como substrato. Neste estudo o γ -PGA foi produzido a partir de processos de fermentação utilizando *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* inoculados em diferentes substratos. O caldo E foi utilizado para fermentação submersa (FS) e soja para fermentação em estado sólido (FES). Na fermentação submersa, o crescimento dos microrganismos em diferentes meios de cultivo e os mecanismos de produção de γ -PGA foram avaliados. Para a produção de γ -PGA em estado sólido, a concentração de proteínas dos cultivares de soja BRS 232, BRS 360 RR, BRS 1001 IPRO das safras de 2015 e 2016 e a modificação da estrutura física dos grãos de soja foram avaliados. O delineamento composto central rotacional (DCCR) foi utilizado para maximizar a produção em FES, avaliando quatro fatores (umidade, inóculo, substrato e temperatura). Os meios de cultura influenciaram na velocidade específica de crescimento de *B. subtilis* e *B. licheniformis* e o caldo nutriente foi mais vantajoso para a preparação do inóculo, pois intensificou a produção de γ -PGA em FS. A avaliação da eficiência de microrganismos do gênero *Bacillus* na produção de ácido γ -PGA em FS indicou que *B. licheniformis* em cultivo isolado produziu um volume maior do biopolímero que *B. subtilis*. A maior produção de ácido γ -PGA por *B. licheniformis* foi de 398,1 mg L⁻¹. Verificou-se que *B. licheniformis* é uma bactéria independente do ácido L-glutâmico para a produção de ácido γ -PGA. A composição centesimal dos cultivares da safra 2016 continha uma quantidade maior de proteínas, levando a um maior rendimento de biopolímero. A pluviosidade no período de cultivo teve maior influência na determinação do teor de proteínas nos grãos de soja, que a variação genética. Todos os cultivos da safra 2016 apresentam um grande potencial como substrato para a produção de γ -PGA. O cultivar BRS 1001 IPRO, da safra 2016, apresentou a maior produção, ou seja, 1177,2 mg L⁻¹ de γ -PGA. Este cultivar foi submetida a diferentes níveis de cominuição (fina, média e grossa). Grãos cominuídos na fração grossa aumentaram a produção de γ -PGA para 2721,5 mg L⁻¹. A fração grossa disponibilizou os nutrientes internos dos grãos para fermentação e sua granulometria possibilitou maior aeração. Os fatores significativos ($p < 0,05$) para maximização da produção de γ -PGA foram o teor inicial de umidade e volume do inóculo, resultando na produção de 4400,8 mg L⁻¹ de biopolímero.

Palavras-chave: Ácido gama-poliglutâmico. *Bacillus* spp. Fermentação em estado sólido. Soja.

ABSTRACT

Considerable attention has focused on gamma-polyglutamic acid (γ -PGA) for in environmental applications. Microbial fermentation is the most economically advantageous of the various production methods of this biopolymer. The aim of this work is to increase the production of γ PGA using soy as a substrate. In this study, γ -PGA was produced from fermentation processes by inoculating *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* on different substrates. E broth was used for submerged fermentation (SF) and soybean for solid-state fermentation (SSF). The growth of microorganisms in different culture media and the mechanisms of γ -PGA production were evaluated in SF. The protein concentration of the cultivars BRS 232, BRS 360 RR, BRS 1001 IPRO for the 2015 and 2016 crops and the modification of the physical structure of the soybeans were evaluated for γ -PGA production via SSF. A central composite rotatable design (CCRD) was used to maximize production via SSF, evaluating four factors (moisture levels, inoculum, substrate and temperature). The specific growth rates of *B. subtilis* and *B. licheniformis* were influenced by the culture media and the nutrient broth was advantageous in the preparation of the inoculum, as it intensified the production of γ -PGA in SF. An analysis of the efficiency of microorganisms of the genus *Bacillus* in the production of γ -PGA in SF indicated that *B. licheniformis* in isolated culture produced a larger volume of the biopolymer than *B. subtilis*. The highest production of γ -PGA achieved with *B. licheniformis* was 398.1 mg L⁻¹. It was found that *B. licheniformis* is a bacterium independent of L-glutamic acid for the production of γ -PGA. The percent composition of cultivars from the 2016 crop contained a higher amount of protein, leading to a higher biopolymer yield. During the cultivation period, the rainfall index exerted a stronger influence in determining the soybean protein content than the genetic variation. All the 2016 crops showed an excellent potential as substrate for the production of γ -PGA. The cultivar BRS 1001 IPRO, from the 2016 crop, presented the highest production yield, i.e., 1177.2 mg L⁻¹ of γ -PGA. This cultivar was subjected to different levels of comminution (fine, medium and coarse). Grains comminuted in the coarse fraction increased the yield of γ -PGA to 2721.5 mg L⁻¹. The coarse fraction made the internal nutrients of the grains available for fermentation and its granulometry allowed for greater aeration. The significant factors ($p < 0.05$) for maximizing the production of γ -PGA were the initial moisture content and volume of the inoculum, resulting in the production of 4400.8 mg L⁻¹ of biopolymer.

Keywords: Gamma-polyglutamic acid. *Bacillus* spp. Solid state fermentation. Soybean.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular de duas isoformas de ácido poliglutâmico.....	24
Figura 2 - Via de síntese do ácido γ -poliglutâmico em <i>Bacillus</i>	27
Figura 3 - Fluxograma do andamento experimental. Crescimento microbiano (A), fermentação submesra (B) e fermentação em estado sólido (C).....	35
Figura 4 - Representação esquemática do andamento experimental em caldo nutriente e caldo E.....	38
Figura 5 - Esquema de extração e quantificação do ácido γ -poliglutâmico.....	43
Figura 6 - Curva de crescimento microbiano em caldo nutriente no período de 8 h.....	45
Figura 7 - Curva de crescimento microbiano de <i>B. subtilis</i> (A) e <i>B. licheniformis</i> (B) em caldo E com pré-inóculo em caldo nutriente e caldo E no período de 8 h.....	47
Figura 8 - Curva de crescimento microbiano de <i>B. subtilis</i> (A) e <i>B. licheniformis</i> (B) em caldo E com pré-inóculo em caldo nutriente e caldo E no período de 144 h.....	49
Figura 9 - Fermentação submersa de <i>B. subtilis</i> (A) e <i>B. licheniformis</i> (B) em caldo E, com pré-inóculo em caldo nutriente. Tubos Falcon com meio fermentado durante 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (seqüência da esquerda para direita).....	50
Figura 10 - Produção de γ -PGA em caldo E, a partir de pré-inóculo em caldo nutriente.....	51
Figura 11 - Produção de γ -PGA em caldo E, a partir de pré-inóculo em caldo E.....	52
Figura 12 - Curva de crescimento microbiano e produção de γ -PGA por <i>B. subtilis</i> (A) e <i>B. licheniformis</i> (B) em caldo E com pré-inóculo em caldo nutriente.....	53
Figura 13 - Produção de γ -PGA em consórcio microbiano.....	54
Figura 14 - Produção de γ -PGA por <i>Bacillus licheniformis</i> , na ausência de ácido L-glutâmico, a partir de quatro fontes de carbono.....	55
Figura 15 - Precipitação total e temperatura média compensada no período de cultivo dos cultivares de soja.....	58
Figura 16 - Composição centesimal (%) do cultivar BRS 360 RR das safras 2015 e 2016.....	62

Figura 17 - Composição centesimal (%) do cultivar BRS 232 das safras 2015 e 2016.....	63
Figura 18 - Composição centesimal (%) do cultivar BRS 1001 IPRO das safras 2015 e 2016.....	63
Figura 19 - Produção de γ -PGA por <i>Bacillus licheniformis</i> em diferente cultivares de soja.....	64
Figura 20 - Cominuição dos grãos de soja do cultivar BRS 1001 IPRO, safra 2016. Fração fina (A), fração média (B) e fração grossa (C).....	67
Figura 21 - Produção de γ -PGA por <i>Bacillus licheniformis</i> em substrato (BRS 1001 IPRO, safra 2016) com diferentes frações.....	68
Figura 22 - Gráfico de contorno para a resposta (produção de γ -PGA) em função dos fatores (inóculo e umidade).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens gerais da fermentação em estado sólido (FES) sobre a fermentação submersa (FS).....	31
Tabela 2 - Produção de γ -PGA em fermentação em estado sólido (FES).....	33
Tabela 3 - Valores codificados e originais que foram utilizados no DCCR para avaliar efeito do teor inicial de umidade, volume do inóculo, quantidade de substrato e temperatura para a produção de γ -PGA em FES.....	42
Tabela 4 - Velocidade específica de crescimento das duas linhagens de <i>Bacillus</i> cultivadas em caldo nutriente.....	46
Tabela 5 - Velocidade específica de crescimento das três linhagens de <i>Bacillus</i> cultivadas em caldo E e ativadas em pré-inóculo em caldo nutriente e caldo E.....	48
Tabela 6 - Composição centesimal de três diferentes cultivares de grãos de soja ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) da safra 2015.....	60
Tabela 7 - Composição centesimal de três diferentes cultivares de grãos de soja ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) da safra 2016.....	60
Tabela 8 - Matriz do DCCR para 4 fatores e valores obtidos na produção de γ -PGA em 48 h de fermentação em modo estático.....	70
Tabela 9 - Estimativas dos coeficientes das variáveis, estatística de teste T e valor de p	71
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para a produção de γ -PGA em 48 h.....	72

LISTA DE ABREVIACÃO E SIGLAS

μ	= Velocidade específica de crescimento
μL	= Microlitro
ANOVA	= Análise de Variância
ATP	= Adenosina Trifosfato
BDMEP	= Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa
Caldo LB	= Caldo Luria Bertani
cap	= Cápsula
CCGB	= Gênero <i>Bacillus</i> e Gêneros Correlatados
CTAB	= Brometo de Cetiltrimetilamônio
DAAE	= Departamento de Águas e Energia Elétrica
DCCR	= Delineamento Composto Central Rotacional
e.g.	= <i>Exempli gratia</i>
EMBRAPA	= Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FES	= Fermentação em Estado Sólido
FIOCRUZ	= Fundação Oswaldo Cruz
FS	= Fermentação Submersa
g	= Grama
GRAS	= <i>Generally Recognized as Safe</i>
h	= Hora
IAC	= Instituto Agrônomo de Campinas
INMET	= Instituto Nacional de Meteorologia
ITAL	= Instituto de Tecnologia de Alimentos
kDa	= kilodalton
kg	= Quilograma

L	= Litro
LFB	= Laboratório de Fisiologia Bacteriana
M	= Molar
min	= Minuto
mL	= Mililitro
mm	= Milímetro
NaCl	= Cloreto de sódio
NaOH	= Hidróxido de sódio
nm	= Nanômetro
NRPSs	= Peptídeos Sintetases Não-Ribossômicos
°C	= Grau Celsius
p	= Peso
PAC	= Poliacrilamida
pgs	= Poliglutamato Sintetase
PG-TXL	= Ácido γ -Poliglutâmico-Paclitaxel
pH	= Potencial de Hidrogênio
R ²	= Coeficiente de Determinação
rpm	= Rotação por Minuto
SAP	= Superabsorvente
UV-vis	= UV-visível
v	= Volume
vvm	= Volume de Ar por Volume de Meio por Minuto
α	= Alfa
α -PGA	= Ácido α -Poliglutâmico
β	= Beta
γ -PGA	= Ácido γ -Poliglutâmico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 ÁCIDO GAMA-POLIGLUTÂMICO (γ -PGA).....	20
3.2 BIOSÍNTESE DE γ -PGA.....	26
3.3 PROCESSOS FERMENTATIVOS PARA PRODUÇÃO DE γ -PGA.....	30
3.4 SOJA.....	33
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1 ESTUDO DO CRESCIMENTO MICROBIANO.....	36
4.2 FERMENTAÇÃO SUBMERSA (FS).....	38
4.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	39
4.3.1 Estudo da soja.....	39
4.3.2 Produção de γ -PGA utilizando soja como substrato.....	41
4.4 MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE γ -PGA.....	41
4.5 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE γ -PGA.....	42
4.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA.....	44
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
5.1 ESTUDO DO CRESCIMENTO MICROBIANO.....	45
5.2 FERMENTAÇÃO SUBMERSO (FS).....	50
5.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES).....	58
5.3.1 Estudo do substrato.....	58
5.3.2 Produção de γ -PGA utilizando soja como substrato.....	64
5.4 MAXIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE γ -PGA.....	70
6 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE 1.....	98
ANEXO 1.....	99

1 INTRODUÇÃO

Muitos problemas ambientais são decorrentes da utilização de materiais que possuem longa vida pós-utilização e geram resíduos não biodegradáveis. A pesquisa de novos materiais ambientalmente seguros é de grande relevância, e os biopolímeros obtidos a partir de recursos renováveis surgem como uma alternativa importante, principalmente se esses materiais forem biodegradáveis e biocompatíveis (SILVA, 2010). O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é um biopolímero aniônico, solúvel em água, biodegradável, biocompatível e atóxico, obtido a partir de bactérias do gênero *Bacillus*, por meio de processos fermentativos (SILVA, 2010).

No Brasil o sulfato de alumínio destaca-se como o coagulante mais utilizado, entretanto, como o alumínio não é biodegradável, elevadas concentrações desse metal podem ocasionar problemas à saúde humana (CLAYTON, 1989), além de gerar um elevado volume de lodo (NDABIGENGESERE, NARASIAH, 1998). O uso de γ -PGA no tratamento de águas tem sido descrito por diversos pesquisadores. Nestes estudos, um incremento da atividade floculante ocorre quando cátions multivalentes são adicionados ao sistema (MAHMOUD, 2006; SHIH et al., 2001; YOKOI et al., 1996). A modificação na molécula de γ -PGA pode potencializar a atividade do polímero como agente coagulante (KUNIOKA, 2004; TANIGUCHI et al., 2005^{abc}). Segundo Oppermann-Sanio e Steinbüchel (2002) é possível sintetizar hidrogéis de γ -PGA com maior atividade floculante. Portanto, o γ -PGA torna-se um potencial coagulante biodegradável.

A síntese química de γ -PGA é praticamente impossível, entretanto, este biopolímero pode ser obtido através do cultivo microbiano (SHIH, VAN, 2001). *Bacillus subtilis* é o microrganismo mais utilizado para a produção de γ -PGA, mas outras espécies como *Bacillus licheniformis* são investigadas na produção deste biopolímero (BAJAJ, SINGHAL, 2009; KONGKLOM et al., 2015; MEERAK et al., 2007). As espécies do gênero *Bacillus* são promissoras para a produção de γ -PGA por apresentarem altas taxas de crescimento, curtos ciclos de fermentação, secreção de proteínas para o meio extracelular e por possuírem *status* GRAS (*Generally Recognized as Safe*) (SCHALLMEY, SINGH, WARD, 2004).

O estudo da fermentação para produção de γ -PGA volta-se, principalmente, para fermentação submersa (FS) (WU et al., 2008; JIANG et al., 2006; SOLIMAN et al., 2005). Entretanto, neste tipo de cultivo há aumento da viscosidade do meio levando a diminuição na transferência de oxigênio, o que limita o crescimento celular e diminui a produção de

γ -PGA (CROMWICK et al., 1996; OGAWA et al., 1997). Como alternativa para a produção de γ -PGA, há a fermentação em estado sólido (FES), onde se reduz a viscosidade dos meios de cultivos submersos e possibilita a pesquisa de substratos de baixo custo (SILVA, 2010). Contudo, pesquisas utilizando FES para produção de γ -PGA são menos frequentes, podendo citar os trabalhos de OH et al. (2007), XU et al. (2005) e CHEN et al. (2005^{ab}).

A produção de γ -PGA pode ser verificada no tradicional alimento japonês a base de soja (*natto*). O *natto* consiste da fermentação dos grãos de soja, que produz alimento de consistência mucilaginosa, decorrente de sua composição (γ -PGA e levana) (SHIH, VAN, 2001). A levana é um polissacarídeo que representa aproximadamente 20% da mucilagem do *natto* (XU et al., 2006). A síntese de γ -PGA é um processo associado à membrana celular que utilizam os monômeros de ácido L-glutâmico que são incorporados ao γ -PGA, estes podem ser derivados do meio de cultivo ou serem produzidos a partir de precursores derivados do ciclo do ácido tricarboxílico (YOON, LEE, 2002).

A utilização dos grãos de soja como substrato para produção de γ -PGA torna-se de interesse nacional, uma vez que o Brasil é o maior produtor de soja no mundo (USDA, 2020). O uso de grãos de soja no processo fermentativo para produção de γ -PGA pode reduzir problemas recorrentes no cultivo em estado sólido, como a compactação do substrato e, conseqüentemente, dificuldade na aeração. Pesquisas onde fez-se uso de resíduo agroindustrial, como resíduo fibroso de soja, apresentaram a compactação e aeração como um empecilho para a produção de γ -PGA (SILVA, 2010; BRITO, 2014).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho volta-se para a produção de ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA), através da fermentação de grãos de soja utilizando-se diferentes espécies de *Bacillus*.

Como objetivos específicos têm-se:

- Entender o crescimento e mecanismos de produção do ácido γ -poliglutâmico, em fermentação submersa, das linhagens microbianas.
- Verificar a capacidade das espécies *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* cultivados isolados e em consórcio, na produção de γ -PGA.
- Verificar a influência da concentração de proteínas nos cultivares de soja para a produção de γ -PGA.
- Estabelecer o cultivar de soja e linhagem de *Bacillus* mais eficiente para produção de γ -PGA na fermentação em estado sólido.
- Maximizar a produção de γ -PGA estabelecendo os fatores ideais para a fermentação em estado sólido.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA)

O ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA) é uma poliamida que utiliza somente um único tipo de monômero na sua constituição, sendo este pertencente a um pequeno grupo designado de poliaminoácido (XU et al., 2013). As poliamidas diferem das proteínas, pois o segundo é composto por uma variedade de aminoácidos que possuem uma sequência específica (KUNIOKA, 1997).

O γ -PGA foi descoberto inicialmente como parte integrante da cápsula de *Bacillus anthracis* (IVÁNOVICS, BRUCKNER, 1937), mas Bovarnick (1942) demonstrou que o γ -PGA é secretado para o meio de cultivo durante o crescimento de *Bacillus subtilis*, e posteriormente confirmado por outros autores (XU et al., 2005^{ab}; CHEN et al., 2005^{ab}; CHEN et al., 2008; WANG et al., 2008; YOA et al., 2012; CESARO et al., 2014; TANG et al., 2015; ZHANG et al., 2018).

O γ -PGA também foi encontrado em outros *Bacillus* spp., como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Bacillus pumilus*. Como *B. subtilis* e *B. licheniformis* podem ser facilmente cultivados e geralmente reconhecidas como seguras (GRAS), muitas pesquisas sobre a produção de γ -PGA foram realizadas com estas espécies (XU et al., 2013).

A função fisiológica de γ -PGA nos microrganismos ainda não é completamente compreendida (OGUNLEYE, 2015). Quando o biopolímero está ligado ao peptidoglicano pode auxiliar na proteção contra bacteriófagos, anticorpos, peptídeos antimicrobianos e fagocitose aumentando assim a virulência (KOCIANOVA, 2005; MESNAGE et al., 1998). O γ -PGA quando liberado no ambiente pode sequestrar metais, reduzir a concentração de sal, fornecer fonte de carbono, proteger contra condições adversas e auxiliar na formação de biofilmes para absorção de nutrientes essenciais do meio ambiente (MCLEAN et al., 1990; HEZAYEN et al., 2001; KOCIANOVA, 2005; YAN et al., 2015).

O γ -PGA é hidrossolúvel, biodegradável, comestível, não tóxico para os humanos e meio ambiente, e é produzido por uma variedade de microrganismos. As características deste biopolímero atende as novas demandas da indústria por materiais ecológicos, reduzindo o uso de polímeros a base de petróleo (SHIH, VAN, 2001; XU et al., 2013).

As aplicações potenciais de γ -PGA e seus derivados na indústria inclui o uso no tratamento de água e esgoto, como quelante de metais e absorventes para remoção de

metais traço e radionuclídeos, além de sua utilização como biofloculantes substituindo a poliacrilamida (PAC) (SHIH, VAN, 2001).

O acúmulo de metais traço e radionuclídeos no meio ambiente impulsionou pesquisas voltadas para remediação ambiental (MACASKIE, BASNAKOVA, 1998). O uso de polímeros de origem microbiana como agente floculante é desejável pela sua biodegradabilidade e por seus intermediários de degradação serem inofensivos aos seres humanos e ao meio ambiente (SHIH, VAN, 2001; XU et al., 2013).

Shin et al. (2001) relataram o uso de γ -PGA para floculação de suspensões orgânicas (celulose, fermento etc.) e inorgânicas (carvão ativo, argila ácida, partículas de solo, compostos de cálcio e magnésio, etc.). Há estudos que demonstram a afinidade na ligação de γ -PGA aniônico com uma variedade de metais, incluindo Ni^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Al^{+3} e Cr^{+3} (MCLEAN et al., 1990; MCLEAN et al., 1992). A interação de γ -PGA com U^{+4} também foi verificada (HE et al., 2000).

Wu e Ye (2007) desenvolverem o biopolímero DYU500 que possui uma boa atividade de floculação, onde o γ -PGA é um dos principais componentes. Este estudo constatou que o uso de γ -PGA e cátions multivalentes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+}), em suspensões de caulim, estimulou a ação floculante do biopolímero.

A eliminação de metais traço de sistemas aquáticos através de biopolímeros oriundos de microrganismos é uma das aplicabilidades de γ -PGA. Estudo de Inbaraj et al. (2009) verificaram as características de ligação do mercúrio (II), metal traço altamente cancerígeno, com o γ -PGA quando influenciados por variáveis como o pH, temperatura, tempo de agitação, entre outras. Os autores indicaram que a capacidade máxima de ligação ao mercúrio (II) foi de 96,79 mg/g. Bodnár et al. (2008) investigaram a preparação e caracterização de novas nanopartículas biodegradáveis com base na complexação de γ -PGA com íons chumbo bivalente, e descreveram alta capacidade de ligação das nanopartículas de γ -PGA para estes íons, sendo um promissor sorvente de metais traço em águas poluídas. Segundo Mark et al. (2006) o γ -PGA possui grande afinidade por íons de Cu^{2+} , apresentando alta capacidade de ligação ao íon de 77,9 mg/g e podendo ser utilizado para tratamento de águas residuárias de indústrias.

As propriedades de floculação de γ -PGA também foram investigadas através da modificação do biopolímero por radiação gama (KUNIOKA, 2004; TANIGUCHI, 2005^a). A utilização de radiação gama sintetiza hidrogel de γ -PGA com elevada atividade floculante (OPPERMANN-SANIO, STEINBÜCHEL, 2002). Kunioka (2004) demonstrou

que a combinação de policloreto de alumínio e hidrogel de γ -PGA é eficiente na limpeza de águas turvas mesmo em baixas concentrações.

Usos futuros de γ -PGA como biofloculantes vão além do tratamento de águas residuárias, mas podem ser também aplicados no tratamento de água para consumo e a jusante de indústrias de alimentos (SHIH, VAN, 2001).

A utilização de γ -PGA na indústria alimentícia é ampla, sendo aplicado como espessante para melhorar a viscosidade de bebidas, como crioprotetor para alimentos congelados e como aditivos para a ração animal (SHIH, VAN, 2001).

O congelamento e o descongelamento constante causam danos indesejáveis em células vivas e alimentos biologicamente ativos. A adição de anticongelante tem sido amplamente utilizada para evitar a deterioração (SHIH, VAN, 2001). Estudos demonstram a aplicação do biopolímero com finalidade anticongelante, podendo ser utilizado na preservação de alimentos, microrganismos e enzimas (SHIH, 2003).

O γ -PGA com peso molecular abaixo de 20 kDa possui alta atividade anticongelante e sais de γ -PGA também apresentam esta característica. Como os sais de γ -PGA possuem pouco sabor próprio, estes podem ser utilizados em maior quantidade como anticongelante, ao contrário de outros anticongelantes tradicionalmente utilizados como a glicose (MITSUIKI et al., 1998; SHIH, 2003).

Konno et al. (1989) relataram que adição de γ -PGA em alimentos à base de farinha de trigo os preserva por tempo maior e melhora a textura. A adição de γ -PGA em forma de sal de cálcio em alimentos, pode aumentar a concentração deste íon auxiliando na prevenção de doenças ósseas (ASHIUCHI et al., 2004). Bebidas com pequenas concentrações de γ -PGA melhoram o sabor do produto (SHIGERU, REIKO, 1991) e sua adição reduz o sabor característico de alimentos amargos (SAKAI et al., 2000). Também foi demonstrado o uso de γ -PGA como espessante para bebidas com suco de frutas ou adicionado a bebidas esportivas para melhorar o sabor (YAMANAKA, 1991).

Quando o γ -PGA e seus produtos de decomposição são adicionados a produtos alimentares que contenham vitaminas e alto teor de minerais, há uma maior e mais rápida absorção destas substâncias no intestino delgado (TANIMOTO et al., 1995; KASHIMA et al., 2006). Há estudos indicando as vantagens da adição de γ -PGA em alimentos para animais. Ração para animais com γ -PGA e seus produtos de decomposição promove aumento na absorção de nutrientes, resistência da casca de ovos e aumenta a assimilação e retenção de fósforo pelos animais (KARASAWA et al., 1998; TANIMOTO et al., 2000).

Há também relatos da aplicação do γ -PGA na medicina, como uso de transportador de drogas, terapia gênica, vacinas, adesivo biológico e fio de sutura. Na indústria de cosméticos pode ser utilizado como umectante (SHIH, VAN, 2001; BUESCHER, MARGARITIS, 2007).

O γ -PGA complexado com paclitaxel (PG-TXL), um quimioterápico com potente atividade antitumoral, aumentou sua solubilidade em água produzindo efeitos antitumorais significativos e reduziu a toxicidade. Estudo pré-clínico indicou a captação do complexo PG-TXL pelas células tumorais 5 vezes maior que somente o paclitaxel (LI et al., 1998). Outros medicamentos ligados ao γ -PGA para tratamento de câncer apresentaram também redução na toxicidade, sugerindo que este biopolímero possa ser aplicado a uma ampla variedade de agentes anticâncer (AVICHEZER et al., 1998; DE VRIES et al., 2000; SHIH, VAN, 2001).

Ligações entre γ -PGA e outras substâncias mostraram-se promissoras como adesivos biológicos, pois são biodegradáveis e não induzem nenhuma resposta inflamatória problemática (OTANI et al., 1998; SEKINE et al., 2000).

O γ -PGA é utilizado também na fabricação de espessantes e cosméticos. Como hidratante em cosméticos, o γ -PGA pode substituir o ácido hialurônico (SUNG et al., 2005). O uso de γ -PGA em cosméticos é favorecido pela característica de solubilidade em água e por ser insolúvel em vitaminas, tornando-as mais estáveis e melhorando sua absorção (SUNG et al., 2006).

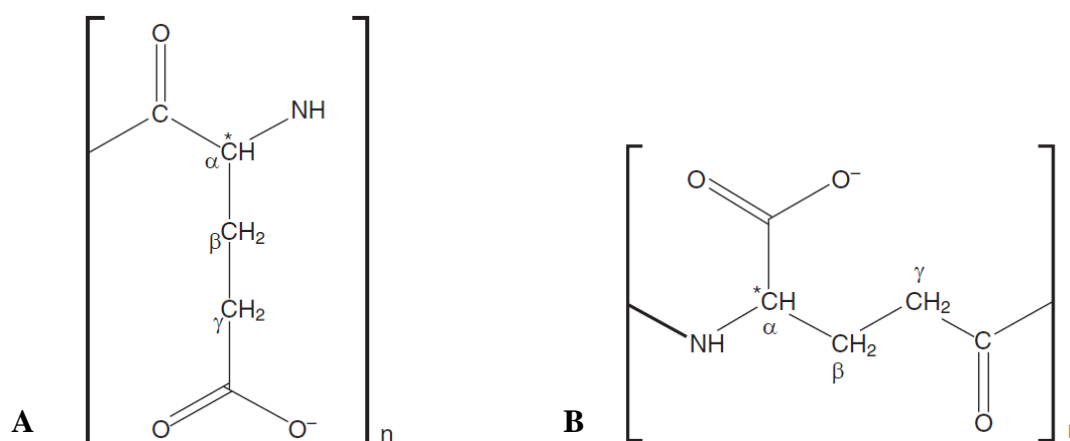
Existem diversas outras aplicações tecnológicas de γ -PGA descritas na literatura. Hidrogel a base de γ -PGA exibe alta capacidade de absorção, possuindo aplicações, tais como em fraldas, reservatórios de água na agricultura e implantes de hidrogel para liberação de medicamentos (CHOI, KUNIOKA, 1995). A maioria dos hidrogéis contém mais de 90% de água em volume, e quando a água excede 95% do peso total o hidrogel é chamado de superabsorvente (SAP) (SUNG et al., 2005).

Modificações de γ -PGA produz termoplásticos com boa resistência, transparência e elasticidade (SHIH, VAN, 2001). Produtos plásticos a base de γ -PGA podem ser utilizados como filmes para proteção de sementes e plantas jovens, em reagentes para recuperação vegetal de solos em desertos e fertilizantes de liberação lenta (XU et al., 2013).

Esta variedade de aplicações tem sido sugerida na literatura para ambas as isoformas do ácido poliglutâmico, γ -PGA e α -PGA. A diferença estrutural entre ambos é caracterizada pela distribuição de peso molecular, razão entre os monômeros ácidos L-glutâmico e ácido D-glutâmico, e o mais importante, a ligação peptídica nos grupos

carboxila α ou γ (XU et al., 2013). Buescher e Margaritis (2007) descrevem a síntese química e a síntese microbiana de α -PGA. Entretanto, a síntese microbiana só pode ser realizada por tecnologia recombinante, uma vez que é difícil a produção de α -PGA por microrganismos selvagens (HO et al., 2006). No γ -PGA as ligações entre os monômeros ocorrem entre o grupo α -amina e γ -carboxila, já em α -PGA esta ligação é entre os grupos α -amina e α -carboxila (Figura 1).

Figura 1 - Estrutura molecular de duas isoformas de ácido poliglutâmico.



A - Estrutura do ácido poli-alfa-glutâmico (α -PGA) em que o ácido glutâmico está conectado através de ligações amida entre os grupos ácido α -amino e α -carboxílico.

B - Estrutura do ácido poli-gama-glutâmico (γ -PGA) em que o ácido glutâmico está conectado através de ligações amida entre os grupos ácido α -amino e γ -carboxílico.

Fonte: XU et al., 2013.

O γ -PGA é produzido, principalmente, por bactérias Gram-positivas do gênero *Bacillus* (YAO et al., 2009) e poucas bactérias produtoras do biopolímero são Gram-negativas como *Fusobacterium nucleatum* (CANDELA et al., 2009). O γ -PGA não é sintetizado como as proteínas ribossomais (OPPERMANN-SANIO, STEINBÜCHEL, 2002), sendo assim, substâncias que inibem a tradução de proteínas não afetam o γ -PGA e estes biopolímeros são resistentes a proteases que clivam ligações α -amida (CANDELA, FOUET, 2006).

A polimerização de γ -PGA ocorre através da formação de uma ligação peptídica entre os monômeros ácidos D- ou L-glutâmico, podendo ser composto por somente um ou ambos os isômeros (LUO et al., 2016). A composição enantiomérica não é constante no γ -PGA e pode ser manipulada. As condições de cultivo afetam a composição enantiomérica de γ -PGA e, portanto, suas propriedades e adequação a diferentes aplicações

(OGUNLEYE et al., 2015). Biopolímero contendo apenas um dos enantiômeros é solúvel em etanol, enquanto em quantidades equimolares de ácidos D- e L-glutâmico há precipitação de γ -PGA em etanol (CANDELA, FOUET, 2006).

A produção do biopolímero pode ocorrer através da síntese química, síntese de peptídeos, biotransformação e fermentação microbiana (SANDA et al., 2001). Dentre estes métodos, a fermentação microbiana é a mais vantajosa economicamente (LUO et al., 2016).

O peso molecular está tipicamente entre 10 e 1000 kDa, embora às vezes possa exceder 2000 kDa (ASHIUCHI et al., 2001; ZHAO et al., 2013). Entretanto, a massa molar de γ -PGA produzida por *Bacillus methylotrophicus* excedeu 10000 kDa (PENG et al., 2015). O γ -PGA de origem microbiana geralmente possui um peso molecular relativamente alto (100 kDa a 1000 kDa), podendo limitar as aplicações industriais devido à alta viscosidade, o difícil controle de parâmetros reológicos e a difícil modificação. Há diversas técnicas que podem ser empregadas para alterar a peso molecular de γ -PGA, tais como hidrólise alcalina, degradação ultrassônica, microbiana ou enzimática com objetivo de adequar o peso molecular a sua finalidade (SHIH, VAN, 2001). Birrer et al. (1994) descreveram que a massa molar de γ -PGA produzida por *B. licheniformis* poderia ser aumentada de 1600 a 2200 kDa, aumentando a concentração de cloreto de sódio no meio de cultura de 0 a 4% (g/100 mL).

Os polímeros produzidos por bactérias podem existir em várias conformações, dependendo das condições ambientais como temperatura, pH, concentração de polímero e força iônica. A estrutura do γ -PGA em solução tem sido extensivamente investigada e os trabalhos revelam diferenças consideráveis dependendo do grau de ionização do polímero. É relatado que o polímero não ionizado tem uma conformação helicoidal, enquanto o polímero ionizado se comporta como novelo randômico (SHIH, VAN, 2001).

As conformações descritas para γ -PGA são como α -hélice, β -pregueada, transição de hélice para novelo randômico, novelo randômico e envelope agregado (HO et al., 2006). Em pH neutro o biopolímero, em sua maioria, possui conformação α -hélice e em pH elevado a conformação é, predominantemente, β -pregueada (BHAT et al., 2013).

A mudança conformacional de um biopolímero afeta suas propriedades físicas. Em γ -PGA quando ocorre esta alteração pode afetar suas propriedades de ligação ao metal e, conseqüentemente, a mobilidade ambiental e a toxicidade dos metais (HE et al., 2000).

3.2 Biossíntese de γ -PGA

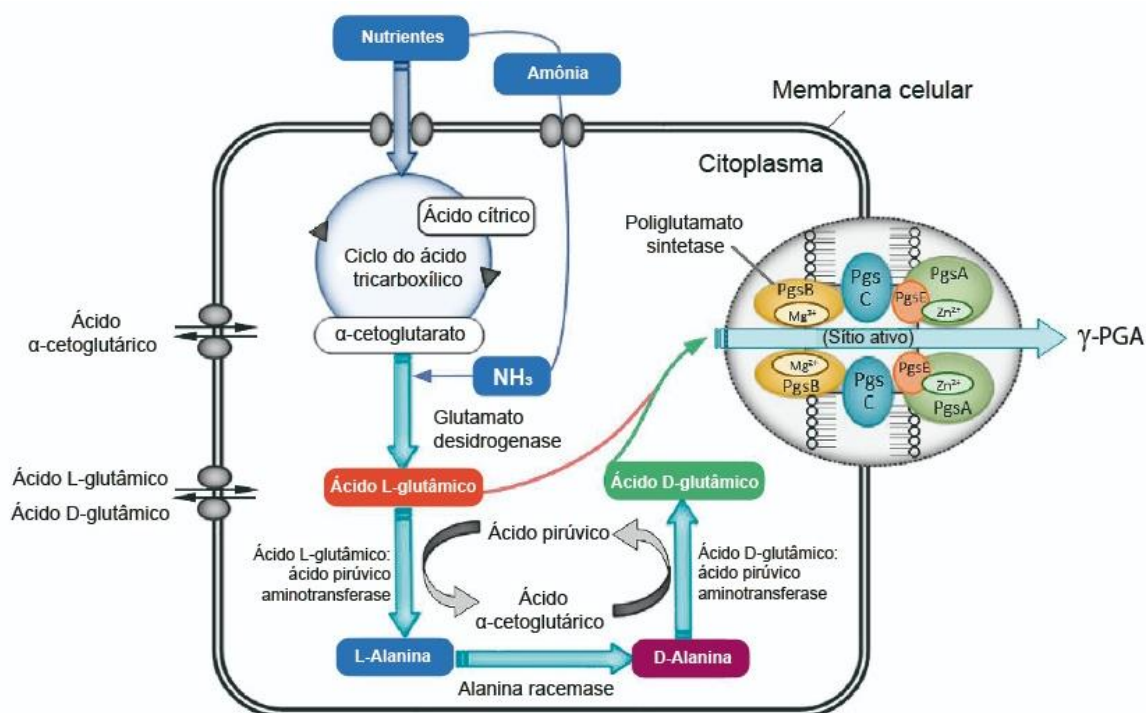
A síntese microbiana de γ -PGA ocorre no início da fase estacionária de crescimento (LAZAZZERA et al., 1999; KIMURA et al., 2004). Os monômeros de ácido glutâmico incorporados em γ -PGA podem ser derivados do meio de cultivo ou oriundos do ciclo do ácido tricarboxílico (YOON, LEE, 2002).

De acordo com os requisitos nutricionais as bactérias produtoras de γ -PGA são divididas em dois grupos. O grupo denominado dependente de ácido L-glutâmico, que inclui as bactérias que necessitam da adição de ácido L-glutâmico ao meio de cultivo, para estimular a produção de γ -PGA, enquanto o outro grupo que não requer adição extracelular de ácido L-glutâmico e é designado de independentes de ácido L-glutâmico (XU et al., 2013).

As bactérias dependentes do ácido L-glutâmico incluem *B. subtilis* RKY3, *B. subtilis* MJ80, *B. subtilis* D7, *B. licheniformis* P-104 e *B. licheniformis* WX-02 (JUNG et al., 2005; JEONG et al., 2010; WEI et al., 2010; ZHAO et al. 2013; JU et al., 2014). As bactérias independentes do ácido L-glutâmico incluem *B. licheniformis* TISTR 1010, *B. methylotrophicus* SK19.001, *B. licheniformis* TISTR 1010, *B. subtilis* C10 e *B. velezensis* NRRL B - 23189 (MORAES et al., 2012; ZHANG et al., 2012; KONGKLOM et al., 2015; PENG et al., 2015; KONGKLOM et al., 2017).

Os microrganismos utilizam duas vias para obtenção de ácido L-glutâmico (Figura 2). Nas linhagens dependentes do ácido L-glutâmico a obtenção do aminoácido utilizado para produção de γ -PGA é exógena. Entretanto, nestes microrganismos quando na presença de L-glutamina, este aminoácido pode ser convertido em ácido L-glutâmico, através da reação catalisada pela glutamina 2-oxoglutarato aminotransferase (BAJAJ, SINGHAL, 2009). O ácido L-glutâmico exógeno também pode ser convertido em L-glutamina com a ajuda da enzima glutamina sintetase (OGUNLEYE, 2015). As bactérias independentes do ácido L-glutâmico utilizam também uma outra via, onde o ácido glutâmico necessário para a produção de γ -PGA pode ser gerado a partir de fonte de carbono através do ciclo do ácido tricarboxílico (SHIH, VAN, 2001). Esta fonte de carbono é transformada em α -cetoglutarato que juntamente com o sulfato de amônio são convertidos em ácido L-glutâmico, catalisada pela glutamato desidrogenase na ausência de glutamina (BAJAJ, SINGHAL, 2009).

Figura 2 - Via de síntese do ácido γ -poliglutâmico em *Bacillus*.



Fonte: SIRISANSANEEYAKUL et al. (2017), modificado.

Outros aminoácidos exógenos pertencentes à família do ácido glutâmico, como L-arginina e L-prolina, são importados e catabolizados em ácido L-glutâmico. A enzima L-aspártico aminotransferase pode converter o ácido L-aspártico e o ácido α -cetoglutarico em ácido oxaloacético e ácido L-glutâmico, respectivamente (BELITSKY, SONENSHEIN, 1998; SHIH, VAN, 2001).

Ambas as vias podem aumentar a quantidade de ácido glutâmico na célula e causar um aumento na produção do biopolímero. Portanto, a adição de precursores de γ -PGA (e.g. L-glutamina e ácido α -cetoglutarico) ao meio de cultura e o suprimento adequado de oxigênio dissolvido aumentam a concentração final e a produtividade do biopolímero (CESARO et al., 2014).

Uma vez incorporado à célula, o ácido L-glutâmico é parcialmente convertido em ácido D-glutâmico. A racemização de ácido L-glutâmico em ácido D-glutâmico é catalisada pela enzima glutamato racemase. A conversão do ácido L-glutâmico em L-alanina também ocorre e é catalisada pelo ácido L-glutâmico pirúvico aminotransferase. Este aminoácido também pode ser racemizado em D-alanina via alanina racemase. Por fim, o aminoácido D-alanina é convertido em ácido D-glutâmico através da enzima ácido D-glutâmico pirúvico aminotransferase (SHIH et al., 2005).

O ácido L-glutâmico e o ácido D-glutâmico são então incorporados na síntese de γ -PGA (HSUEH et al., 2017). Bactérias do gênero *Bacillus* geralmente produzem γ -PGA como um copolímero aleatório contendo de ácido L- e D-glutâmico. O homopolímero γ -PGA que consiste apenas de ácido L- ou D-glutâmico também pode ser produzido, mas a ocorrência de D- γ -PGA é incomum (ASHIUCHI, 2013). A proporção dos isômeros do ácido glutâmico no γ -PGA é influenciada pela concentração de Mn^{2+} no meio de cultura de algumas espécies de *Bacillus*, pois este íon aumenta a atividade da enzima glutamato racemase (CROMWICK, GROSS, 1995; WU et al., 2006).

Dois modos distintos de polimerização de aminoácidos não-ribossômicos foram propostos, o mecanismo *thiotemplate* (KLEINKAUF, VON DOËHREN, 1996) e a ação de ligação amida (ASHIUCHI, MISONO, 2002). O mecanismo *thiotemplate* é catalisado por peptídeos sintetases não-ribossômicos (NRPSs) e o mecanismo de ligação amida é catalisado por amidas ligases típicas (EVELAND et al., 1997). As duas teorias diferentes sobre a biossíntese de γ -PGA foram postuladas, mas ainda precisam ser comprovadas (TANIMOTO, 2010).

Os genes envolvidos na produção de γ -PGA podem estar no plasmídeo ou no cromossomo (SHIH, VAN, 2001; ASHIUCHI et al., 2001). Quando o γ -PGA está associado à superfície da célula, os genes "*cap*" (cápsula) são necessários para sua produção. Mas, quando o γ -PGA é liberado para o meio, são os genes "*pgs*" (poliglutamato sintetase) que atuam no processo de polimerização (CANDELA, FOUET, 2006).

Tanto "*cap*" e "*pgs*" possuem quatro genes: *capB*, *capC*, *capA*, *capE* e *pgsB*, *pgsC*, *pgsA*, *pgsE*. Os genes *pgsBCA* são homólogos aos genes *capBCA* (SHIH, VAN, 2001; MAKINO et al., 1989), e o *pgsBCA* foi identificado como o único mecanismo responsável pela síntese de γ -PGA em espécies de *Bacillus*. O complexo *pgsBCA* ligado à membrana é altamente instável e hidrofóbico, tornando difícil seu isolamento (OGUNLEYE, 2015). O papel da *pgsE* na produção de γ -PGA é dispensável, pois na sua ausência o complexo *pgsBCA* é capaz de produzir γ -PGA (CANDELA et al., 2005). Entretanto há relato na literatura que *pgsE* é essencial na produção de γ -PGA, quando Zn^{2+} é adicionado ao meio (YAMASHIRO et al., 2011). Candela et al. (2005) afirmaram que *CapE* também é essencial para a produção de γ -PGA, pois parece interagir com *CapA*.

Em resumo, *pgsBCAE* e *capBCAE* codificam componentes do complexo sintetase na membrana. *PgsB* e *PgsC* (*CapB* e *CapC*) são responsáveis pela polimerização de γ -PGA, enquanto *PgsA* e *PgsE* (*CapA* e *CapE*) mediam o transporte de γ -PGA (ASHIUCHI et al., 1999; CANDELA et al., 2005).

O processo de síntese de γ -PGA pode ser visto como tendo quatro estágios distintos: racemização, polimerização, regulação e degradação de γ -PGA (OGUNLEYE, 2015).

Como o γ -PGA pode ser composto por ambos os isômeros de ácido glutâmico, para incorporar o ácido D-glutâmico na cadeia do biopolímero, este aminoácido é obtido através da reação de racemização do ácido L-glutâmico. Dois homólogos de racemase de glutamato, *racE*/*glr* e *yrpC*, são responsáveis por este processo (ASHIUCHI et al., 1998; ASHIUCHI et al., 1999). *RacE* é uma enzima citosólica com alta seletividade para o ácido glutâmico e tem preferência pelo ácido L-glutâmico (BUESCHER, MARGARITIS, 2007; THORNE et al., 1955). De acordo com Kimura et al. (2004), o *racE* foi importante apenas para o crescimento em meio complexo, enquanto o *yrpC* mostrou-se ativo quando as células cresceram em meio mínimo. Kada et al. (2004) consideraram *glr* essencial para a conversão de L-glutamato em D-glutamato para a síntese de γ -PGA e peptidoglicano, bem como para o crescimento de *B. subtilis*. Ashiuchi et al. (2004) mostraram que o Mn^{2+} afetou a composição enantiomérica por alterar a expressão do gene *glr*.

O mecanismo de polimerização é dependente de adenosina trifosfato (ATP) e duas etapas podem ser descritas. Primeira, um grupo carboxila terminal da cadeia γ -PGA aceita o grupo fosforil do ATP, e segunda, o grupo amino do ácido glutâmico atua como um doador nucleofílico e interage com o grupo carboxil fosforilado, resultando na formação de uma ligação amida e no alongamento da cadeia γ -PGA por um ácido glutâmico (ASHIUCHI et al., 2001). Essa reação contínua de polimerização de γ -PGA ocorre no sítio ativo do complexo sintetase (*pgsBCA*). *PgsB* e *PgsC* juntas formam a maior parte do sítio catalítico do complexo, enquanto *PgsA* remove do sítio ativo a cadeia em construção do biopolímero para que o próximo monômero possa ser adicionado (ASHIUCHI et al., 2001; URUSHIBATA et al., 2002).

A síntese de γ -PGA é regulada por dois sistemas de transdução de sinal: o regulador ComP-ComA e o sistema DegS-DegU, DegQ e SwrA (TRAN et al., 2000) O papel do DegQ foi minuciosamente investigado, e a alteração do *degQ* impede a síntese de γ -PGA e efetivamente desregula a produção de enzimas de degradação (DO et al., 2011). No entanto, a relação entre SwrA e DegU permanece pouco compreendida (LUO et al., 2016). No geral, DegSU, DegQ e ComPA parecem estar envolvidos na regulação da transcrição em resposta ao mecanismo de *quorum sensing*, osmolaridade e variação de fase, enquanto o SwrA parece atuar no nível pós-transcricional (STANLEY, LAZAZZERA, 2005).

Existem duas enzimas capazes de degradar γ -PGA em *Bacilli*: endo- γ -glutamil peptidase e exo- γ -glutamil peptidase (OBST, STEINBUCHER, 2004). A endo- γ -glutamil peptidase pode ser secretada no meio por *B. subtilis* e *B. licheniformis*, onde é capaz de clivar γ -PGA de alto peso molecular (KING et al., 2000; KIMURA et al., 2004; YAO et al., 2009). O gene que codifica a endo- γ -glutamil peptidase (*ywtD*, *dep* ou *pgdS*) está localizado diretamente a jusante e na mesma direção do *operon pgsBCA* (BUESCHER, MARGARITIS, 2007).

A exo- γ -glutamil peptidase é uma enzima essencial no metabolismo da glutatona e catalisa a formação de dipeptídeos e tripeptídeos do ácido γ -glutâmico *in vitro*, mas não parece estar envolvido na síntese de γ -PGA *in vivo* (XU, STRAUCH, 1996; ASHIUCHI et al., 2003). O gene que codifica a exo- γ -glutamil peptidase (*ggt* ou *capD*) está localizado no cromossomo distante do conjunto *pgsBCA* na maioria das bactérias formadoras de γ -PGA e em um plasmídeo em *B. anthracis* (UCHIDA et al., 1993). Em *B. anthracis*, essa enzima é necessária para a ancoragem de γ -PGA na parede celular, mas não para a síntese de γ -PGA (CANDELA, FOUET, 2005).

Como mencionado, o γ -PGA pode ser ancorado na superfície bacteriana ou liberado no meio, e o *CapD* catalisa a ancoragem do γ -PGA no peptidoglicano, enquanto o *PgsS* catalisa sua liberação (CANDELA, FOUET, 2006).

3.3 Processos fermentativos para produção de γ -PGA

No processo de fermentação industrial os substratos sólidos ou líquidos são convertidos em produtos de valor agregado, através da produção de metabólitos secundários ou enzimas de microrganismos (CHISTI, 1999; DURAND, 2003; VANDENBERGHE et al., 2000).

O processo de fermentação em estado sólido (FES) e fermentação submersa (FS) são amplamente utilizados nas indústrias, incluindo biotecnologia, química, fertilizantes, alimentos e produtos farmacêuticos (ASHOK et al., 2017). FES e FS são as duas técnicas que estão sendo usadas em vários países ao longo do tempo para obter vários bioprodutos importantes (BALLARDO et al., 2016; MITCHELL et al., 2000; VANDENBERGHE et al., 2000). A maioria dos bioprodutos é produzida usando FS, mas pesquisas recentes mostram que a FES fornece melhor rendimento e viabilidade econômica (BATTOOL et al., 2015; BEHERA, RAY, 2016; YAZID et al., 2016).

O crescimento dos microrganismos na fermentação submersa ocorre em meio líquido contendo os nutrientes necessários para seu crescimento e produção. Este processo envolve o cultivo dos microrganismos em reator fechado, contendo o meio de cultivo e uma alta concentração de oxigênio. A FS apresenta algumas desvantagens como alto custo e geração de grandes quantidades de efluentes (DORIYA et al., 2016). Na produção de γ -PGA em FS um dos empecilhos é o aumento da viscosidade, que diminui a transferência de oxigênio e reflete no crescimento celular e produção do biopolímero (OGAWA et al., 1997).

O FES é amplamente utilizado em vários processos, como biorremediação, biodetoxificação de vários compostos perigosos, produção de várias enzimas terapêuticas, metabólitos secundários e como uma alternativa eficaz à FS (DORIYA et al., 2016).

A FES é um processo de fermentação no qual é usado um material sólido não solúvel que atua como suporte físico e como fonte de nutrientes para o crescimento de microrganismos (PATNALA et al., 2016). Algumas desvantagens da FES são as taxas de transferência de calor e massa. Os substratos comuns usados para FES são farelo de trigo, farelo de arroz, farelo de soja e bagaço de cana de açúcar. Parâmetros físicos e químicos desempenham um papel importante em qualquer processo de fermentação como aeração, teor de umidade e pH (MIENDA, IDI, UMAR, 2011; RAIMBAULT, 1998). As otimizações dos meios e parâmetros físico-químicos são feitas usando várias técnicas estatísticas (PASSARINI et al., 2013). Na Tabela 1 são apresentadas as principais vantagens da FES em comparação com a FS.

Tabela 1 - Vantagens gerais da fermentação em estado sólido (FES) sobre a fermentação submersa (FS) (continua)

Fator	FES	FS
Substrato	Resíduos agroindustriais mais baratos	Componentes para o meio mais caros
Condições assépticas	Moderada	Alta
Umidade	Faixa (30-70% (p/v))	Meio líquido (alta)
Agitação ^a	Desafiador	Fácil

Tabela 1 - Vantagens gerais da fermentação em estado sólido (FES) sobre a fermentação submersa (FS) (conclusão)

Fator	FES	FS
Controle de temperatura e pH ^a	Desafiador	Fácil
Contaminação	Baixa probabilidade	Alta probabilidade
Rendimento	Alto	Moderado
Processamento (Recuperação e purificação)	Fácil, barato, consome menos tempo, fácil separação do bioproduto	Difícil, dispendioso, mais demorado, separação do bioproduto mais difícil
Resíduos líquidos	Nenhum	Grande quantidade
<i>Scale-up</i> ^a	Desafiador	Fácil e disponível
Volume e custo do equipamento	Pequenos reatores e baixo custo	Reatores grandes e alto custo
Biomassa	Utilização máxima (<i>e.g.</i> ração animal, biocombustíveis e fertilizantes etc.)	Utilização mínima ou sem utilização
Transferência de massa ^a	Difícil de controlar	Mais fácil de controlar

^aOs desafios acima na FES podem ser superados utilizando um novo modelo de design de biorreator de FES. Fonte: Ashok et al. (2017).

O principal problema encontrado durante a produção fermentativa de γ -PGA em FS é um aumento significativo na viscosidade do meio de cultivo, resultando em espuma incontrolável. Existem também limitações da transferência de massa de oxigênio (CROMWICK et al., 1996). Além disso, os custos relativamente altos dos componentes do meio em FS a torna um processo caro. A FES oferece uma alternativa para resolver muitos problemas e também reduz os requisitos de energia. Na Tabela 2 são apresentados estudos para produção de γ -PGA em FES.

Tabela 2 - Produção de γ -PGA em fermentação em estado sólido (FES)

Linagem	Nutrientes	Rendimento de γ -PGA (g/kg)	Referências bibliográficas
<i>B. licheniformis</i> NCIM 2324	Farelo de soja, ácido cítrico, ácido glutâmico (NH ₄) ₂ SO ₄ , glicerol, L-glutamina, ácido γ -cetoglutárico	98,64	Bajaj et al. (2008)
<i>B. subtilis</i> ME714	Glutamato de sódio, citrato de ureia trissódico, amido	75,30	Wu et al (2007)
<i>B. subtilis</i> CCTCC202048	Torta de soja em pó, farelo de trigo, ácido glutâmico, ácido cítrico, NH ₄ NO ₃	83,61	Xu et al., (2005 ^a), Xu et al., (2005 ^b)
<i>B. subtilis</i> CCTCC202048	Estrume suíno, torta de soja, farelo de trigo, ácido glutâmico, ácido cítrico	60,00	Chen et al. (2005 ^a)
<i>B. subtilis</i> CCTCC202048	Estrume bovino, farelo de trigo, torta de soja, ácido glutâmico	47,00	Chen et al. (2005 ^b)

Fonte: Bajaj, Singhal, (2011).

Um substrato recorrente na fermentação em estado sólido é a soja. Zeng et al. (2013) usaram resíduo de soja e melaço de cana para produzir 103,5 g/kg de γ -PGA em 24 h sob condições não esterilizadas. *B. subtilis* CCTCC202048 foi investigado por Jian et al. (2005) para a produção de γ -PGA em fermentações em estado sólido (FES) utilizando torta de soja em pó e farelo de trigo como substratos. Yong et al. (2011) utilizaram torta de soja, farinha de milho, resíduos de produção de glutamato monossódico, farelo de trigo, torta de colza, ácido cítrico e outros sais para produção de γ -PGA obtendo 3,38% (p/p), razão entre o peso de γ -PGA e o meio sólido total.

3.4 Soja

A soja é uma planta herbácea originária do leste da Ásia, na China, onde é utilizada para alimentação há mais de 2000 anos (FUKUSHIMA, HASHIMOTO, 1980; HYMOWITZ, 1970). Segundo Sedyama (2009) a soja pertence ao filo Magnoliophyta,

classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae (Leguminosae), subfamília Faboideae (Papilionoideae), gênero *Glycine*, espécie *Glycine max*.

A soja cultivada atualmente, *Glycine max* (L.) Merrill, é o resultado do processo evolutivo que ocorreu através do cruzamento natural de duas espécies selvagens de soja, que foram sendo modificadas e domesticadas pelo homem (EMBRAPA, 2008). Os primeiros estudos científicos feitos com soja são datados de 1879, no *Rutgers Agricultural College*, em New Jersey (FEDERIZZI, 2005).

No Brasil o primeiro registro da introdução da soja é de 1882 na Bahia, quando o professor Gustavo Dutra da Escola de Agronomia da Bahia realizou estudos com cultivares oriundos dos Estados Unidos (VERNETTI, 1983; EMBRAPA, 2005), posteriormente, a soja foi cultivada na região sudeste, no Instituto Agronômico de Campinas (IAC) em 1892, onde apresentou melhor adaptação em decorrência das condições climáticas mais semelhantes as regiões tradicionais de cultivo (VERNETTI, 1983; LEAL, 1967).

Há registros do cultivo de soja no Rio Grande do Sul em 1914, mas somente na década de 40 a soja começou a ter importância econômica, entretanto, o aumento significativo na produtividade ocorreu na década de 70 com a introdução de novas tecnologias (TANAKA et al., 1993; BARROS, 1999; EMBRAPA, 2005). A partir da década de 80, as políticas públicas, o baixo valor das terras e o desenvolvimento de cultivares adaptados às condições edafoclimáticas específicas permitiram a expansão das áreas de cultivo de soja para o centro-oeste (EMBRAPA, 2005).

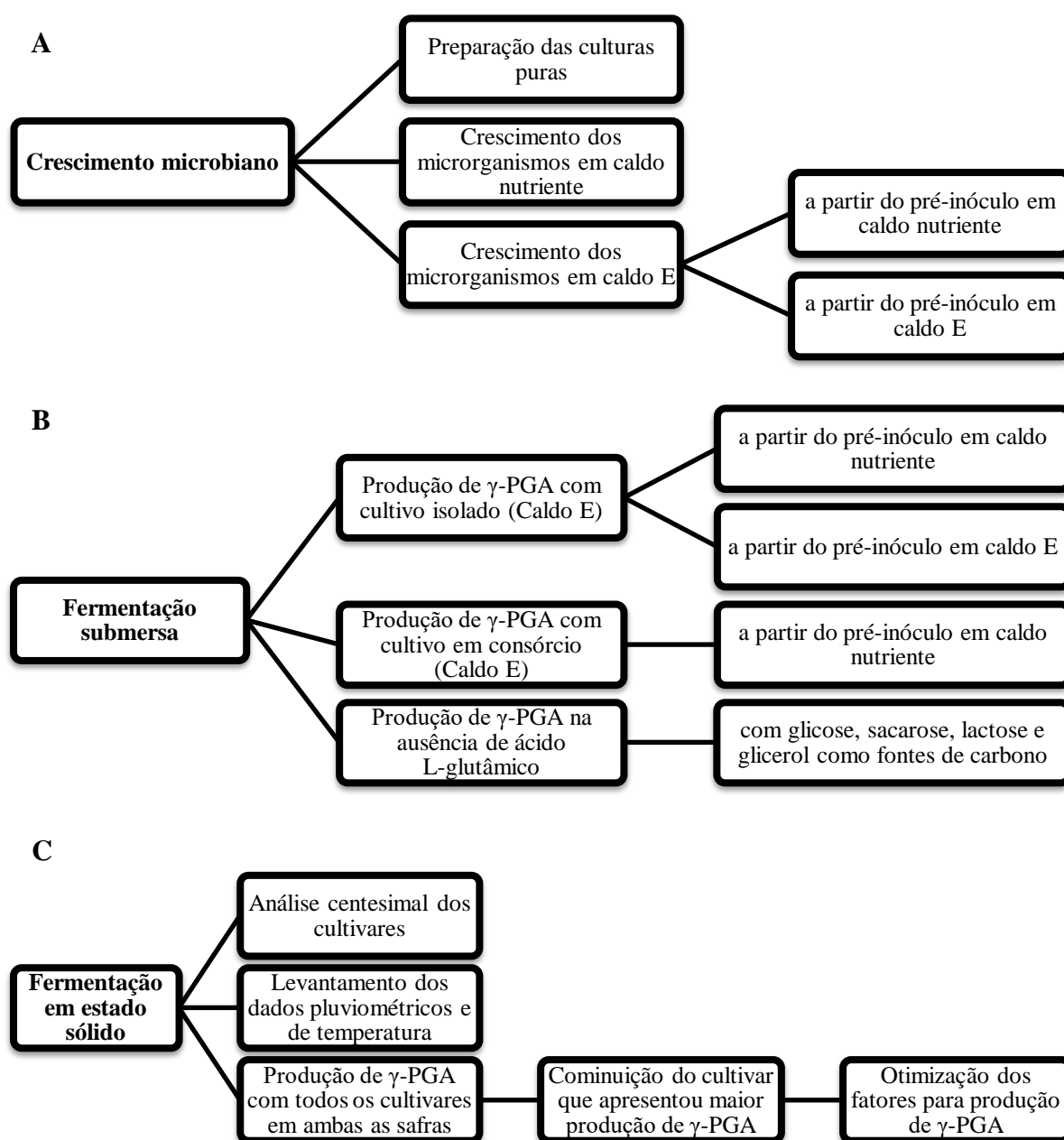
A produção de soja no Brasil, que tem a maior produção mundial, na safra de 2019/2020 foi de 126,00 milhões de toneladas à frente do Estados Unidos com 96,68 milhões de toneladas. Estima-se que a safra 2020/2021 no Brasil seja de 131 milhões de toneladas (USDA, 2020).

A soja apresenta capacidade de produzir uma grande variedade de produtos para alimentação humana e animal (GRAU et al., 2005), possui alto valor nutritivo e é fonte de proteínas de alta qualidade (FUKUSHIMA, 2001).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O andamento experimental foi conduzido em três etapas (Figura 3). Inicialmente foi realizado o estudo do crescimento microbiano, seguido pela produção de γ -PGA em fermentação submersa e fermentação em estado sólido.

Figura 3 - Fluxograma do andamento experimental. Crescimento microbiano (A), fermentação submersa (B) e fermentação em estado sólido (C).



4.1 Estudo do crescimento microbiano

Foram utilizadas duas linhagens de *Bacillus* para a produção de γ -PGA. As linhagens foram cedidas pelo Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e pertenciam à Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatados (CCGB). As espécies selecionadas foram *Bacillus subtilis* CCGB 0404 (NCTC 3610) e *Bacillus licheniformis* CCGB 0407 (NCTC 10341). Todas as linhagens possuem crescimento ideal em caldo nutriente com temperatura de 33 °C e pH entre 6,8 e 7,2. O tempo de incubação recomendado é de 24 h em aerobiose. As características bioquímicas das duas linhagens do gênero *Bacillus* são apresentadas no Anexo 1.

O meio utilizado para crescimento dos microrganismos foi o caldo nutriente acrescido de 0,3% de extrato de levedura. As fitas contendo esporos das duas linhagens de *Bacillus* foram transferidas para 50 mL dos meios estéreis e incubadas a 33 °C por 48 h em agitação orbital de 150 rpm. Alíquotas dos meios foram coletadas e pipetadas em microtubos de 1,5 mL. Os microtubos foram centrifugados a velocidade de 7900 rpm em temperatura de 4 °C por 5 min. O sobrenadante foi descartado, substituído por solução salina 0,85% estéril e com auxílio de agitador mecânico do tipo Vortex, as células bacterianas foram ressuspensas. O procedimento de centrifugação e lavagem das células bacterianas com solução salina foi realizado duas vezes. Após a segunda lavagem os microtubos foram centrifugados, a solução salina 0,85% descartada, substituída por caldo nutriente estéril e suplementados com glicerol estéril (20% v/v). Os microtubos foram estocados a -25 °C (Figura 4A).

Para determinar o crescimento bacteriano em diferentes meios utilizou-se a técnica de espectrofotometria de absorção no UV-visível (UV-vis). A turbidez foi quantificada ao longo do crescimento em comprimento de onda de 600 nm (CESARO et al., 2014).

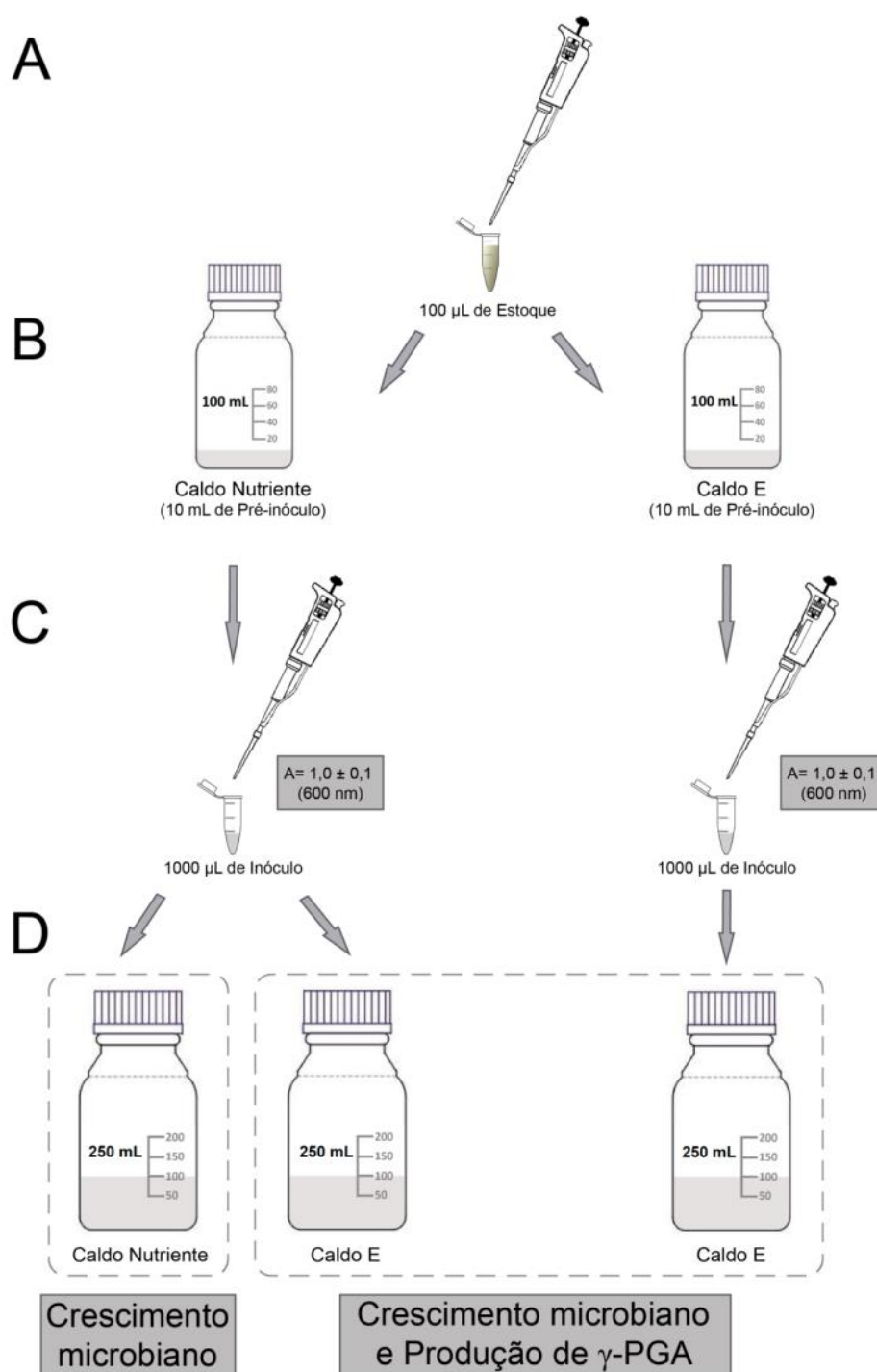
O pré-inóculo constitui-se da ativação das culturas após estocagem. Estes foram preparados em dois meios de cultura, caldo nutriente e caldo E. O caldo nutriente é composto por 5,0 g L⁻¹ de digestão peptídica de tecido animal, 5 g L⁻¹ cloreto de sódio, 1,5 g L⁻¹ extrato de carne e 1,5 g L⁻¹ extrato de levedura, ajustado o pH em 7,0. O caldo E é composto por 20 g L⁻¹ de ácido L-glutâmico, 12 g L⁻¹ ácido cítrico, 80 g L⁻¹ glicerol, 7 g L⁻¹ cloreto de amônio, 0,5 g L⁻¹ fosfato dipotássico, 0,5 g L⁻¹ sulfato de magnésio, 0,04 g L⁻¹ cloreto férrico, 0,15 g L⁻¹ cloreto de cálcio e 0,42 g L⁻¹ sulfato de manganês (LEONARD et al., 1958). Para ajustar o pH em 7,0 foi utilizado NaOH em solução saturada.

Foram distribuídos 10 mL destes meios, em frasco Erlenmeyer de 100 mL com tampão de algodão hidrofóbico e gaze, e esterilizados a 121 °C por 15 min. A partir da cultura estoque foram pipetados 100 µL das diferentes linhagens de *Bacillus* e incubados em agitação orbital a 33 °C e 150 rpm até a turvação do caldo (Figura 4B).

Após incubação do pré-inóculo procedeu à preparação do inóculo. O inóculo foi padronizado para absorvância igual a $1,0 \pm 0,1$, medida em espectrofotômetro a 600 nm (CESARO et al., 2014). Para a padronização do inóculo foi lida a absorvância do pré-inóculo em caldo nutriente e caldo E, para cada linhagem de *Bacillus* e realizadas as diluições em seus respectivos meios para atingir a absorvância desejada (Figura 4C).

Para definir o meio de cultura mais adequado para a preparação do pré-inóculo e inóculo, em duplicata, o crescimento das linhagens foi realizado em caldo nutriente e caldo E (Figura 4D). A inoculação foi realizada na concentração de 1% (v/v) e as culturas incubadas a 33 °C e 150 rpm, sendo inicialmente retiradas amostras em intervalos de 60 min nas primeiras oito horas e posteriormente a cada 24 h para determinação da curva de crescimento.

Figura 4 - Representação experimental em caldo nutriente e caldo E.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Fermentação submersa (FS)

A avaliação da capacidade na produção de γ -PGA das duas linhagens de *Bacillus* foi conduzida em triplicata em caldo E e os valores foram expressos como média \pm desvio

padrão. Teste t foi realizado para determinar a significância. Um nível de probabilidade de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O caldo E é o meio de cultivo utilizado para a produção do ácido γ -poliglutâmico. Os inóculos de caldo nutriente e caldo E foram inoculados, isoladamente, em 100 mL de caldo E na concentração de 1% (v/v) para cada linhagem (Figura 4D). Os cultivos foram incubados a 33 °C e 150 rpm, sendo que foram retirados 10 mL de amostras em intervalos de 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h para determinação da concentração de γ -PGA (SILVA, 2010).

Após estabelecer o meio de cultivo do inóculo que apresentou maior produção do biopolímero, *Bacillus subtilis* e *Bacillus licheniformis* foram cultivados em consórcio para obtenção de γ -PGA. Alíquotas de 500 μ L do inóculo, de cada linhagem de microrganismo, foram coletadas e adicionadas em 100 mL de caldo E, e as mesmas condições utilizadas no cultivo isolado foram aplicadas.

As bactérias capazes de produzir γ -PGA podem ser divididas em dependentes ou independentes, de acordo com a presença ou ausência de ácido L-glutâmico no meio de cultivo, respectivamente (ITO et al., 1996).

Verificou-se a produção de γ -PGA na ausência de ácido L-glutâmico e os efeitos das fontes de carbono através do cultivo em meio M. O meio M é composto por 7,5% (p/v) de fonte de carbono, 1,8% (p/v) de cloreto de amônio (NH_4Cl), 0,15% (p/v) fosfato dipotássico (K_2HPO_4), 0,035% (p/v) sulfato de magnésio (MgSO_4), 0,005% (p/v) sulfato de manganês (MnSO_4) e 3,0% (p/v) carbonato de cálcio (CaCO_3) em pH 7,0 (ITO et al., 1996). Utilizou-se como fontes de carbono a glicose, sacarose, lactose e glicerol. As condições de cultivo foram às mesmas da produção de γ -PGA em cultivo isolado e em consórcio, entretanto, limitando-se a 96 h de cultivo.

4.3 Fermentação em estado sólido (FES)

4.3.1 Estudo da soja

Para a produção γ -PGA três cultivares de soja desenvolvidos pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) foram utilizados, sendo dois cultivares transgênicos de diferentes gerações e um cultivar convencional. O cultivar convencional foi o BRS 232, o cultivar transgênico de primeira geração, tolerante ao herbicida glifosato, foi o BRS 360 RR e o cultivar de segunda geração que apresenta resistência a insetos e

tolerância ao herbicida glifosato foi BRS 1001 IPRO. Os grãos de soja não receberam quaisquer tipos de tratamentos químicos ou biológicos após a colheita.

Para os resultados apresentarem reprodutibilidade utilizaram-se cultivares de duas safras distintas (2015 e 2016), obtidas no estado de São Paulo entre novembro e abril. O cultivar de soja BRS 232 foi cultivado no município de Altair, São Paulo, entre dezembro/2014 e abril/ 2015 (safra 2015) e no município de Miguelópolis, São Paulo, entre novembro/2015 e março/2016 (safra 2016). A safra 2015 do cultivar de soja BRS 360 RR foi cultivada no município de Nova Europa, São Paulo, entre janeiro/2015 e abril/2015 e a safra 2016 foi cultivada no município de Araraquara, São Paulo, entre dezembro/2015 e abril/2016. O cultivar de soja BRS 1001 IPRO foi cultivado nos municípios de Matão e Araraquara, no período de dezembro/2014 a abril/2015 (safra 2015) e de dezembro/2015 a abril/2016 (safra 2016), respectivamente.

Como os fatores climáticos interferem na composição centesimal da soja, os dados de precipitação total (mm) e temperatura média compensada (°C) foram obtidos no período de cultivo da soja estudada. Os dados de precipitação total foram obtidos no Portal do Departamento de Águas e Energia Elétrica (DAAE), estado de São Paulo, através do Banco de Dados Hidrológicos (DAAE, 2019). Já os dados da temperatura média compensada foram obtidos no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), através do Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP) (INMET, 2019).

Em parceria com o Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), foi realizada a análise centesimal dos cultivares de soja. Os ensaios para análise da composição centesimal foram realizados em duplicata, para verificar a quantidade de umidade e voláteis, proteínas, lipídios totais, carboidratos totais e cinzas.

Para quantificação de umidade e voláteis utilizou-se da diferença gravimétrica, onde aproximadamente 5 g de amostra foram submetidas à temperatura de 130 °C por 2 h (FIRESTONE, 2014). As cinzas foram determinadas mediante a pesagem de 5 g de amostra, levadas à mufla para calcinação a temperatura de 550 °C ± 10 °C até apresentar coloração branca ou acinzentada (LATIMER, 2012).

Para lipídios totais fez-se uso de 5 g de amostra, envolta em duas camadas de papel filtro que seguiu para extração com o solvente n-hexano utilizando extrator tipo Butt (FIRESTONE, 2014). O método mais utilizado para dosagem de proteínas é o método Kjeldahl (CECCHI, 2003). O teor de proteína com 0,3 g de amostra foi direcionado na determinação total de nitrogênio e a conversão para conteúdo de proteína efetuada através de um fator pelo fator de conversão igual a 6,25 (ZENEON, PASCUET, 2005).

O teor de carboidratos foi determinado através da soma dos números correspondentes às percentagens de umidade, cinzas, proteína e lipídios. Dessa forma foi diminuído o número obtido de cem, sendo esta diferença correspondente ao valor de carboidrato em 100 gramas do produto (CECCHI, 2003).

4.3.2 Produção de γ -PGA utilizando soja como substrato

A avaliação da capacidade na produção de γ -PGA das duas linhagens de *Bacillus* nos três cultivares foi conduzida em triplicata e os valores foram expressos como média \pm desvio padrão. Os ensaios foram conduzidos em frasco Erlenmeyer de 250 mL com tampão de algodão hidrofóbico e gaze. Foram selecionados, aproximadamente, 10 g de grãos de soja inteiros (peso seco), imersos em determinado volume de água destilada com pH 7,0 necessário para obter umidade inicial do substrato de 60% e deixado sob refrigeração a 10 °C por 18 h. (UEDA, 1989; KIUCHI, WATANABE, 2004, modificado). Os grãos foram autoclavados por 60 min à 130 °C e resfriados até a 50 °C para serem inoculados (SHA, YANG, CHEN, 2004).

O inóculo padronizado, na concentração de 10%, foi distribuído sob condições assépticas sobre toda superfície do substrato e, posteriormente, incubado à temperatura de 33 °C por 48 h em modo estático (CHEN et al., 2005^a, modificado). Para interromper o processo de fermentação, a mistura foi refrigerada por 8 h, em temperatura entre 3 °C e 10 °C, com baixa umidade (UEDA, 1989; KIUCHI, WATANABE, 2004).

Após os ensaios fermentativos iniciais com todos os cultivares, procedeu a cominuição e fermentação do cultivar que apresentou maior produção de γ -PGA. Os grãos de soja foram cominuídos em Moinho de Facas tipo Willey e peneirados com peneiras granulométricas Tyler em malha 16 (fração fina), malha 9 (fração média) e malha 4 (fração grossa).

4.4 Maximização da produção de γ -PGA

Para maximizar o processo de produção de γ -PGA em FES os fatores como teor inicial de umidade, volume do inóculo, quantidade de substrato e temperatura foram avaliados. Realizou-se ensaios de acordo com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para os quatro fatores, totalizando 31 ensaios com 7 repetições no ponto central. Para obtenção dos valores foi utilizado o *software* Minitab. Na Tabela 3 são

mostrados os valores codificados e originais dos fatores. O pH dos substratos foi ajustado a 7,0 e todos foram incubados por 48 horas em modo estático.

Tabela 3 - Valores codificados e originais que foram utilizados no DCCR para avaliar efeito do teor inicial de umidade, volume do inóculo, quantidade de substrato e temperatura para a produção de γ -PGA em FES

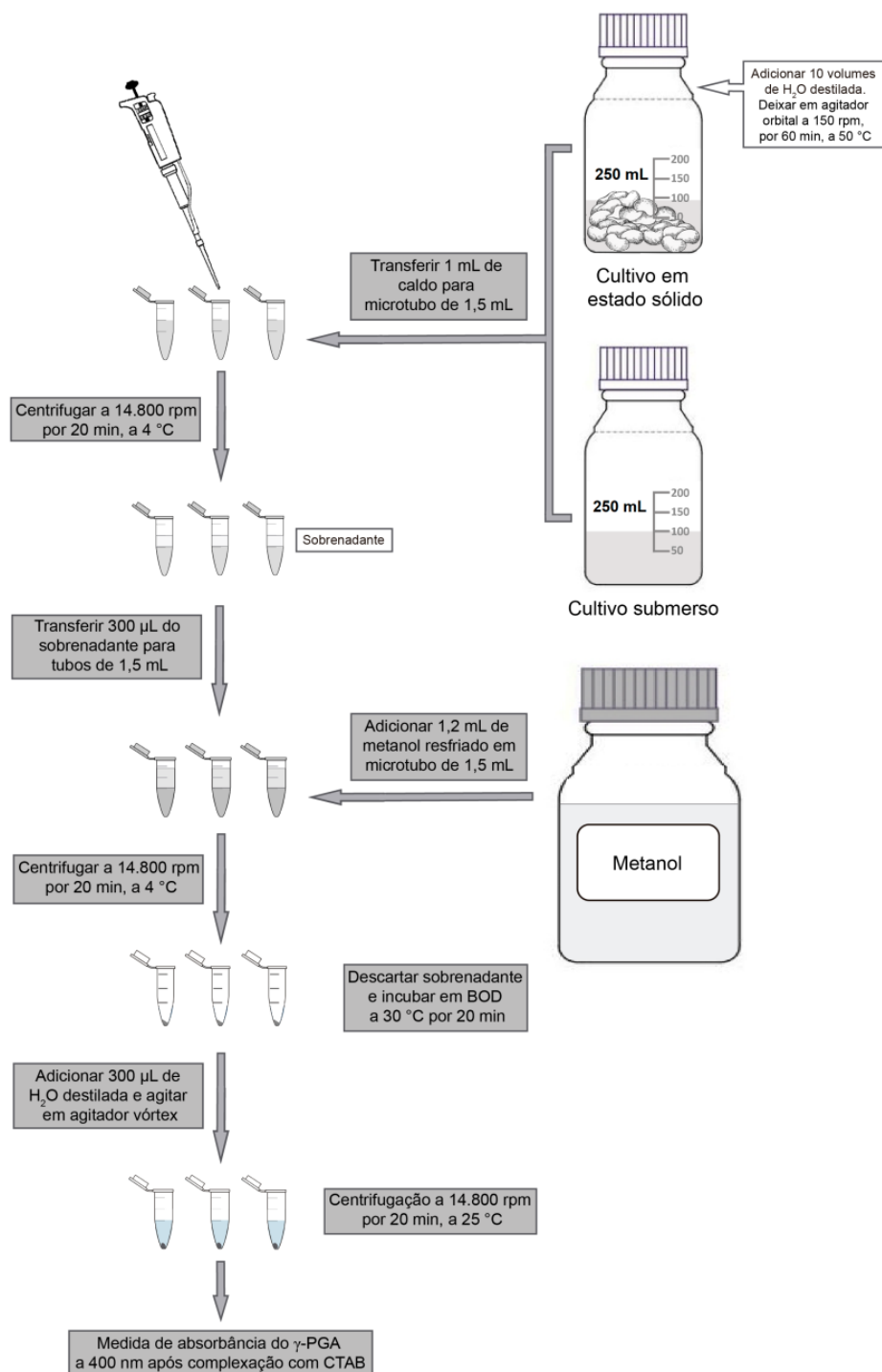
Variável	-2	-1	0	+1	+2
Teor inicial de umidade (%)	40	45	50	55	60
Volume do inóculo (%)	10	15	20	25	30
Quantidade de substrato (g)	5	10	15	20	25
Temperatura (°C)	31	33	35	37	39

4.5 Extração e quantificação de γ -PGA

Para a determinação de γ -PGA na fermentação em estado sólido, foram adicionados no substrato fermentado três volumes de água destilada (p/v) (baseado no peso seco inicial do substrato) com pH 7,0 e mantido sob temperatura de 28 ± 1 °C em agitador orbital a 200 rpm por 60 min. Todo conteúdo foi filtrado utilizando oito camadas de gaze para obtenção do caldo com γ -PGA (BAJAJ et al., 2008, modificado).

Para extração de γ -PGA em FS e FES, alíquota de 1,0 mL do caldo fermentado foi transferida para microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 14.800 rpm, por 20 min a temperatura de 4 °C para remoção das células bacterianas. Foram coletados 300 μ L do sobrenadante e adicionados em 1,2 mL de metanol resfriado (1:4 v/v). O microtubo foi agitado manualmente e deixado em repouso por 10 min sob temperatura de 4 °C. Para precipitação de γ -PGA bruto, o microtubo foi centrifugado novamente a 14.800 rpm, por 20 min a temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o microtubo foi deixado invertido em estufa BOD a 30 °C por 20 min para evaporação do metanol. Para remover substâncias insolúveis foi adicionado 300 μ L de água destilada e procedeu a centrifugação a 14.800 rpm, por 20 min a temperatura de 25 °C e o sobrenadante, solução aquosa de γ -PGA bruto, foi coletado (Figura 5) (GOTO, KUNIOKA, 1992; ZENG et al., 2012).

Figura 5 - Esquema de extração e quantificação do ácido γ -poliglutâmico.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A quantificação de γ -PGA foi realizada através do método espectrofotométrico UV-vis de complexação com brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (KANNO, TAKAMATSU, 1955). A solução CTAB necessária para a quantificação de γ -PGA deve apresentar concentração de 0,1 M. Esta solução foi homogeneizada com solução de cloreto

de sódio (NaCl) na concentração de 1M em mesmo volume. Em microtubo de 2 mL foram adicionados 300 µL de solução aquosa de γ -PGA bruto, 1,2 mL de solução tampão fosfato pH 7,0 e 300 µL de CTAB 0,1M/NaCl 1M (1:4:1 v/v). O conteúdo foi mantido em banho ultrassônico com temperatura de 30 °C por 25 min. O complexo formado provoca uma turvação do meio, que é proporcional à concentração de γ -PGA presente, sendo possível a quantificação desse composto via espectrofotometria a 400 nm, mediante utilização de um padrão analítico (KANNO, TAKAMATSU, 1955; BRITO, 2014). Para construção da curva padrão foi utilizado o ácido γ -poliglutâmico na forma de sal de sódio, segundo o método adaptado de Kanno e Takamatsu (1995) e Brito (2014).

4.6 Avaliação estatística

Os experimentos em FS e FES foram realizados em triplicata e os valores foram expressos com a média \pm desvio padrão. O teste t foi realizado para determinar a significância dos resultados. Nível de probabilidade $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A análise dos resultados do DCCR, para maximização da produção de γ -PGA, foi realizada através da significância ($p < 0,05$) dos fatores e suas interações. A análise de variância (ANOVA) dos fatores significativos foi realizada para obtenção de um modelo para predição da produção de γ -PGA, a partir da análise de regressão dos dados experimentais (Equação 1).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i>j} \beta_{ij} x_i x_j$$

Equação 1

Para interpretação da equação considera-se y a resposta de predição da produção de γ -PGA, β_0 , β_i , β_j e β_{ij} são os coeficientes de regressão, k é o número de fatores e x_1 e x_2 são os fatores independentes.

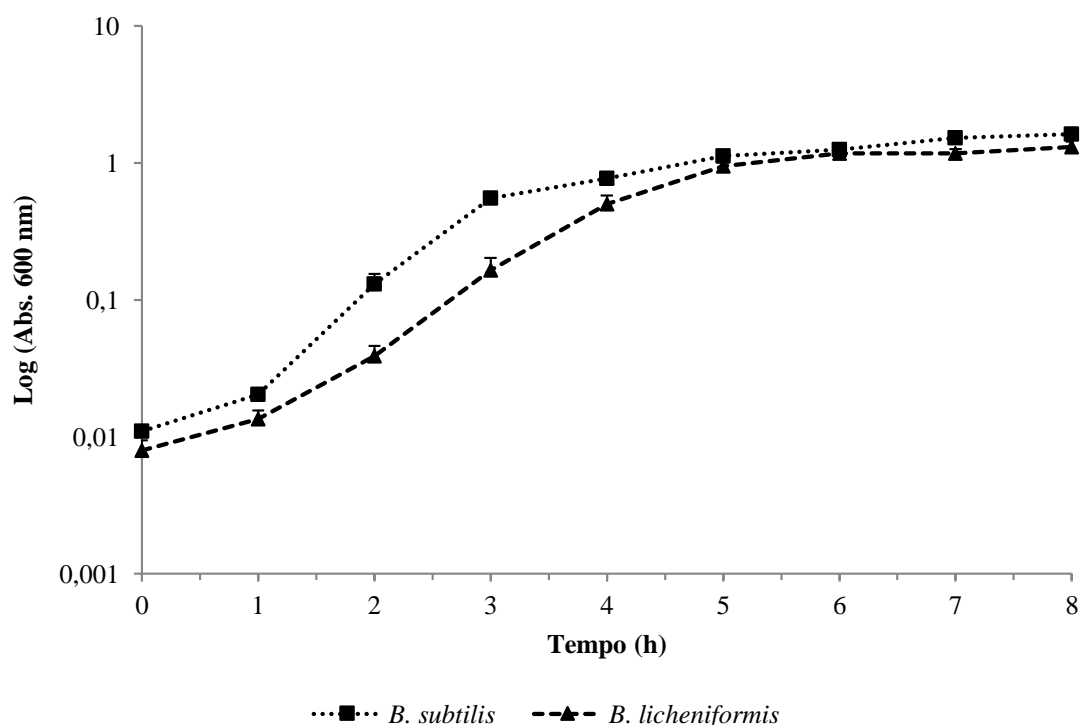
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo do crescimento microbiano

O crescimento microbiano do pré-inóculo em caldo nutriente e caldo E foi avaliado. O caldo nutriente foi utilizado para preparação do pré-inóculo, inóculo, meio de cultivo e nestas condições as bactérias atingiram a absorvância superior a um em até 24 h de crescimento na preparação do pré-inóculo.

O estudo do crescimento dos microrganismos em caldo nutriente permitiu entender a dinâmica de crescimento em condições ideais. Na Figura 6 estão apresentados os valores de crescimento em período de 8 h de cultivo em caldo nutriente.

Figura 6 - Curva de crescimento microbiano em caldo nutriente no período de 8 h.



A partir dos dados de crescimento durante 8 h em caldo nutriente, foi estabelecida a velocidade específica de crescimento (μ) de cada microrganismo e apresentada na Tabela 4.

Tabela 4 - Velocidade específica de crescimento das duas linhagens de *Bacillus* cultivadas em caldo nutriente

Microrganismo	Velocidade específica de crescimento μ (h^{-1})	Coefficiente de determinação (R^2)
<i>B. subtilis</i>	0,6353	0,8272
<i>B. licheniformis</i>	0,7061	0,8952

É possível estabelecer que, em condições favoráveis, nas primeiras oito horas de crescimento *B. licheniformis* apresenta velocidade específica de crescimento superior a *B. subtilis*. Entretanto como a velocidade específica de crescimento foi mensurada somente para o período de 8 h, e verificou-se que a fase de crescimento se apresenta até 24 h de cultivo, é possível que haja uma variação nos valores de velocidade específica de crescimento dos dois microrganismos ao longo deste período.

O crescimento máximo das linhagens de *Bacillus* ocorreu em 24 h, quando *B. licheniformis* apresentou maior absorbância de 4,3 seguido por *B. subtilis* com 4,0. Após 24 h de crescimento os microrganismos iniciaram a fase estacionária seguida pela fase de declínio. *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* exibiram em 24 h crescimentos muito próximos, estatisticamente iguais, e após este período *B. licheniformis* demonstrou um declínio no número de células mais acentuado.

Verificou-se o crescimento dos microrganismos neste meio para compreender a relação de crescimento microbiano e produção de γ -PGA, além de examinar a importância do pré-inóculo no crescimento das linhagens de *Bacillus* e na produção do biopolímero.

O crescimento das bactérias no pré-inóculo em caldo E necessitou de tempo maior para atingir absorbância superior a um, quando comparado com o pré-inóculo em caldo nutriente. *Bacillus subtilis* atingiu absorbância superior a um após 48 h de cultivo e *B. licheniformis* atingiu esta absorbância após 72 h.

Na Figura 7 são apresentadas as curvas de crescimento durante 8 h de cultivo em caldo E, a partir dos diferentes pré-inóculos estudados. É possível perceber que os microrganismos tiveram crescimento superior quando ativados anteriormente em pré-inóculo em caldo E. Isto se justifica, pois, a velocidade específica de crescimento dos microrganismos ativados em pré-inóculo E foi superior à dos mesmos microrganismos ativados em pré-inóculo em caldo nutriente.

Isto ocorre, pois, o uso do mesmo meio para o pré-inóculo, inóculo e cultivo auxilia na adaptação das células nas primeiras horas do crescimento (SILVA, 2010). Por isso,

quando as bactérias foram ativadas em pré-inóculo em caldo E e depois inoculadas no mesmo meio, os microrganismos responderam mais rapidamente ao crescimento, uma vez que não foi necessária adaptação a este meio.

Zhu et al. (2019) estudaram a produção de γ -PGA em meio contendo principalmente glicose e ácido glutâmico, e encontraram a velocidade específica máxima de crescimento de *B. subtilis* LX de $0,383 \text{ h}^{-1}$ no tempo de 4 h após inoculação. A partir deste tempo a velocidade específica de crescimento foi reduzindo até atingir zero após, aproximadamente, 28 h de cultivo. Kongklom et al. (2015) utilizando *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 para produção de γ -PGA em meio composto por glicose, ácido cítrico, fonte de nitrogênio e alguns sais observaram velocidade específica de crescimento de $0,054 \text{ h}^{-1}$. Entretanto, estes autores aplicaram diversas estratégias de fermentação, sendo que a velocidade específica de crescimento variou entre $0,05 \text{ h}^{-1}$ e $0,08 \text{ h}^{-1}$.

Figura 7 - Curva de crescimento microbiano de *B. subtilis* (A) e *B. licheniformis* (B) em caldo E com pré-inóculo em caldo nutriente e caldo E no período de 8 h.

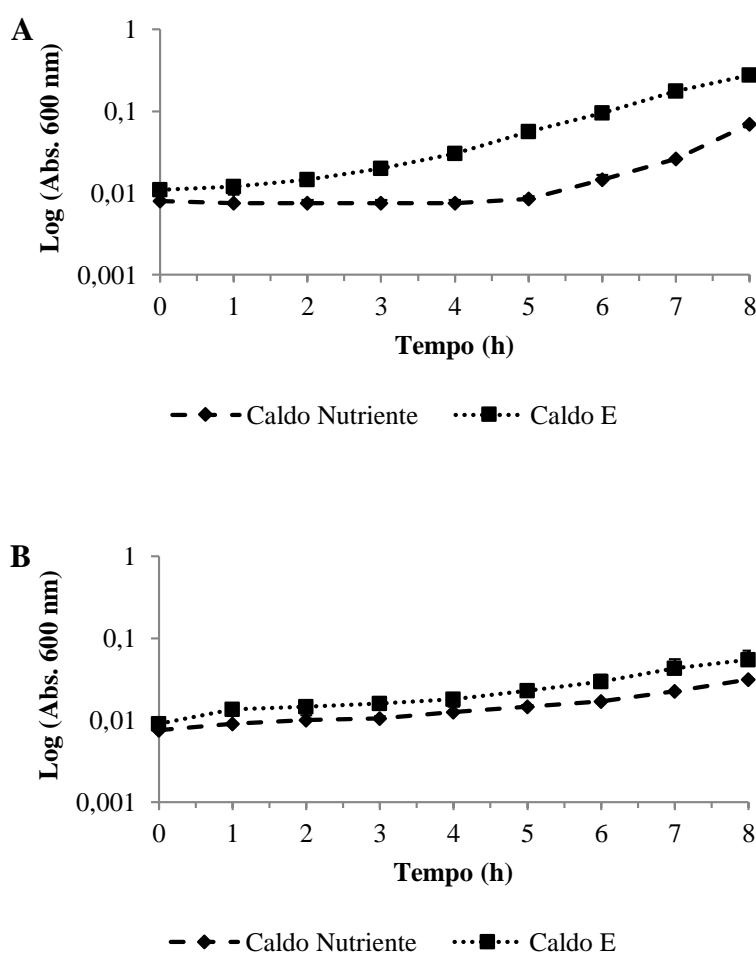


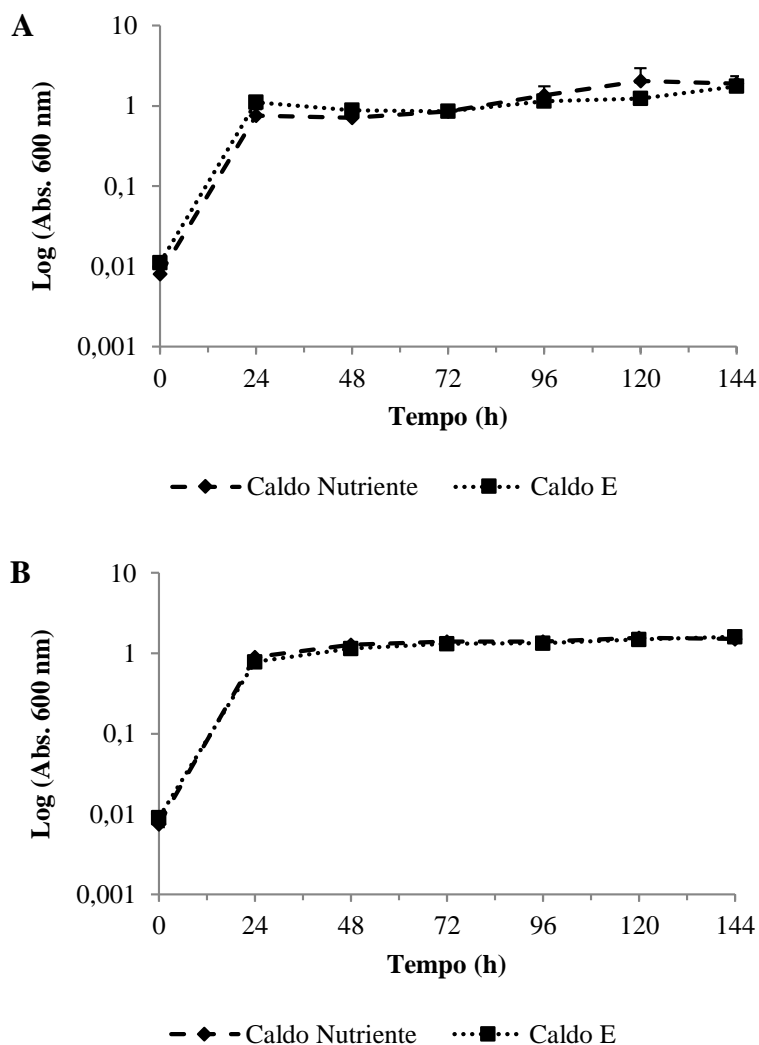
Tabela 5 - Velocidade específica de crescimento das três linhagens de *Bacillus* cultivadas em caldo E e ativadas em pré-inóculo em caldo nutriente e caldo E

Microrganismo	Pré-inóculo	Velocidade específica de crescimento μ (h^{-1})	Coefficiente de determinação (R^2)
<i>B. subtilis</i>	Caldo Nutriente	0,2299	0,6524
<i>B. licheniformis</i>		0,1646	0,9523
<i>B. subtilis</i>	Caldo E	0,4290	0,9611
<i>B. licheniformis</i>		0,2083	0,9600

Comparando o crescimento dos microrganismos em caldo nutriente e caldo E, independente do pré-inóculo em caldo E, o caldo nutriente apresentou velocidade específica de crescimento superior em ambos microrganismos, corroborando com as orientações do Laboratório de Fisiologia Bacteriana (LFB) do Instituto Oswaldo Cruz. Todavia, a produção do biopolímero só é possível em meio que ofereça nutrientes que favorecem a produção de γ -PGA e a composição do caldo E apresenta estes componentes, mas impõe-se como um meio limitante para o crescimento dos microrganismos.

Avaliou-se também o crescimento microbiano em caldo E em até 144 h de cultivo (Figura 8). *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* apresentaram crescimento próximo nos dois tipos de pré-inóculo, sendo que *B. subtilis* teve crescimento superior em pré-inóculo em caldo E até 48 h de cultivo e igual estatisticamente ao pré-inóculo em caldo nutriente após este período. *Bacillus licheniformis* no tempo 24 h de cultivo apresentou crescimento superior no pré-inóculo em caldo nutriente, após este período os meios apresentaram valores de crescimento estatisticamente iguais. No entanto, em *B. subtilis* e *B. licheniformis* nos tempos onde há diferença entre os dois pré-inóculos esta não se apresentou expressiva.

Figura 8 - Curva de crescimento microbiano de *B. subtilis* (A) e *B. licheniformis* (B) em caldo E com pré-inóculo em caldo nutriente e caldo E no período de 144 h.



As bactérias, comparativamente ao longo do tempo, apresentaram crescimento estatisticamente iguais, exceto nos tempos 48 h e 72 h para o pré-inóculo em caldo nutriente e 48 h, 72 h, 96 h e 120 h para o pré-incóculo em caldo E, onde *B. licheniformis* apresentou crescimento superior a *B. subtilis*. Este último apresentou crescimento superior somente no tempo de 24 h no pré-inóculo em caldo E.

A utilização do mesmo meio para o ativação e cultivo de microrganismos influencia a velocidade específica de crescimento principalmente nas primeiras horas de cultivo, sendo que esta influência descrece posteriormente. Como a razão entre a velocidade específica de crescimento do caldo E e caldo nutriente para *B. subtilis* foi maior, quando

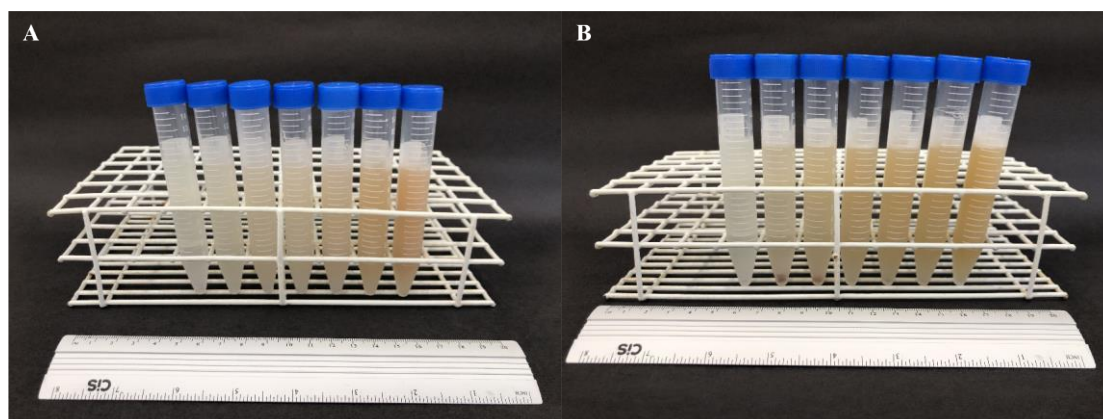
comparada com *B. licheniformis*, as vantagens de se utilizar o mesmo meio se estendeu até 48 h, mas esta influência se dissipou antes de 24 h de cultivo para *B. licheniformis*. A ativação das bactérias nos pré-inóculos apresentados não demonstrou expressiva diferença no crescimento em longos períodos que são comuns em processos fermentativos.

O uso de mesmo meio para o pré-inóculo, inóculo e cultivo não é comumente utilizado nos estudos específicos para produção de γ -PGA. Xu et al. (2005) e Ashiuchi et al. (2001) utilizaram o caldo LB (Luria Bertani) para preparação do inóculo na produção de γ -PGA, já Shih et al. (2005) utilizaram caldo nutriente para a mesma finalidade.

5.2 Fermentação submerso (FS)

A produção de γ -PGA em caldo E foi avaliada, isoladamente, em cada microrganismo com pré-inóculo em caldo nutriente (Figura 9) e pré-inóculo em caldo E.

Figura 9 - Fermentação submersa de *B. subtilis* (A) e *B. licheniformis* (B) em caldo E, com pré-inóculo em caldo nutriente. Tubos Falcon com meio fermentado durante 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h e 144 h (seqüência da esquerda para direita).



Bacillus subtilis apresentou sua maior produção de γ -PGA (290,5 mg L⁻¹) em 144 h de fermentação com ativação do pré-inóculo em caldo nutriente, quando comparado com os outros períodos do mesmo pré-inóculo e do pré-inóculo em caldo E. A produção de γ -PGA por *B. subtilis* com pré-inóculo em caldo nutriente foi superior ao pré-inóculo em caldo E nos tempos 24 h, 72 h, 120 h e 144 h e estatisticamente igual nos tempos 0 h, 48 h e 96 h. Richard e Margaritis (2003) obtiveram 23 g L⁻¹ de γ -PGA utilizando meio similar

ao caldo E com 20 g L⁻¹ de glicerol no cultivo com *B. subtilis* IFO 3336. Segundo Wu et al. (2008) *B. subtilis* CGMCC 0833, isolado de solo, atingiu produção de 34,4 g L⁻¹ do biopolímero.

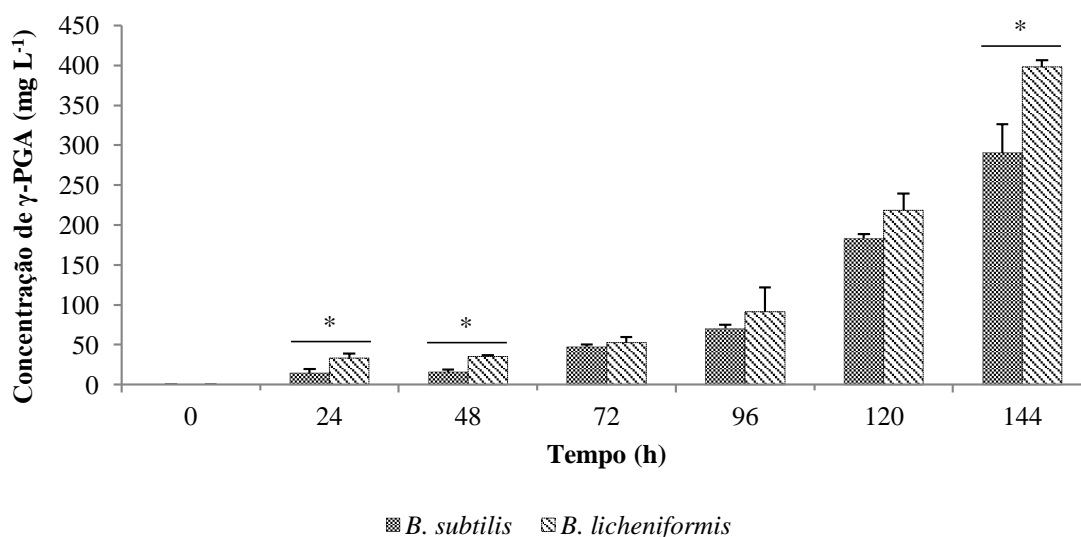
A produção máxima do biopolímero por *B. licheniformis* foi de 398,1 mg L⁻¹ em 144 h de fermentação no pré-inóculo em caldo nutriente e apresentou produção superior em todos os tempos quando comparado com o pré-inóculo em caldo E.

Soliman et al. (2005) realizou a fermentação com *B. licheniformis* em meio similar a caldo E, sem ácido L-glutâmico e com caseína, (NH₄)₂SO₄ e NH₄Cl e obteve produção máxima de 33,5 g L⁻¹ de γ -PGA. *B. licheniformis* CCRC 12826 atingiu produção de 19,8 g L⁻¹, na fermentação em caldo E modificado (SHIH et al., 2002).

Bacillus licheniformis, quando ativado previamente em pré-inóculo em caldo nutriente, apresentou diferença estatisticamente significativa nas médias ($p < 0,05$) de produção de γ -PGA nos tempos 24 h, 48 h e 144 h, quando comparado com *B. subtilis* (Figura 10).

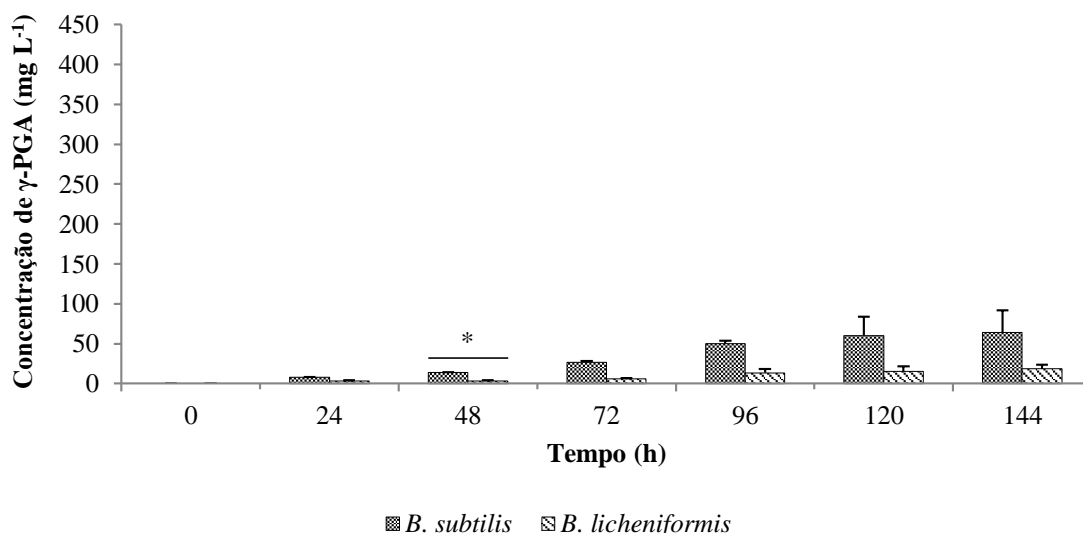
Bacillus subtilis, em pré-inóculo em caldo E, apresentou produção superior em todos os tempos ao *B. licheniformis* com diferença estatisticamente significativa nas médias ($p < 0,05$) no tempo de 48 h. *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* tiveram produção máxima do biopolímero em pré-inóculo em caldo E, após 144 h de fermentação com 64,0 mg L⁻¹ e 18,4 mg L⁻¹, respectivamente (Figura 11).

Figura 10 - Produção de γ -PGA em caldo E, a partir de pré-inóculo em caldo nutriente.



*diferença estatisticamente significativa entre as médias ($p < 0,05$).

Figura 11 - Produção de γ -PGA em caldo E, a partir de pré-inóculo em caldo E.



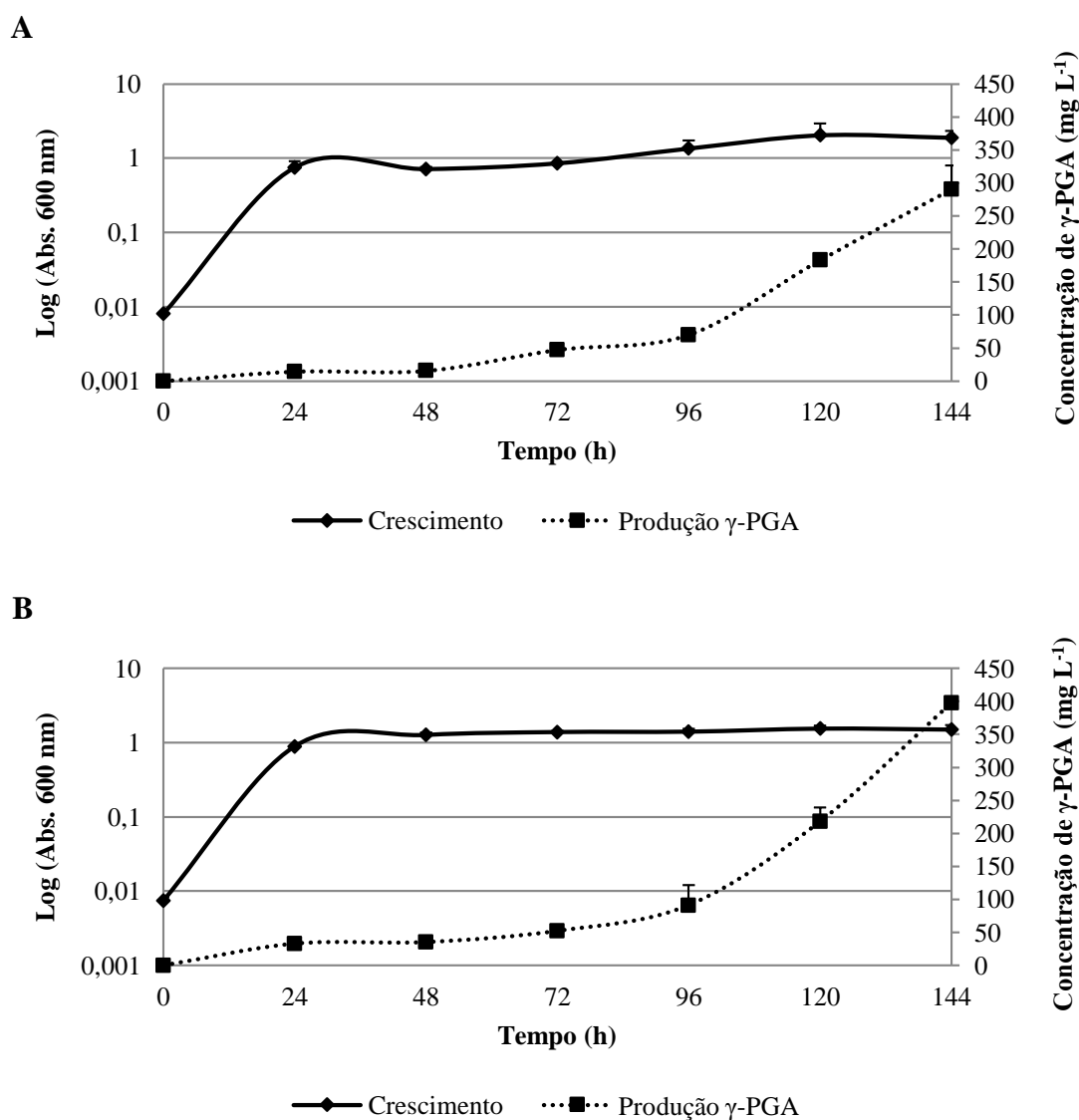
*diferença estatisticamente significativa entre as médias ($p < 0,05$).

É possível constatar que a produção de γ -PGA foi inferior aos valores de produção encontrados na literatura. Mesmo em *B. licheniformis*, que neste estudo se mostrou o microrganismo com maior capacidade na produção do biopolímero, quando comparado com linhagens da mesma espécie a produção foi comparativamente menor. Assim, é possível inferir que as duas linhagens de microrganismos utilizadas neste estudo, não apresentam potencial de alta produção de γ -PGA nos parâmetros deste estudo na FS.

A tendência de produção de γ -PGA foi superior em ambos os microrganismos ativados em pré-inóculo em caldo nutriente, sendo que *B. licheniformis* teve a maior tendência de produção. Os pré-inóculos não apresentaram diferença significativa no crescimento dos microrganismos em longo prazo, conforme apresentado na Figura 7. Entretanto, os pré-inóculos influenciaram intensivamente na produção de γ -PGA, pois quando os microrganismos foram ativados em pré-inóculo em caldo nutriente a produção foi superior aos mesmos microrganismos ativados em caldo E.

Segundo Cesaro et al. (2014) a produção máxima de γ -PGA ocorre no final da fase exponencial e durante a fase estacionária a produção do biopolímero é interrompida. Diferentemente neste estudo, a produção de γ -PGA se manteve durante a fase estacionária de crescimento e o biopolímero não foi degradado ao longo do tempo. Isto é importante economicamente na produção do biopolímero, pois a produção não ocorre exclusivamente na fase exponencial de crescimento (Figura 12).

Figura 12 - Curva de crescimento microbiano e produção de γ -PGA por *B. subtilis* (A) e *B. licheniformis* (B) em caldo E com pré-inóculo em caldo nutriente.



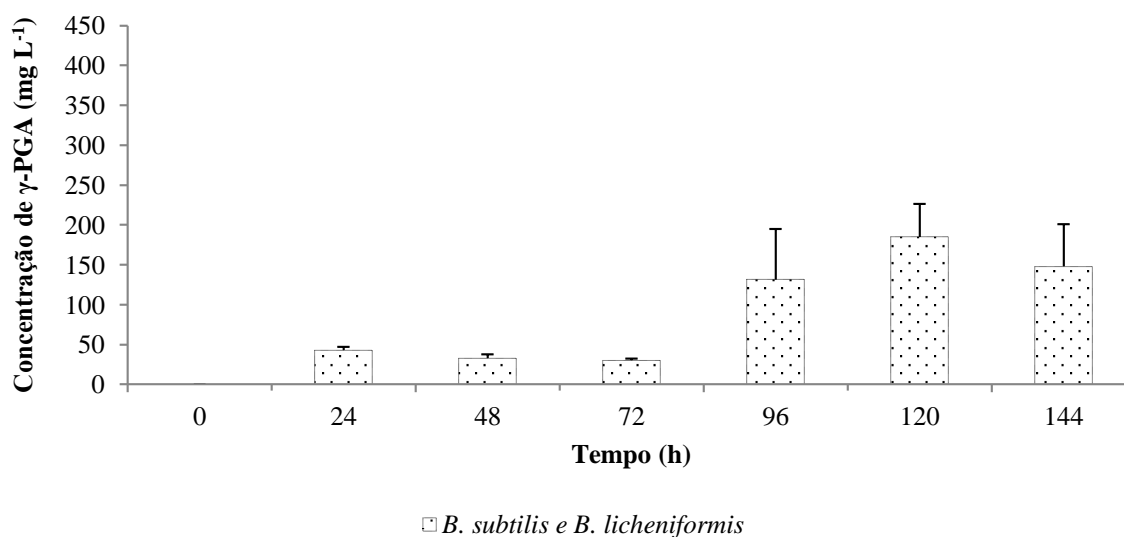
Foi realizada a produção de γ -PGA através do consórcio dos microrganismos, a fim de verificar se quando cultivadas em conjunto haveria um aumento na produção do biopolímero. O consórcio entre os microrganismos apresentou uma produção crescente até atingir a produção média máxima de 185,2 mg L⁻¹ após 120 h de fermentação (Figura 13).

Mesmo na maior produção do biopolímero em consórcio não superou a maior produção de γ -PGA com a fermentação isolada de *B. licheniformis* em pré-inóculo em caldo nutriente. O cultivo em consórcio foi limitante para a produção de γ -PGA. Muitos estudos para produção de γ -PGA utilizam o cultivo em consórcio de microrganismos

produtores de ácido glutâmico e γ -PGA, pois um dos microrganismos terá a função de fornecer os monômeros e o outro será responsável pela polimerização do biopolímero (YANG, et al. 2013). Tavernier (2014) estudando o consórcio entre *Brevibacterium divericatum* e *B. licheniformis* para eliminar a adição de ácido L-glutâmico na produção de γ -PGA, constatou que as concentrações obtidas de γ -PGA são mais baixas no cultivo em consórcio em comparação com a produção de γ -PGA na cultura pura de *B. licheniformis*. O autor justifica a menor produção devido à falta de ácido glutâmico quando *Bacillus licheniformis* entra na fase estacionária.

Bacillus subtilis ZJU-7 é uma bactéria dependente de ácido glutâmico e para evitar a adição exógena deste aminoácido, uma fonte de carbono mista (glicose e sacarose) foi introduzida no sistema de consórcio com *Corynebacterium glutamicum*, bactéria usada para a produção de aminoácidos, para estimular a produção de ácido glutâmico. Os bioprocessos integrados apresentaram vantagens que incluem a redução do tempo de fermentação e a redução do custo de produção de γ -PGA (XU, SHI, CEN, 2005).

Figura 13 - Produção de γ -PGA em consórcio microbiano em caldo E.



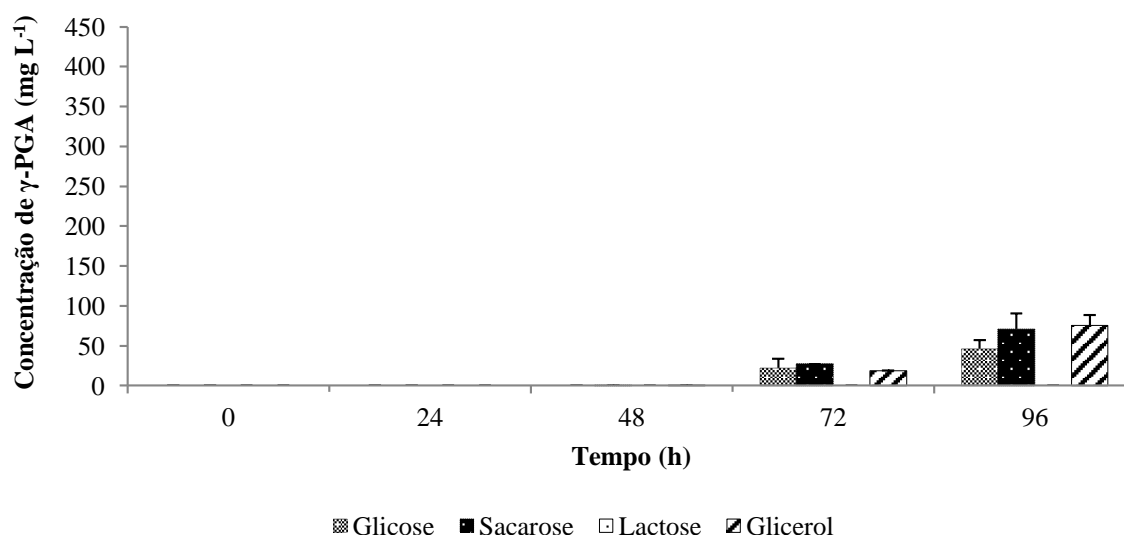
O ácido L-glutâmico, monômero necessário para polimerização de γ -PGA, pode ser obtido através do meio de cultivo ou a partir de moléculas simples via ciclo do ácido tricarboxílico. Para a aplicação comercial de γ -PGA, é necessário reduzir o custo durante o processo de fermentação. Atualmente, a produção de γ -PGA foi mais extensivamente estudada nas bactérias dependentes do ácido L-glutâmico, que requerem o ácido

L-glutâmico como um precursor da biossíntese de γ -PGA (SUNG et al., 2005). Para evitar a adição exógena de ácido L-glutâmico, com a finalidade de reduzir o custo de produção algumas estratégias podem ser aplicadas, como utilizar fontes de carbono com microrganismos independentes de ácido L-glutâmico ou realizar consórcio com *Corynebacterium glutamicum*, microrganismo capaz de produzir grande quantidade de ácido L-glutâmico (XU et al., 2013).

Buscou-se entender a possibilidade de produção de γ -PGA na ausência de ácido L-glutâmico. Utilizou-se o meio M com diferentes fontes de carbono: glicose, sacarose, lactose e glicerol. *Bacillus subtilis* não foi capaz de produzir γ -PGA na ausência de ácido L-glutâmico, exceto na composição do meio M com glicose, onde a produção do biopolímero foi de $19,9 \text{ mg L}^{-1} \pm 12,3$ (72 h) e $120,5 \text{ mg L}^{-1} \pm 31,2$ (96 h).

Bacillus licheniformis não foi capaz de produzir o biopolímero na presença de lactose, mas produziu com glicose, sacarose e glicerol no meio de cultivo (Figura 14). A produção de γ -PGA iniciou-se somente a partir de 48 h de fermentação na presença de sacarose e glicerol, e partir de 72 h com a glicose como fonte de carbono. A produção de γ -PGA com sacarose foi de $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ (48 h), $27,2 \text{ mg L}^{-1}$ (72 h) e $71,1 \text{ mg L}^{-1}$ (96 h) e com o glicerol $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ (48 h), $19,0 \text{ mg L}^{-1}$ (72 h) e $75,7 \text{ mg L}^{-1}$ (96 h). Já a glicose como fonte de carbono a produção do biopolímero foi de $22,2 \text{ mg L}^{-1}$ (72 h) e $46,2 \text{ mg L}^{-1}$ (96 h).

Figura 14 - Produção de γ -PGA por *Bacillus licheniformis*, na ausência de ácido L-glutâmico, a partir de quatro fontes de carbono.



É possível afirmar que *B. subtilis* é independente de ácido L-glutâmico para produção do biopolímero, entretanto restrito a moléculas simples. Como não foi verificado o crescimento dos microrganismos é possível que o meio M não tenha favorecido seu crescimento, inviabilizando a produção de γ -PGA nas demais fontes de carbono. Ito et al. (1996) estudou o efeito de fontes de carbono na produção de γ -PGA em *B. subtilis* TAM-4 e verificou produção expressiva do biopolímero com frutose, sacarose, maltose e glicose, respectivamente, 22,1 mg mL⁻¹, 16,9 mg mL⁻¹, 16,1 mg mL⁻¹ e 13,4 mg mL⁻¹. Entretanto, estes mesmos autores constataram que glicerol não foi favorável para o crescimento do microrganismo, produzindo somente 0,6 mg mL⁻¹ de γ -PGA. A vantagem desta linhagem é que *B. subtilis* TAM-4 dificilmente produz polissacárideos, um subproduto de alguns produtores de γ -PGA, tal como *B. subtilis* IFO3335. Estes resultados demonstram que a produção de γ -PGA além de variar em função da presença do aminoácido e de fontes de carbono, também varia em função da linhagem utilizada.

É possível afirmar que *B. licheniformis* é uma bactéria independente de ácido L-glutâmico, sendo que esta característica é favorável no processo de produção do biopolímero, pois o microrganismo pode utilizar diferentes vias para a produção de γ -PGA, intensificando sua produção. O uso de diferentes fontes de carbono, de menor custo, para a produção de γ -PGA pode reduzir o custo na produção do biopolímero, pois o ácido L-glutâmico é um substrato caro comparado às fontes de nitrogênio inorgânico (KONGKLOM et al., 2017). Diferentemente dos microrganismos dependentes do ácido L-glutâmico, *B. licheniformis* não necessita de grandes quantidades de ácido L-glutâmico no meio. Portanto há redução do custo de produção, pois este aminoácido corresponde a 50% do custo da matéria prima, não sendo viável para produção de γ -PGA em larga escala (XU et al., 2014).

O uso de glicerol para a produção de γ -PGA em *B. licheniformis* foi relatado (CROMWICK, et al., 1996; SHIH et al., 2002; ZHAN et al., 2017). A linhagem *B. licheniformis* WX-02 foi comprovada como um eficiente produtor de γ -PGA (WANG et al., 2016). Os autores atingiram produção do biopolímero de 36,26 g L⁻¹ em biorreator com meio de fermentação composto por glicose, citrato de sódio, alguns sais e incubados a 37 °C, taxa de aeração de 1 (vvm) e velocidade de agitação de 500 rpm por 42 h.

Xu et al. (2005) estudaram *B. subtilis* NX-2 na produção de γ -PGA a partir de diferentes fontes de carbono. O microrganismo foi inoculado em meio basal adicionado de 30 g L⁻¹ de fonte de carbono e ácido L-glutâmico e incubado a 37 °C por 24 h em agitador

orbital a 200 rpm. Foi necessário ácido glutâmico exógeno e fonte adicional de carbono para a produção de γ -PGA. Quando a glicose e sacarose foram utilizadas como fonte de carbono, houve alto rendimento na produção de γ -PGA, cerca de 30 g L⁻¹. O glicerol também influenciou positivamente na produção do biopolímero, com rendimento de 24,3 g L⁻¹ de γ -PGA. A lactose favoreceu o crescimento celular de *B. subtilis* NX-2, mas teve pouco efeito na produção de γ -PGA. Pode-se presumir que a linhagem NX-2 carece de algumas enzimas da via da gliconeogênese, portanto não pode utilizar o ácido orgânico contido no ciclo do ácido tricarboxílico como fonte de carbono para o crescimento celular e na síntese de γ -PGA.

Bajaj e Singhal (2009) estudaram o efeito da adição de diferentes aminoácidos e intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico como precursores metabólicos na produção γ -PGA por *Bacillus licheniformis* NCIM 2324. Obtiveram rendimento de 35,75 g L⁻¹, quando o meio foi suplementado com 0,5 mM de L-glutamina e 10 mM de ácido cetoglutarico e a adição de precursores também aumentou a utilização do ácido L-glutâmico durante a fermentação. Em comparação com o meio na ausência de precursores metabólicos a produção γ -PGA foi 26,12 g L⁻¹.

No que diz respeito à biossíntese de γ -PGA, as fontes de carbono adequadas dependem das linhagens. Geralmente, glicose, glicerol, maltose, ácido cítrico, frutose e sacarose são as fontes de carbono comuns para a produção de γ -PGA como componentes simples ou combinados no meio de produção. Por exemplo, 80 g L⁻¹ de glicerol e 12 g L⁻¹ de ácido cítrico foram utilizados como fontes de carbono no amplamente utilizado caldo E ou suas variações (LEONARD et al., 1958). Também foi observado que a glicose é a fonte de carbono ideal para produzir γ -PGA com *B. licheniformis* A35 (CHENG et al., 1989); e sacarose é a fonte de carbono preferencial para *B. subtilis* ZJU-7 (CHEN et al., 2008). Quanto a *B. subtilis* IFO 3335 (GOTO, KUNIOKA, 1992), o ácido cítrico é a fonte de carbono ideal para produzir o γ -PGA.

Várias bactérias independentes do ácido L-glutâmico foram reportadas como capazes de produzir uma grande quantidade de γ -PGA sem a adição de ácido L-glutâmico ao meio de produção. Foi descrito que *B. licheniformis* A35 (CHENG et al., 1989) produziu γ -PGA numa concentração de 8 g L⁻¹ num meio contendo glicose e cloreto de amônio, sob condições desnitrificantes.

5.3 Fermentação em estado sólido (FES)

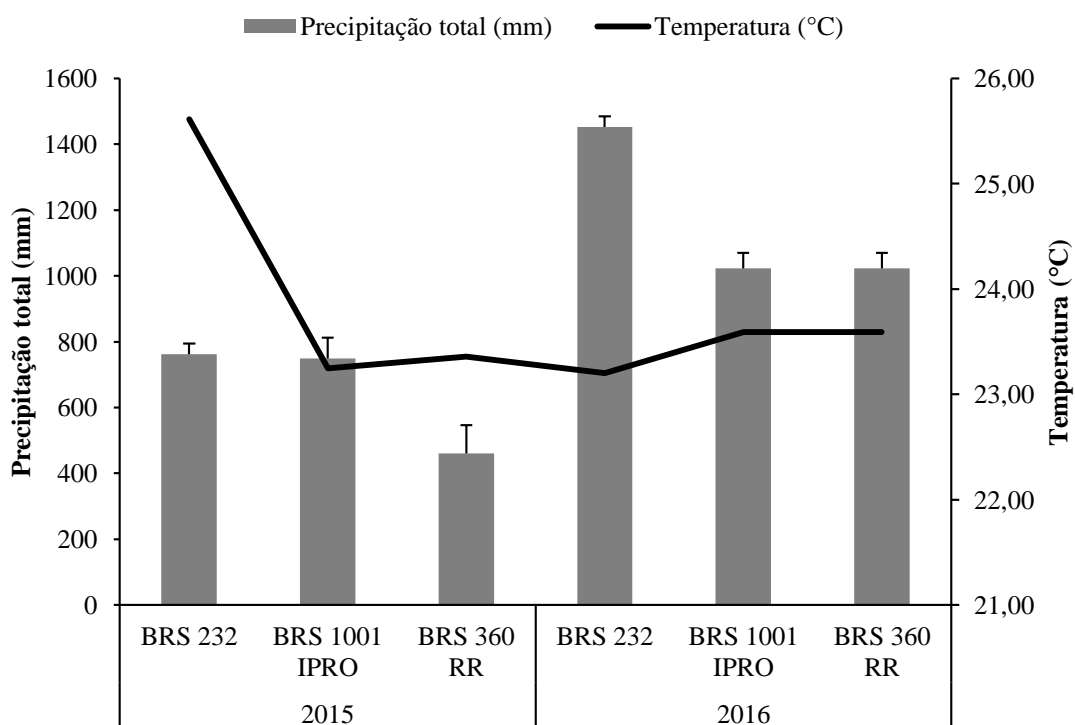
5.3.1 Estudo do substrato

Embora a genética seja geralmente considerada o fator determinante na composição centesimal de grãos, a variação ambiental também influencia na concentração de proteínas e lipídios (BRUMM, HURBURGH, 1990). Como os cultivares de soja foram semeados em diferentes regiões, realizou-se o levantamento das condições climáticas nos municípios onde os grãos de soja foram cultivados.

Os dados de precipitação total e de temperatura média compensada foram obtidos, respectivamente, de doze postos pluviométricos e quatro estações do estado de São Paulo no período de cultivo de cada cultivar (Apêndice 1).

A precipitação total durante o período de cultivo variou amplamente entre as safras 2015 e 2016. Os cultivares BRS 232, BRS 1001 IPRO e BRS 360 RR, respectivamente, foram submetidos à precipitação total de 762,5 mm, 749,1 mm e 461,3 mm na safra de 2015 e 1452,0 mm, 1023,1 mm e 1023,1 mm na safra 2016 (Figura 15).

Figura 15 - Precipitação total e temperatura média compensada no período de cultivo dos cultivares de soja.



Esta variação expressiva na precipitação total da safra de 2015 para a safra 2016 correspondeu a um aumento na precipitação de 121,8% para o cultivar BRS 360 RR, 90,4% para BRS 232 e 36,6% para BRS 1001 IPRO. A intensa variação na precipitação entre as safras é decorrente da pior seca já registrada no sudeste do Brasil e atingiu a safra de 2015, afetando sua composição centesimal (EMPINOTTI, BUDDS, AVERSA, 2019). O aumento da precipitação de uma safra para outra influenciou na quantidade de proteínas de todos os cultivares, fonte principal de compostos químicos para produção de γ -PGA. Durante o estresse hídrico por escassez a síntese de todos os principais componentes dos grãos é inibida, podendo resultar na redução de 16% na concentração de proteínas e de 25% na concentração de lipídios na soja (ROTUNDO, WESTGATE, 2009).

A temperatura média compensada no período de cultivo dos três cultivares de soja e nas duas safras não apresentou variação significativa, variando entre 23 °C e 24 °C. A exceção ficou para o cultivar BRS 232 da safra 2015, que durante o período de cultivo a temperatura média compensada foi de 25,61 °C. Muitos estudos demonstram variabilidade no teor de proteína em grãos de soja expostos a temperaturas elevadas (THOMAS et al., 2003). Gibson e Mullen (1996) relataram que o teor de proteínas é levemente afetado com o aumento da temperatura, mas segundo os autores o teor de lipídeos aumenta com temperatura entre 25 °C e 28 °C, sendo que em temperatura superior a concentração começa a declinar. Para Rotundo e Westgate (2009) em temperaturas acima de 26 °C, durante o cultivo, pode influenciar na concentração de proteínas e lipídios reduzindo o teor em 9% e 15%, respectivamente.

A temperatura do ambiente manteve-se praticamente estável entre as safras e não foi o fator que influenciou, primordialmente, na composição centesimal dos grãos de soja. Somente o cultivar BRS 232 da safra 2015 pode ter sofrido influência maior da temperatura na quantidade de proteínas.

Os cultivares de soja apresentaram diferenças em alguns parâmetros quando comparadas as safras 2015 e 2016 (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 - Composição centesimal de três diferentes cultivares de grãos de soja ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) da safra 2015

Cultivar	Umidade e voláteis	Proteína ($\text{Nx}6,5$) ¹	Lipídios totais	Carboidratos totais	Cinzas
BRS 232	12,82 (0,15) ^a	33,66 (0,04) ^a	20,64 (0,19) ^a	28,16	4,72 (0,01) ^a
BRS 360	13,42 (0,26) ^a	30,60 (0,03) ^a	21,31 (0,08) ^a	29,33	5,34 (0,04) ^a
BRS 1001	13,34 (0,28) ^a	34,07 (0,09) ^a	21,73 (0,18) ^a	26,39	4,47 (0,03) ^a

¹O teor de proteína da amostra é calculado pela multiplicação do teor de nitrogênio total por um fator específico para conversão do nitrogênio em proteína.

^aMédia e estimativa de desvio padrão.

Tabela 7 - Composição centesimal de três diferentes cultivares de grãos de soja ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$) da safra 2016

Cultivar	Umidade e voláteis	Proteína ($\text{Nx}6,5$) ¹	Lipídios totais	Carboidratos totais	Cinzas
BRS 232	9,05 (0,15) ^a	36,90 (0,13) ^a	21,33 (0,08) ^a	28,14	4,58 (0,04) ^a
BRS 360	8,95 (0,03) ^a	38,49 (0,06) ^a	20,86 (0,18) ^a	26,92	4,78 (0,04) ^a
BRS 1001	9,92 (0,18) ^a	35,98 (0,43) ^a	21,32 (0,10) ^a	28,24	4,54 (0,02) ^a

¹O teor de proteína da amostra é calculado pela multiplicação do teor de nitrogênio total por um fator específico para conversão do nitrogênio em proteína.

^aMédia e estimativa de desvio padrão.

Os cultivares de soja da safra 2016 apresentaram quantidade de proteínas superior à safra de 2015. O cultivar BRS 360 RR da safra 2016 apresentou maior quantidade de proteínas na sua composição centesimal com $38,49 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, seguida dos cultivares BRS 232 e BRS 1001 IPRO, respectivamente, com $36,90 \text{ g } 100\text{g}^{-1}$ e $35,98 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$. A quantidade máxima de proteínas nos cultivares da safra de 2015 foi de $34,07 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ referente à soja BRS 1001 IPRO, inferior a quantidade mínima da safra de 2016. O aumento na quantidade de proteínas da safra de 2015 para 2016 foi de 25,8% para o cultivar BRS 360 RR (Figura 16), 9,6% para o cultivar BRS 232 (Figura 17) e de 5,6% para o cultivar BRS 1001 IPRO (Figura 18). A porcentagem de proteínas em grãos de soja sob condições normais de irrigação é 37% a 39% de massa seca (WIJEWARDANA et al., 2019). Embora o teor de proteína na soja seja geneticamente definido, fatores ambientais

podem levar a mudanças na disponibilidade de nitrogênio, durante a formação de grãos (HAYATI et al., 1995). Segundo Benzain e Lane (1986) a alteração na concentração de proteínas é quatro vezes mais dependente dos fatores ambientais que dos fatores genéticos. Specht et al. (2001) relataram que a irrigação do solo tem efeito positivo na concentração de proteínas nos grãos de soja, e secas severas podem levar a uma diminuição nas concentrações de proteínas. O estresse hídrico do solo causa uma redução nas proteínas das sementes de soja durante o estágio de crescimento reprodutivo (WIJEWARDANA et al., 2019).

Pipolo (2004^{ab}) relatou que a precipitação durante o estágio de desenvolvimento dos grãos explica a diferença no conteúdo de proteína mais do que as mudanças de temperatura, portanto, a alteração deste parâmetro pode estar ligada ao estresse hídrico da espécie vegetal. Angra et al. (2010) propuseram um mecanismo para explicar a diminuição do teor de proteínas em condições ambientais desfavoráveis. Para os autores o menor teor de proteínas em condições de estresse hídrico poderia ser devido à hidrólise e à degradação de chaperonas sintetizadas como proteção contra a seca.

A correlação entre a composição centesimal da soja e o estresse hídrico ainda é debatida. Entretanto, muitos pesquisadores determinaram que a quantidade de proteína diminui com o déficit hídrico do solo (SPECHT et al., 2001; BOYDAK et al., 2002; CARRERA et al., 2009).

Neste estudo foi possível verificar que com a maior diferença na porcentagem de precipitação entre as safras de cada cultivar, maior também foi a diferença percentual na quantidade de proteínas. Os cultivares da safra 2016 apresentaram maior potencial como substrato para a fermentação em estado sólido (FES), pois possuem maior teor de proteínas, o que é desejável na produção de γ -PGA.

A análise dos lipídios totais não apresentou diferença expressiva entre as safras para todos os cultivares. Altas temperaturas durante o desenvolvimento de sementes estão associadas ao baixo conteúdo lipídico, no entanto, esse efeito varia dependendo de outros fatores ambientais, como o estresse hídrico que influencia a produção de lipídios por seus efeitos no crescimento e desenvolvimento de grãos (HARRIS et al., 1978). Alguns pesquisadores relatam aumento do teor de lipídios com déficit hídrico, enquanto outros indicam que diminui o teor de lipídios com o déficit hídrico do solo (SPECHT et al., 2001; ROTUNDO; WESTGATE, 2010; BELLALLOUI et al., 2012; WIJEWARDANA et al., 2019).

Os cultivares da safra de 2015 tiveram valores superiores de umidade e voláteis quando comparados com os mesmos cultivares da safra de 2016. O cultivar BRS 360 RR apresentou diferença de 33,3% nos valores de umidade e voláteis, já BRS 232 e BRS 1001 IPRO apresentaram diferença de 29,4% e 25,6%, respectivamente. Estas diferenças no teor de umidade podem ser devido às condições de secagem do grão após a colheita, período de armazenamento, capacidade dos grãos de perder a umidade, entre outros fatores (BHARDWAJ et al., 1999). Os valores de carboidratos totais só apresentaram diferença expressiva entre as safras dos cultivares BRS 360 RR e BRS 1001 IPRO, onde o primeiro apresentou redução de 8,2% e o segundo mostrou um aumento de 7,0% da safra de 2015 para 2016. A diferença na quantidade de cinzas entre as safras foi mais expressiva no cultivar BRS 360 RR, onde houve uma redução de 10,5% da safra de 2015 em relação a 2016.

Figura 16 - Composição centesimal (%) do cultivar BRS 360 RR das safras 2015 e 2016.

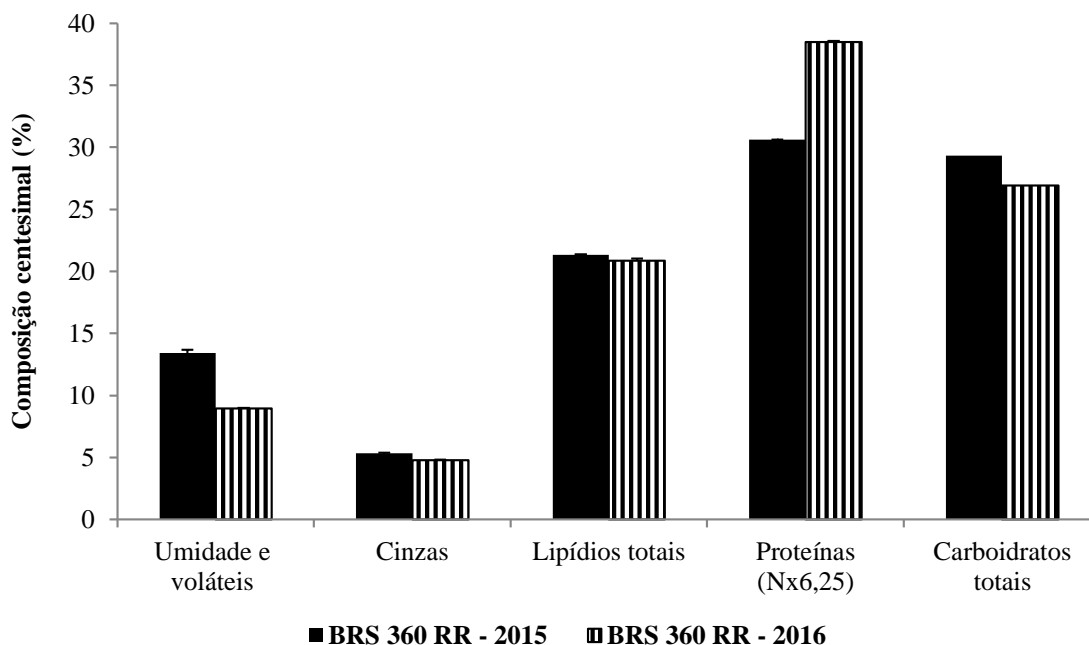


Figura 17 - Composição centesimal (%) do cultivar BRS 232 das safras 2015 e 2016.

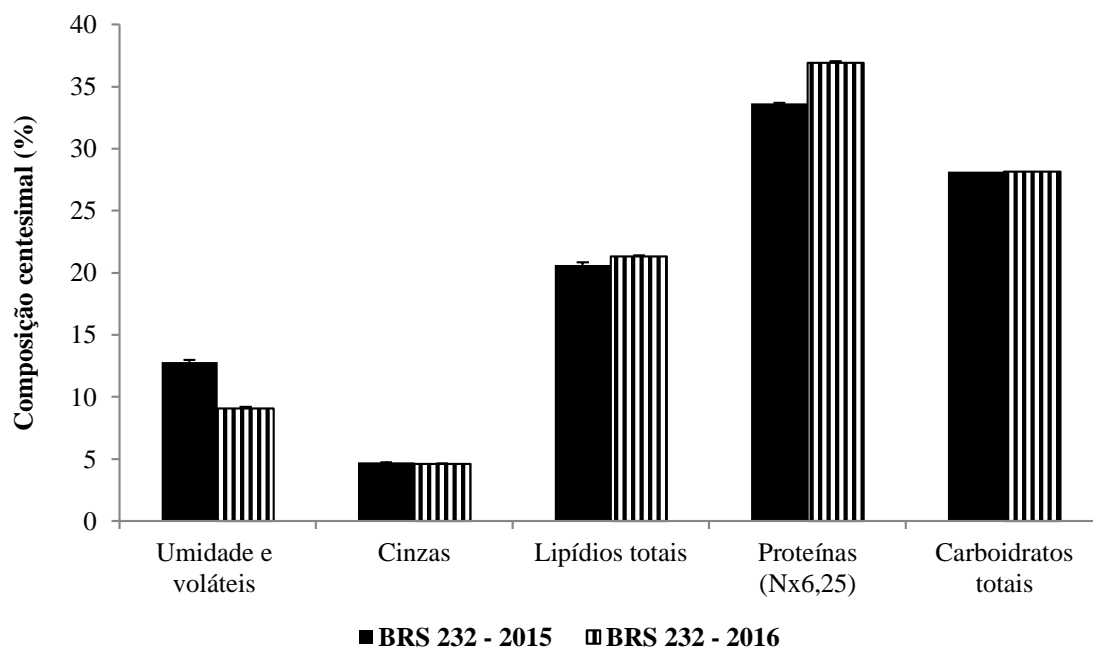
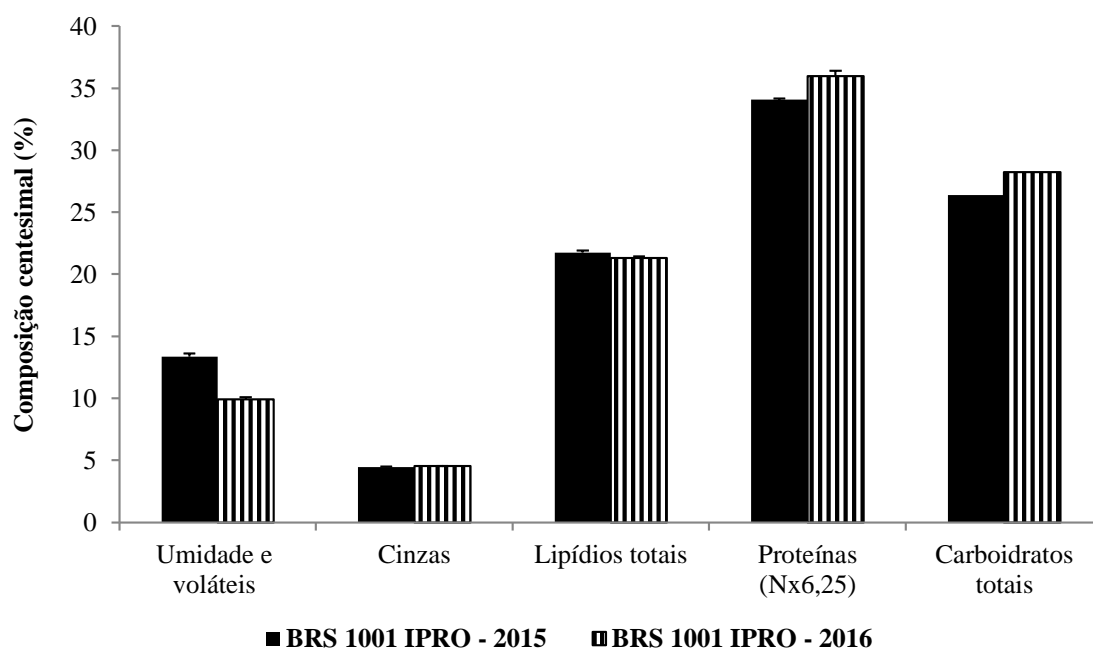


Figura 18 - Composição centesimal (%) do cultivar BRS 1001 IPRO das safras 2015 e 2016.



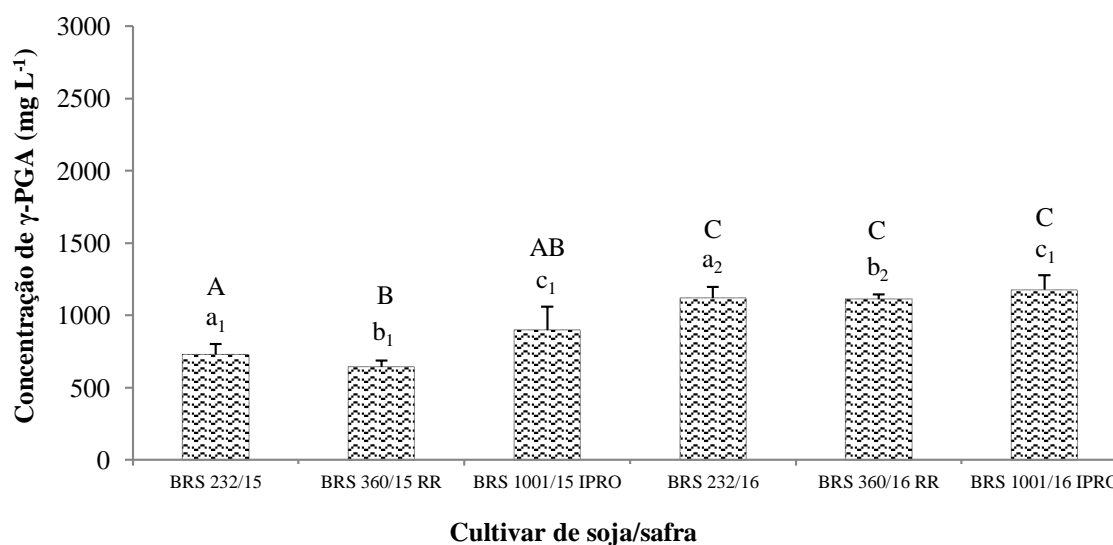
A pluviosidade foi o fator determinante no aumento da concentração de proteínas nos grãos. Na escolha de substratos para processos fermentativos o fator genético, ou seja, cultivar específico, não deve ser a principal variável para a seleção de cultivares de soja, mas sim as condições ambientais de plantio que estes cultivares foram submetidos. A composição centesimal depende basicamente das características genéticas (tipo de cultivar), das condições climáticas e regionais, variando de acordo com a colheita (KARR-LILIENTHAL et al., 2004; ÁVILA et al., 2007; MERTZ et al., 2009; BARION et al., 2010; FERREIRA, RAO, 2011; STOLF-MOREIRA et al., 2010).

5.3.2 Produção de γ -PGA utilizando soja como substrato

A fermentação em estado sólido (FES) foi realizada utilizando os três cultivares (BRS 232, BRS 360 RR e BRS 1001 IPRO) das duas safras (2015 e 2016) como substrato. Nesta etapa do estudo somente *B. licheniformis* foi utilizado, pois se mostrou o microrganismo com maior potencial para produção de γ -PGA.

A produção do biopolímero em FES foi superior à FS, conforme apresentado na Figura 19.

Figura 19 - Produção de γ -PGA por *Bacillus licheniformis* em diferente cultivares de soja.



Todos os dados são apresentados como média \pm desvio padrão. As letras minúsculas indicam relação entre as médias do cultivar em ambas as safras, e os números diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$). As diferentes letras maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos diferentes cultivares na mesma safra.

Os cultivares BRS 360 RR, BRS 232 e BRS 1001 IPRO da safra 2015 produziram, respectivamente, 643,0 mg L⁻¹, 731,2 mg L⁻¹ e 898,7 mg L⁻¹ de γ -PGA. Na safra 2016 o BRS 360 RR produziu 1111,8 mg L⁻¹ do biopolímero e os cultivares BRS 232 e BRS 1001 IPRO produziram 1120,2 mg L⁻¹ e 1177,2 mg L⁻¹, respectivamente.

A maior produção de γ -PGA nos cultivares da safra de 2016 corrobora com a ideia de que o maior teor de proteínas, nos grãos de soja, influencia positivamente na produção do biopolímero. Apesar dos microrganismos utilizarem o ácido glutâmico como monômeros para polimerização de γ -PGA, a maior quantidade de proteínas totais verificada no estudo é um indicativo também da maior presença deste e de outros aminoácidos que indiretamente influenciam na produção de γ -PGA, como o aminoácido alanina (SIRISANSANEEYAKUL et al., 2017).

Os cultivares BRS 232 e BRS 360 RR apresentaram diferença estatisticamente significativa nas médias ($p < 0,05$) entre as safras e entre eles na safra 2015. O cultivar BRS 1001 IPRO não apresentou diferença significativa na produção do biopolímero entre as safras, pois apresentou menor diferença percentual no teor de proteínas entre elas, o que influenciou na menor variação na produção de γ -PGA. As médias de produção de γ -PGA entre os cultivares da safra 2016 não diferiram estatisticamente, sendo que os três cultivares desta safra apresentaram potencial para produção de γ -PGA.

Como *B. licheniformis* é um microrganismo independente de ácido L-glutâmico, além de utilizar o ácido glutâmico exógeno há também a síntese endógena deste aminoácido, a partir de fonte de carbono de carboidratos e lipídios via ciclo dos ácidos tricarbônicos. Ambos aminoácidos são utilizados na produção de γ -PGA (BAJAJ, SINGHAL, 2009).

Existem poucos relatos na literatura sobre a produção de γ -PGA em FES utilizando soja (BAJAJ, SINGHAL, 2011). Chen et al. (2005^a) inocularam *B. subtilis* CCTCC202048 em resíduo de suínos suplementado com torta de soja, farelo de trigo, ácido glutâmico e ácido cítrico obtendo rendimento médio de 60 g/kg de γ -PGA em condições otimizadas. Outro estudo com a mesma linhagem de *B. subtilis* em condições otimizadas utilizou estrume bovino adicionado ao farelo de trigo, torta de soja, ácido glutâmico como substrato e atingiu produção de 47 g/kg do biopolímero (Chen et al., 2005^b).

Há estudos com *B. licheniformis* NCIM 2324, utilizando farelo de soja como substrato sólido, que obteve produção de 27,81 g/kg de γ -PGA, e quando adicionado ao substrato ácido cítrico, ácido glutâmico, sulfato de amônio, glicerol, L-glutamina e ácido α -cetoglutárico a produção atingiu 98,64 g/kg (BAJAJ et al., 2008).

Estudos para produção de γ -PGA em FES tem focado nos subprodutos de soja como substrato (ZHANG et al., 2019; MOHANRAJ et al., 2019; FANG et al., 2020). Nestes estudos onde o subproduto de soja é o único componente do substrato ou parte dele, majoritariamente, há suplementação de componentes químicos, como ácido glutâmico, para aumentar a produção de γ -PGA. Entretanto esta adição aumenta também o custo de produção do biopolímero devido ao elevado valor destes materiais (XU et al., 2014).

Estudo onde utilizou-se somente resíduo fibroso de soja para fermentação, utilizando espécies do gênero *Bacillus*, apresentou baixa produção de γ -PGA por possuir reduzida quantidade de fontes de carbono assimiláveis. Entretanto quando o resíduo fibroso de soja foi suplementado com ácido glutâmico a produção do biopolímero aumentou mais de 20 vezes (SILVA, 2010).

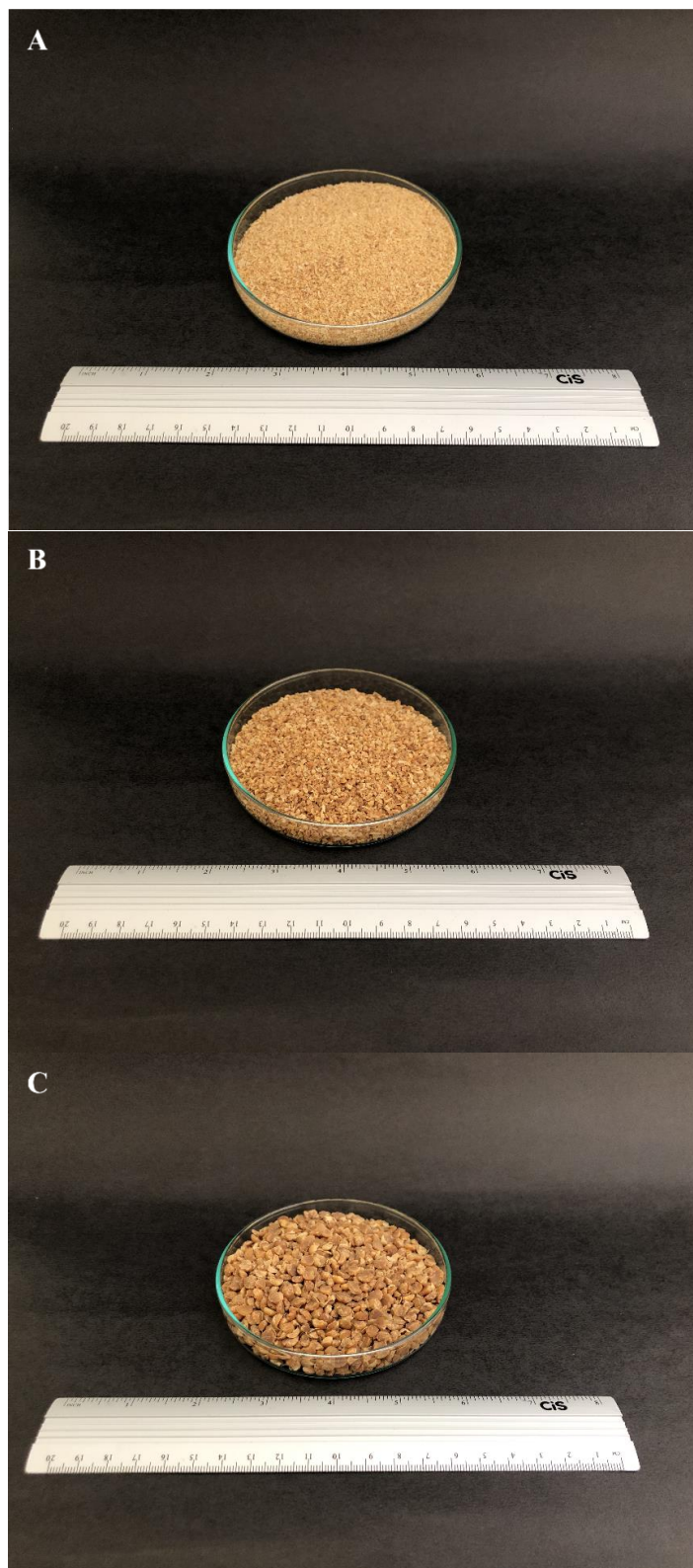
Utilizar grãos de soja ao invés de subprodutos de soja evitaria a necessidade de adição de componentes químicos, por estes possuírem uma composição complexa de nutrientes. Entre os grãos de leguminosas, os grãos de soja contêm o teor máximo de proteína bruta e a melhor composição de aminoácidos (BANASZKIEWICZ, 2011).

Apesar dos grãos de soja serem utilizados também na alimentação humana, somente 10% da produção desta leguminosa é destinada para este fim, sendo que 90% dos grãos de soja são usados como alimento para animais (BANASZKIEWICZ, 2011). Jiang et al. (2019) compararam resíduos de soja não fermentados e fermentados, utilizando linhagem produtora de ácido γ -PGA, na nutrição de ratos. Os autores constataram aumento no peso médio destes animais e concluíram que o resíduo de soja fermentado é uma estratégia viável como aditivo na alimentação para animais. Logo o uso de grãos de soja para a produção de γ -PGA pode integrar uma cadeia de produção, onde seu resíduo poderá ser destinado para alimentação animal (ZHANG et al., 2019).

A variação genética entre os cultivares não influenciou intensamente na produção do biopolímero, ao contrário da pluviosidade que induziu o aumento de proteínas nos grãos de soja e refletiu na maior produção de γ -PGA, como observado nos três cultivares da safra 2016. Entretanto, como este estudo visa selecionar somente um cultivar, o BRS 1001 IPRO da safra 2016 apresentou média maior de produção de γ -PGA e foi utilizado nas etapas seguintes.

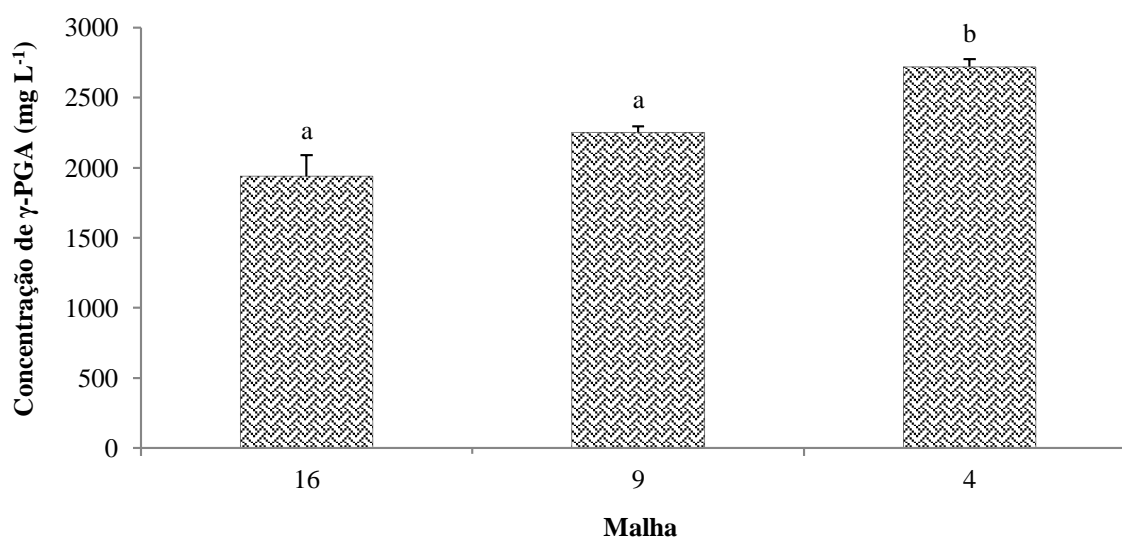
Para verificar se a estrutura física dos grãos de soja influencia na produção do biopolímero, o cultivar BRS 1001 IPRO foi cominuído para alteração da estrutura integral dos grãos de soja (Figura 20). A dimensão dos grânulos na fração fina foi de até 1,00 mm, na fração média de 1,00 mm a 2,00 mm e na fração grossa de 2,00 a 4,75 mm.

Figura 20 - Cominuição dos grãos de soja do cultivar BRS 1001 IPRO, safra 2016.
Fração fina (A), fração média (B) e fração grossa (C).



Os grãos cominuídos produziram 1938,8 mg L⁻¹, 2253,2 mg L⁻¹ e 2721,5 mg L⁻¹ do biopolímero, respectivamente, fração fina, média e grossa (Figura 21). Estes valores de produção do biopolímero possuem diferença estatisticamente significativa nas médias ($p < 0,05$) quando comparados com os grãos de estrutura integral da mesma soja e safra.

Figura 21 - Produção de γ -PGA por *Bacillus licheniformis* em substrato (BRS 1001 IPRO, safra 2016) com diferentes frações.



Todos os dados são apresentados como média \pm desvio padrão e as diferentes letras indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

A cominuição dos grãos de soja aumentou a produção de γ -PGA em todas as frações, quando comparado com o grão de estrutura integral. Um tamanho menor de partículas sólidas de substrato fornece uma maior área de superfície. Esta área ampliada é útil para transferência de massa, aumentando a afinidade do substrato com as células microbianas (NIE et al., 2015).

Grãos de soja possuem o tegumento que é uma barreira à entrada dos microrganismos. O revestimento de grãos de soja apresenta características que lhe confere resistência mecânica e impermeabilidade à água, com objetivo de regular o metabolismo, crescimento e desenvolvimento dos tecidos internos da semente (MURRAY, 1979).

Durante a imersão dos grãos de soja em água a camada protetora foi rompida parcialmente. Quando o grão de soja sofre cominuição esta camada protetora é rompida totalmente e o conteúdo interno exposto completamente. Internamente os grãos são compostos pelo tecido de reserva, que é constituído de carboidratos, lipídios e proteínas.

Com os nutrientes disponibilizados em abundância aos microrganismos, estes intensificaram a produção do biopolímero.

Contudo, a granulometria das partículas também interferiu na fermentação. Na fração fina foi observada a menor produção de γ -PGA, seguida da fração média e grossa. O menor tamanho das partículas, apesar de possuir maior área de superfície, compactou o material em fermentação, reduzindo a aeração de todo o conteúdo e a produção do biopolímero. O aumento de suprimento de oxigênio para células microbianas, principalmente durante a fase exponencial, melhora o rendimento da produção de γ -PGA, sendo este um fator importante na produção do biopolímero (SILVA et al., 2014; SONG et al., 2019).

Com o aumento no tamanho das partículas houve também aumento na aeração durante a fermentação, como se observou nas frações média e grossa. A fração fina e média possuem diferença estatisticamente significativa nas médias ($p < 0,05$) quando comparados com a fração grossa.

Nie et al. (2015) estudaram a influência do tamanho das partículas do substrato de soja (soja integral, $\frac{1}{4}$ da soja integral e farelo de soja) na produção de γ -PGA, e constataram que um tamanho menor das partículas propiciou elevação da produção do biopolímero. Entretanto, o autor descreve que o menor tamanho das partículas poderia inibir a síntese de metabólitos pelo bloqueio do fluxo de ar. Para reduzir estes efeitos cascas de arroz foram adicionadas ao farelo de soja, melhorando a permeabilidade ao ar, o calor dissipado e acelerando a transferência de massa do substrato e produto.

A seleção de um substrato adequado é um fator crítico para FES, pois o substrato não é apenas nutriente, mas também suporte para crescimento que permite a transferência de oxigênio e dispersão de calor. Além disto o substrato deve possuir alto teor de proteínas, fonte de carbono e baixo custo (Xu et al., 2005^b).

Na FES, Xu et al. (2005^b) utilizaram farelo de trigo para aumentar a aeração e intensificar a taxa de consumo da torta de soja em pó que continha alto teor de proteínas. Os autores utilizaram *B. subtilis* CCTCC202048 na FES e atingiram produção a de γ -PGA de 17,89 g/kg e 19,30 g/kg na proporção de torta de soja em pó e farelo de trigo de 1:1 (p/p) e 11:9 (p/p), respectivamente. A baixa aeração em FES tem efeito prejudicial ao metabolismo microbiano, e é importante o equilíbrio entre tamanho das partículas e fluxo de ar (NIE et al., 2015).

Song et al. (2019) afirmam que a utilização de substitutos economicamente mais baratos que os componentes químicos para os meios, reduzem consideravelmente os custos

de produção de γ -PGA. O autor exemplifica descrevendo que a substituição da sacarose pelo farelo de arroz pode reduzir os custos de produção em média a fator de 10.

5.4 Maximização da produção de γ -PGA

A avaliação dos fatores (teor inicial de umidade, volume do inóculo, quantidade de substrato e temperatura) foi realizada utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), consistindo em 31 ensaios incluindo 7 repetições no ponto central e 8 pontos axiais com alfa 2,0. O DCCR compreende o planejamento fatorial com dois níveis adicionado de pontos centrais e axiais necessários para estimar a curvatura e a interação entre os efeitos. (KENNEDY, KROUSE, 1999). A Tabela 8 apresenta os valores originais para os 4 fatores avaliados e a produção de γ -PGA (mg L^{-1}) obtida para cada ensaio após 48 h de cultivo. A maximização da produção de γ -PGA foi realizada com o cultivar BRS 1001 IPRO, safra 2016, cominuído na fração grossa.

Tabela 8 - Matriz do DCCR para 4 fatores e valores obtidos na produção de γ -PGA em 48 h de fermentação em modo estático (continua)

Ensaio	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	γ -PGA (mg L^{-1})
1	45	15	10	33	3094,9
2	55	15	10	33	727,8
3	45	25	10	33	3620,2
4	55	25	10	33	1867,1
5	45	15	20	33	2702,5
6	55	15	20	33	2791,1
7	45	25	20	33	3746,8
8	55	25	20	33	2867,1
9	45	15	10	37	1474,7
10	55	15	10	37	2981,0
11	45	25	10	37	3835,4
12	55	25	10	37	3284,8
13	45	15	20	37	1538,0
14	55	15	20	37	2588,6
15	45	25	20	37	4189,9
16	55	25	20	37	2310,1
17	40	20	15	35	4202,5

Tabela 8 - Matriz do DCCR para 4 fatores e valores obtidos na produção de γ -PGA em 48 h de fermentação em modo estático (conclusão)

Ensaio	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	γ -PGA (mg L ⁻¹)
18	60	20	15	35	1886,1
19	50	10	15	35	943,0
20	50	30	15	35	2924,0
21	50	20	5	35	2025,3
22	50	20	25	35	2670,9
23	50	20	15	31	1303,8
24	50	20	15	39	3113,9
25	50	20	15	35	3354,4
26	50	20	15	35	911,4
27	50	20	15	35	4139,2
28	50	20	15	35	3107,6
29	50	20	15	35	3898,7
30	50	20	15	35	3360,7
31	50	20	15	35	3348,1

x₁: Teor inicial de umidade (%); x₂: Volume do inóculo (%); x₃: Quantidade de substrato (g); x₄: Temperatura (°C).

A avaliação dos fatores e suas interações foi realizada através do valor de significância ($p < 0,05$) (Tabela 9) e os resultados estatisticamente significativos obtidos no DCCR foram submetidos à análise de variância (Tabela 10).

Tabela 9 - Estimativas dos coeficientes das variáveis, estatística de teste T e valor de p (continua)

Fator	Coefficiente	Valor-T	Valor- p
x ₁	-785	-2,22	0,041*
x ₂	982	2,78	0,013*
x ₃	262	0,74	0,470
x ₄	367	1,04	0,314
x ₁ x ₁	113	0,17	0,864
x ₂ x ₂	-998	-1,54	0,143
x ₃ x ₃	-584	-0,90	0,381
x ₄ x ₄	-723	-1,12	0,281
x ₁ x ₂	-1335	-1,54	0,142

Tabela 9 - Estimativas dos coeficientes das variáveis, estatística de teste T e valor de p (conclusão)

Fator	Coeficiente	Valor-T	Valor- p
x_1x_3	386	0,45	0,662
x_1x_4	1259	1,45	0,165
x_2x_3	-209	-0,24	0,812
x_2x_4	563	0,65	0,524
x_3x_4	-937	-1,08	0,295

x_1 : Teor inicial de umidade (%); x_2 : Volume do inóculo (%); x_3 : Quantidade de substrato (g); x_4 : Temperatura (°C). *Fator significativo ($p < 0,05$).

O ensaio 17 apresentou a maior produção do biopolímero de 4202,5 mg L⁻¹ com os valores de umidade em 40%, volume do inóculo de 20%, 15 g de substrato e 35 °C de temperatura da fermentação. A análise de significância estatística mostra que os fatores teor de umidade ($p = 0,041$) e volume do inóculo ($p = 0,013$) são significativos na produção de γ -PGA. Para determinar os valores ótimos dos fatores uma equação de regressão em unidades não codificadas foi obtida (Equação 2) a partir dos dados significativos do DCCR.

$$\gamma\text{-PGA (mg L}^{-1}\text{)} = 4696 - (78,5 \cdot \text{Umidade} + 98,2 \cdot \text{Inóculo})$$

Equação 2

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão para a produção de γ -PGA em 48 h

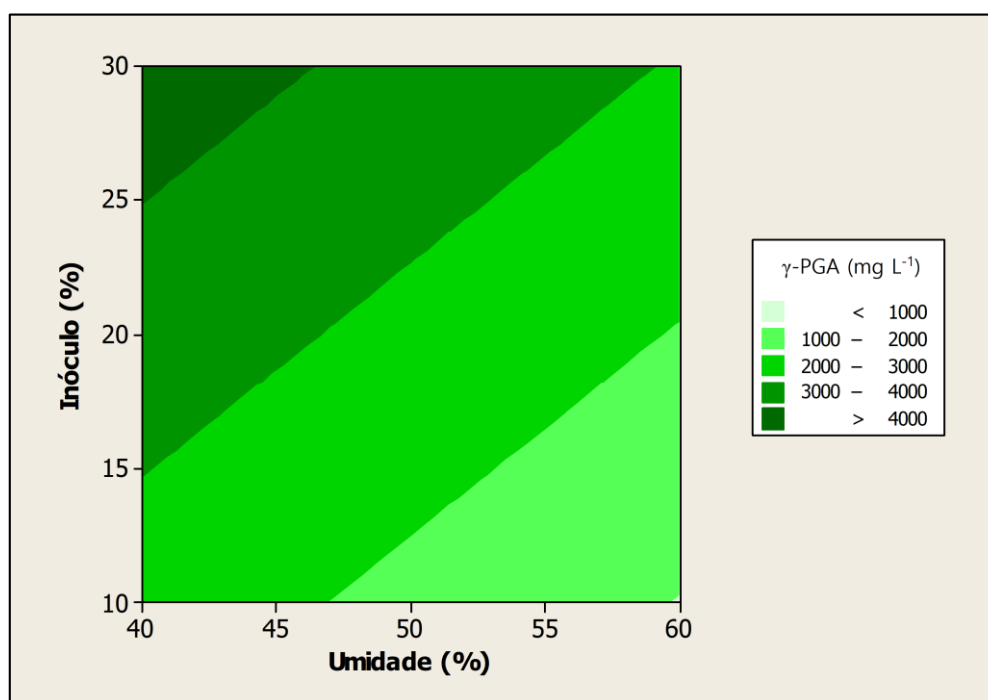
Fonte de variação	GL	SQ	QM	F	Valor- p
Modelo	2	9482301	4741151	6,34	0,005
Linear	2	9482301	4741151	6,34	0,005
Umidade (%)	1	3695562	3695562	4,94	0,034
Inóculo (%)	1	5786740	5786740	7,74	0,010
Erro	28	20934536	747662		
Falta de ajuste	22	14257424	648065	0,58	0,836
Erro Puro	6	6677112	1112852		
Total	30	30416838			

GL: grau de liberdade; SQ: soma de quadrados, QM: quadrado médio; F: estatística F (Fisher-Snedecor). $R^2 = 31,14\%$

Para adoção do modelo a significância da regressão e o ajuste de dados experimentais foram utilizados como critérios. A análise de variância mostrou que o modelo é significativo ($p = 0,005$), além de apresentar falta de ajuste dos dados experimentais não significativo ($p = 0,836$). Estes resultados sugerem que o modelo proposto se apresenta satisfatório.

O diagrama de contorno gerado pelo modelo é apresentado na Figura 22. Por meio do diagrama de contorno é possível observar o comportamento das variáveis independentes e avaliar o impacto destas na produção do biopolímero. A otimização dos fatores significativos prevista pelo modelo indicou produção máxima de γ -PGA de 4502,7 mg L⁻¹, quando o teor inicial de umidade e volume do inóculo fossem 40% e 30%, respectivamente. Foi realizada a validação experimental do modelo utilizando as condições ótimas previstas, além de 20 g de substrato e 37 °C de temperatura, valores que apresentaram maior produção do biopolímero na matriz do DCCR, resultando em produção de 4400,8 mg L⁻¹ de γ -PGA, ou seja, valor próximo ao previsto pelo modelo.

Figura 22 - Gráfico de contorno para a resposta (produção de γ -PGA) em função dos fatores (inóculo e umidade).



Bacillus licheniformis na FES teve rendimento na produção de γ -PGA, aproximadamente, 125 vezes superior à FS no período de 48 h, quando otimizado. Isto resultou na melhora da produtividade de γ -PGA, elevando de $0,73 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (FS) para $91,70 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (FES).

Xu et al. (2005^b) também otimizaram a produção de γ -PGA em FES utilizando *B. subtilis* CCTCC202048. Os fatores otimizados foram a composição do substrato, teor inicial de umidade, temperatura de incubação, período de fermentação e nutrientes adicionais. A produção máxima de γ -PGA obtida foi de $83,61 \text{ g/kg}$, quando se utilizou como substrato torta de soja em pó e farelo de trigo, com teor de umidade inicial de 65%, e suplementado com glutamato ($40,14 \text{ g/kg}$), ácido cítrico ($18,50 \text{ g/kg}$), nitrato de amônio ($20,05 \text{ g/kg}$) e outros sais, e incubados a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ por 42 h. O rendimento foi quatro vezes superior ao antes da otimização.

A partir de experimentos de fator único Fang et al. (2020) utilizando farinha de soja, talo de milho e glutamato monossódico industrial como substrato, aumentaram a produção de γ -PGA otimizando o teor de umidade inicial do substrato, concentração do inóculo e temperatura, e encontraram maior produção de γ -PGA com, respectivamente, 65%, 7% e $35 \text{ }^\circ\text{C}$.

6 CONCLUSÕES

A velocidade específica de crescimento de *B. subtilis* e *B. licheniformis* foi maior em caldo nutriente, quando comparado ao caldo E.

A ativação dos microrganismos em diferentes pré-inóculos alterou a produção de γ -PGA em caldo E, sendo o pré-inóculo em caldo nutriente mais vantajoso.

Os microrganismos apresentaram baixa produção de γ -PGA em fermentação submersa. O maior potencial de produção de γ -PGA foi demonstrado pela bactéria *B. licheniformis* com 398,1 mg L⁻¹. O cultivo em consórcio microbiano não interferiu positivamente na produção de γ -PGA, uma vez que as bactérias apresentaram resultados superiores em culturas separadas. *Bacillus licheniformis* pode ser considerada uma bactéria independente do ácido L-glutâmico, uma vez que é capaz de produzir γ -PGA na ausência de ácido L-glutâmico, à base de glicose, sacarose e glicerol.

A variação genética dos cultivares de soja não influenciou significativamente na concentração de proteínas. Entretanto, o aumento da pluviosidade no período de cultivo determinou o maior teor de proteínas nos grãos de soja.

Neste estudo os cultivares BRS 232, BRS 360 RR e BRS 1001 IPRO da safra 2016 apresentaram maior potencial como substrato na FES por possuírem elevada concentração de proteínas totais, o que induziu o aumento da produção de γ -PGA.

A estrutura física do grão de soja influenciou na produção do biopolímero. A cominuição da soja aumentou a produção de γ -PGA, sendo que na fração grossa a produção foi maior com 2721,5 mg L⁻¹. A cominuição permitiu a disponibilização maior de nutriente aos microrganismos, e a fração grossa reduziu o impacto da compactação, permitindo a aeração do substrato.

O teor inicial de umidade e volume do inóculo foram considerados fatores significativos para a produção de γ -PGA em FES. A otimização dos fatores significativos ampliou a produção de γ -PGA para 4400,8 mg L⁻¹ na fermentação em estado sólido.

Este trabalho demonstrou que a pluviosidade, no período de cultivo da soja, tem maior influência na produção de γ -PGA em FES, que as características genéticas, e a escolha de um cultivar de soja específico para a produção de γ -PGA é irrelevante. Conclui-se que para uma maior produção de γ -PGA, *B. licheniformis* deve ser ativado em pré-inóculo em caldo nutriente, os grãos de soja cominuídos em fração grossa e teor inicial de umidade e volume do inóculo ajustados para a FES.

REFERÊNCIAS

ANGRA, S.; KAUR, S.; SINGH, K.; PATHANIA, D.; KAUR, N.; SHARMA, S.; NAYYAR, H. Water-deficit stress during seed filling in contrasting soybean genotypes: Association of stress sensitivity with profiles of osmolytes and antioxidants. **International Journal of Agriculture Research**, v. 5, p. 328-345, 2010.

ASHIUCHI, M.; TANI, K.; SODA, K.; MISONO, H. Properties of glutamate racemase from *Bacillus subtilis* ifo 3336 producing poly- γ -glutamate. **Journal of Biochemistry**, v. 123, n. 6, p. 1156-1163, 1998.

ASHIUCHI, M.; SODA, K.; MISONO, H. 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**, v. 263, p. 6-12, 1999.

ASHIUCHI, M.; KAMEI, T.; BAEK, D. H.; SHIN, S. Y.; SUNG, M. H.; SODA, K.; YAGI, T.; MISONO, H. Isolation of *Bacillus subtilis* (chungkookjang), a poly-gamma-glutamate producer with high genetic competence. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, n. 5-6, p. 764-769, 2001.

ASHIUCHI, M.; MISONO, H. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, n. 1, p. 9-1, 2002.

ASHIUCHI, M.; KAMEI, T.; MISONO, H. Poly-gamma-glutamate synthetase of *Bacillus subtilis*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 23, p. 101-106, 2003.

ASHIUCHI, M.; SHIMANOUCI, K.; NAKAMURA, H.; KAMEI, T.; SODA, K.; PARK, C.; SUNG, M. H.; MISONO, H. Enzymatic synthesis of high-molecular-mass poly-gamma-glutamate and regulation of its stereochemistry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4249-4255, 2004.

ASHIUCHI, M. Microbial production and chemical transformation of poly- γ -glutamate. **Microbial Biotechnology**, v. 6, p. 664-674, 2013.

ASHOK, A.; DORIYA, K.; RAO, D. R. M.; KUMAR, D. S. Design of solid state bioreactor for industrial applications: An overview to conventional bioreactors. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, p. 11-18, 2017.

AVICHEZER, D.; SCHECHTER, B.; ARNON, R. Functional polymers in drug delivery: carrier-supported CDDP (cis-platin) complexes of polycarboxylates-effect on human ovarian carcinoma. **Reactive and Functional Polymers**, v. 36, p. 59-69, 1998.

ÁVILA, M. R.; BRACCINI, A. L.; SCARPIN, C. A.; MANDARINO, J. M. G.; ALBRECHT, L. P.; VIDIGAL FILHO, P. S. Isoflavone, protein and oil contents and soybean seed quality. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 29, n. 3, p. 111-127, 2007.

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. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 35, p. 1581-1586, 2008.

BAJAJ, I. B.; SINGHAL, R. S. Enhanced production of poly (gamma-glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by using metabolic precursors. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 159, p. 133-141, 2009.

BAJAJ, I.; SINGHAL, R. Poly (glutamic acid) – An emerging biopolymer of commercial interest. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5551-5561, 2011.

BALLARDO, C.; ABRAHAM, J.; BARRENA, R.; ARTOLA, A.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Valorization of soy waste through SSF for the production of compost enriched with *Bacillus thuringiensis* with biopesticide properties. **Journal of Environmental Management**, v. 169, p. 126-131, 2016.

BANASZKIEWICZ, T. Nutritional value of soybean meal. In: EL-SHEMY, H. (Ed.). **Soybean and nutrition**. InTech, 2011. p. 1-20.

BARION, G.; HEWIDY, M.; MOSCA, G.; VAMERALI, T. Intraspecific variability for soybean cotyledon isoflavones in different cropping and soil conditions. **European Journal of Agronomy**, v. 33, n. 2, p. 63-73, 2010.

BARROS, A. L. M. **Capital, produtividade e crescimento da agricultura brasileira: o Brasil de 1970 a 1995**. 1999. 149 f. Tese – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1999.

BATOOL, T.; MAKKY, E. A.; JALAL, M.; YUSOFF, M. M. A comprehensive review on L-Asparaginase and its applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 178, p. 900-923, 2015.

BEHERA, S. S.; RAY, R. C. Solid state fermentation for production of microbial cellulases: recent advances and improvement strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 656-669, 2016.

BELITSKY, B. R.; SONENSHEIN, A. L. Role and regulation of *Bacillus subtilis* glutamate dehydrogenase genes. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 6298-6305, 1998.

BELLALOU, N.; MENGISTU, A.; FISHER, D. K.; ABEL, C. A. Soybean seed composition constituents as affected by drought and phomopsis susceptible and resistant genotypes. **Journal of Crop Improvement**, v. 26, p. 428-453, 2012.

BENZAIN, B.; LANE, P. W. Protein concentration of grains in relation to some weather and soil factors during 17 years of English winter-wheat experiments. **Journal of Science of Food and Agriculture**, v. 37, p. 435-444, 1986.

BHARDWAJ, H. L.; BHAGSARI, A. S.; JOSHI, J. M.; RANGAPPA, M., SAPRA, V. T.; RAO, M. S. S. Yield and quality of soymilk and tofu made from soybean genotypes grown at four locations. **Crop Science**, v. 39, n. 2, p. 401-405, 1999.

BHAT, A. R.; IRORERE, V. U.; BARTLETT, T.; HILL, D.; KEDIA, G.; MORRIS, M. R.; CHARALAMPOPOULOS, D.; RADECKA, I. *Bacillus subtilis natto*: a non-toxic source of poly- γ -glutamic acid that could be used as a cryoprotectant for probiotic bacteria. **AMB Express**, v. 3, n. 1, p. 36-45, 2013.

BIRRER, G. A.; CROMWICK, A. M.; GROSS, R. A. γ -Poly(glutamic acid) formation by *Bacillus licheniformis* 9945a: physiological and biochemical studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 16, p. 265-275, 1994.

BODNÁR, M.; KJONIKSEN, A. L.; MOLNAR, R. M.; HARTMANN, J. F.; DAROCZI, L.; NYSTROEM, B.; BORBEL, Y. J. Nanoparticles formed by complexation of poly-gamma-glutamic acid with lead ions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, p. 1185-1192, 2008.

BOVARNICK, M. The formation of extracellular D (-) glutamic acid polypeptide by *Bacillus subtilis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 145, p. 415-424, 1942.

BOYDAK, E.; ALPASLAN, M.; HAYTA, M.; GERCEK, S.; SIMSEK, M. Seed composition of soybeans grown in the Harran region of Turkey as affected by row spacing and irrigation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 4718-4720, 2002.

BRITO, P. N. **Produção de ácido gama-poliglutâmico: estudo e otimização do processo utilizando resíduos agroindustriais.** 2014. 50 f. Dissertação – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014.

BRUMM, T. J.; HURBURGH-JR, C. R. Estimating the processed value of soybeans. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, p. 302-307, 1990.

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. *Bacillus anthracis* CapD, belonging to the gamma-glutamyltranspeptidase family, is required for the covalent anchoring of capsule to peptidoglycan. **Molecular Microbiology**, v. 57, p. 717-726, 2005.

CANDELA, T.; MOCK, M.; FOUET, A. CapE, a 47-amino-acid peptide, is necessary for *Bacillus anthracis* polyglutamate capsule synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 187, p. 7765-7772, 2005.

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

CANDELA, T.; MOYA, M.; HAUSTANT, M.; FOUET, A. *Fusobacterium nucleatum*, the first Gram-negative bacterium demonstrated to produce polyglutamate. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 55, n. 5, p. 627-632, 2009.

CARRERA, C.; MARTÍNEZ, M. J.; DARDANELLI, J.; BALZARINI, M. Water deficit effect on the relationship between temperatura during the seed fill period and soybean seed oil and protein concentrations. **Crop Science**, v. 49, p. 990-998, 2009.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos.** 2. ed. São Paulo: Editora da UNICAMP, 2003.

CESARO, A.; SILVA, S. B.; AYUB, M. A. Z. Effects of metabolic pathway precursors and polydimethylsiloxane (PDMS) on poly-(gamma)-glutamic acid production by *Bacillus subtilis* BL53. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 9, p. 1375-1382, 2014.

CHEN, X.; CHEN, S.; SUN, M.; YU, Z. High yield of poly- γ -glutamic acid from *Bacillus subtilis* by solid-state fermentation using swine manure as the basis of a solid substrate. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 17, p. 1872-1879, 2005^a.

CHEN, X.; CHEN, S.; SUN, M.; YU, Z. Medium optimization by response surface methodology for poly- γ -glutamic acid production using dairy manure as the basis of solid substrate. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 69, p. 390-396, 2005^b.

CHEN, J.; SHI, F.; ZHANG, B.; ZHU, F.; CAO, W. F.; XU, Z. N.; XU, G. H.; CEN, P. L. Effects of cultivation conditions on the production of γ -PGA with *Bacillus subtilis* ZJU-7. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 2, p. 370-377, 2008.

CHENG, C.; ASADA, Y.; AIDA, T. Production of γ -poluglutamic acid by *Bacillus licheniformis* A35 under denitrifying conditions. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, p. 2369-2375, 1989.

CHISTI, Y. Fermentation (industrial) basic considerations. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (Eds.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. Academic Press, 2014. p. 663-674.

CHOI H. J.; KUNIOKA, M. Preparation conditions and swelling equilibria of hydrogel prepared by γ -irradiation from microbial poly- γ -glutamic acid. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 46, p. 175-179, 1995.

CLAYTON, B. E. Report of the lower moor incident advisory group. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 40, n. 3, p. 301-304, 1989.

CROMWICK, A. M.; GROSS, R. A. Effects of manganese (II) on *Bacillus licheniformis* ATCC 9945A physiology and γ -poly(glutamic acid) formation **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 17, p. 259-267, 1995.

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

DAAE – Departamento de Águas e Energia Elétrica. **Banco de Dados Hidrológicos**. Disponível em: < www.hidrologia.daae.sp.gov.br>. Acesso em: 12 jan. 2019.

DE VRIES, P.; BHATT, R.; TULINSKY, J.; HEASLEY, E.; STONE, I.; KLEIN, P.; LI, C.; WALLACE, S.; LEWIS, R.; SINGER, J. Water-soluble poly-L-glutamic acid (PG)-

camptotehcin (CPT) conjugates enhance CPT stability and efficacy in vivo. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 223, 2000.

DO, T. H.; SUZUKI, Y.; ABE, N.; KANEKO, J.; ITOH, Y.; KIMURA, K. Mutations suppressing the loss of DegQ function in *Bacillus subtilis* (natto) poly- γ -glutamate synthesis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, p. 8249-8258, 2011.

DORIYA, K.; JOSE, N.; GOWDA, M.; KUMAR, D. S. Chapter Six - Solid-State Fermentation vs Submerged Fermentation for the Production of L-Asparaginase. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 78, p. 115-135, 2016.

DURAND, A. Bioreactor designs for solid state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 1-2, p. 113-125, 2003.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Tecnologias para a cultura da soja na região central do Brasil 2008. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/139668/1/tecno-01.pdf>>. Acesso em: 01 mar. 2016.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Tecnologias de produção de soja região central do Brasil 2005. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/download/publicacao/central_2005.pdf>. Acesso em: 01 mar. 2016.

EMPINOTTI, V. L.; BUDDS, J.; AVERSA, M. Governance and water security: The role of the water institutional framework in the 2013–2015 water crisis in São Paulo, Brazil. **Geoforum**, v. 98, p. 46-54, 2019.

EVELAND, S. S.; POMPLIANO, D. L.; ANDERSON, M. S. Conditionally lethal *Escherichia coli* murein mutants contain point defects that map to regions conserved among murein and folyl poly- γ -glutamate ligases: identification of a ligase superfamily. **Biochemistry**, v. 36, n. 20, p. 6223-6229, 1997.

FANG, J.; LIU, Y.; HUAN, C.; XU, L.; JI, G.; YAN, Z. Comparison of poly- γ -glutamic acid production between sterilized and non-sterilized solid-state fermentation using agricultural waste as substrates. **Journal of Cleaner Production**, v. 255, p. 120248, 2020.

FEDERIZZI, L. C. **A soja como fator de competitividade no mercosul: histórico, produção e perspectivas futuras**. In: III Encontro CEPAN: Vantagens Competitivas dos Agronegócios no Mercosul, 3., 2005. Porto Alegre. CD dos Anais, Centro de Estudos e Pesquisas em Agronegócios – CEPAN/UFRGS, 2005.

FERREIRA, D. B.; RAO, V. B. Recent climate variability and its impacts on soybean yields in Southern Brazil. **Theoretical and Applied Climatology**, v. 105, p. 83-97, 2011.
FIRESTONE, D. **Official methods and recommended practices of the american oil chemists society**. 6. ed. Urbana: AOCS, 2014.

FUKUSHIMA, D.; HASHIMOTO, H. Processing of world soybean research conference. **Oriental soybean foods**, Colorado: Westview Press, p. 729-743, 1980.

FUKUSHIMA, D. Recent progress in research and technology on soybeans. **Food Science and Technology Research**, v. 7, n. 1, p. 8-16, 2001.

GIBSON, L. R.; MULLEN, R. E. Soybean seed composition under high day and night growth temperatures. **Crop Science**, v. 73, p. 733-737, 1996.

GOTO, A.; KUNIOKA, M. Biosynthesis and Hydrolysis of Poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus subtilis* IF03335. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 56, n. 7, p. 1031-1035, 1992.

GRAU, H. R.; AIDE, T. M.; GASPARRI, N. I. Globalization and soybean expansion into semiarid ecosystems of Argentina. **Ambio**, v. 34, n. 3, p. 265-266, 2005.

HARRIS, H. C.; WILLIAM, J. R.; MASON, W. K. Influence of temperature on oil content and composition of sunflower seed. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 29, n. 3, p. 1203-1212, 1978

HAYATI, R.; EGLI, D. B.; CRAFTS-BRANDNER, S. J. Carbon and nitrogen supply during seed filling and leaf senescence in soybean. **Crop science**, v. 35, p. 1063-1069, 1995.

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

HEZAYEN, F. F.; REHM, B. H.; TINDALL, B. J.; STEINBUCHER, A. Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* 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**, v. 51, p. 1133-1142, 2001.

HO, G. H.; HO, T. I.; HSIEH, K. H.; SU, Y. C.; LIN, P. Y.; YANG, J.; YANG, K. H.; YANG, S. C. γ -Polyglutamic acid produced by *Bacillus subtilis* (natto): structural characteristics, chemical properties and biological functionalities. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 53, p. 1363-1384, 2006.

HSUEH, Y. H.; HUANG, K. Y.; KUNENE, S. C.; LEE, T. Y. Poly- γ -glutamic acid synthesis, gene regulation, phylogenetic relationships, and role in fermentation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2644, 2017.

HYMOWITZ, T. **On the domestication of the soybean. Economic Botany**, v. 23, p. 408-421, 1970.

INBARAJ, B. S.; WANG, J. S.; LU, J. F.; SIAO, F. Y.; CHEN, B. H. Adsorption of toxic mercury(II) by an extracellular biopolymer poly(γ -glutamic acid). **Bioresource Technology**, v. 100, p. 220-207, 2009.

INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. **Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa (BDMEP)**. Disponível em:
<<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep>>. Acesso em: 15 jan. 2019.

ITO, Y.; TANAKA, T.; OHMACHI, T.; ASADA, Y. Glutamic acid independent production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus subtilis* TAM-4. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 60, n. 8, p. 1239-1242, 1996.

IVANOVICS, G.; BRUCKNER, V. The chemistry of the capsule substance of *B. anthracis* and its identity with that of *B. mesentericus*. **Zeitschrift für Immunitätsforschung**, v. 90, p. 304-318, 1937.

JEONG, J. H.; KIM, J. N.; WEE, Y. J.; RYU, H. W. The statistically optimized production of poly(γ -glutamic acid) by batch fermentation of a newly isolated *Bacillus subtilis* RKY3. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 4533-4539, 2010.

JIAN, X.; SHOUWEN, C.; ZINIU, Y. Optimization of process parameters for poly [γ]-glutamate production under solid state fermentation from *Bacillus subtilis* CCTCC202048. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 9, p. 3075-3081, 2005.

JIAN, H.; SHANG, L.; YOON, S. H.; LEE, S. Y.; YU, Z. Optimal production of poly- γ -glutamic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 16, p. 3075-3081, 2006.

JIANG, H.; SHANG, L.; YOON, S. H.; LEE, S. Y.; YU, Z. Optimal production of poly-gamma-glutamic acid by metabolically engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 16, p. 241-246, 2006.

JIANG, K.; TANG, B.; WANG, Q.; XU, Z.; SUN, L.; MA, J.; LI, S.; XU, H.; LEI, P. The bio-processing of soybean dregs by solid state fermentation using a poly γ -glutamic acid producing strain and its effect as feed additive. **Bioresource Technology**, v. 291, p. 121841, 2019.

JU, W. T.; SONG, Y. S.; JUNG, W. J.; PARK, R. D. Enhanced production of poly- γ -glutamic acid by a newly-isolated *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 36, p. 2319-2324, 2014.

JUNG, D. Y.; JUNG, S.; YUN, J. S.; KIM, J. N.; WEE, Y. J.; JANG, H. G.; RYU, H. W. Influences of cultural medium component on the production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus* sp. RKY3. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 10, p. 289-295, 2005.

KADA, S.; NANAMIYA, H.; KAWAMURA, F.; HORINOUCI, S. Glr, a glutamate racemase, supplies d-glutamate to both peptidoglycan synthesis and poly- γ -glutamate production in γ -PGA-producing *Bacillus subtilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 236, n. 1, p. 13-20, 2004.

KANNO, A.; TAKAMATSU, H. Determination of polyglutamic acid in "Natto" using cetyltrimethylammonium bromide (Studies on "Natto" part V). **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v. 42, p. 878-886, 1995.

KARASAWA, M.; TANIMOTO, H.; TORIDE, Y. **The use of poly-gamma-glutamic acid for preparing an agent for increasing the phosphorus assimilation**. European patent EP0838160, 1998.

KARR-LILIENTHAL, L. K.; GRIESHOP, C. M.; MERCHEN, N. R.; MAHAN, D. C.; FAHEY, G. C. Chemical composition and protein quality comparisons of soybean and soybean meals from five leading soybean-producing countries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 6193-6199, 2004.

KASHIMA, N.; FURUTA, K.; TANABE, I. 2006. **Permeability enhancer**. United States Patent 20060025346, 2006.

KENNEDY, M; KROUSE, D. Strategies for improving fermentation medium performance: a review. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 456-475, 1999.

KIMURA, K.; TRAN, L. S. P.; UCHIDA, I.; ITOH, Y. Characterization of *Bacillus subtilis* γ -glutamyltransferase and its involvement in the degradation of capsule poly- γ -glutamate. **Microbiology**, v. 150, p. 4115-4123, 2004.

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

KIUCHI, K.; WATANABE, S. Industrialization of Japanese *natto*. In: STEINKRAUS, K. H. (Ed.). **Industrialization of Indigenous Fermented Food**, 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2004. p. 193- 246.

KLEINKAUF, H.; DÖHREN, H. A nonribosomal system of peptide biosynthesis. **European Journal of Biochemistry**, v. 236, n. 2, p. 335-351, 1996.

KOCIANOVA, S.; VUONG, C.; YAO, Y.; VOYICH, J. M.; FISCHER, E. R.; DELEO, F. R.; OTTO, M. Key role of poly-gamma-DL-glutamic acid in immune evasion and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 115, p. 688-694, 2005.

KONGKLOM N.; LUO, H.; SHI, Z.; SIRISANSANEEYAKUL, S. Production of poly-gamma-glutamic acid by glutamic acid-independent *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 using different feeding strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 100, p. 67-75, 2015.

KONGKLOM, N.; SHI, Z. P.; CHISTI, Y.; SIRISANSANEEYAKUL, S. Enhanced production of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus licheniformis* TISTR 1010 with environmental controls. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, p. 990-999, 2017.

KONNO, A.; TAGUCHI, T.; YAMAGUCHI, T. **Bakery products and noodles containing polyglutamic acid**. United States Patent 4888193A, 1989.

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

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

LATIMER, J. R. ; G. W. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 19. ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2012.

LAZAZZERA, B. A.; PALMER, T.; QUISEL, J.; GROSSMAN, A. D. Cell-density control of gene expression and development in *Bacillus subtilis*. In: DUNNY, G. M.; WINANS, S. C. (Eds). **Cell-Cell Signaling in Bacteria**, Washington DC: ASM Press, 1999. p. 27-47.

LEAL, J. C. **Plantas da lavoura sul rio-grandense**. Porto Alegre: UFRGS, 1967. 274 p.

LEONARD, C. G.; HOUSEWRIGHT, R. D.; THORNE, C. B. Effects of some metallic ions on glutamyl polypeptide by *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 76, n. 5, p. 499-503, 1958.

LI, C.; YU, D. F.; NEWMAN, A.; CABRAL, F.; STEPHENS, C.; HUNTER, N.; MILAS, L.; WALLACE, S. Complete regression of well-established tumors using novel water-soluble poly(l-glutamic acid)-paclitaxel conjugate. **Cancer Research**, v. 58, n. 11, p. 2404-2409, 1998.

LUO, Z.; GUO, Y.; LIU, J.; QIU, H.; ZHAO, M.; ZOU, W.; LI, S. Microbial synthesis of poly-gamma-glutamic acid: current progress, challenges, and future perspectives. **Biotechnology for Biofuels**, v. 9, p. 134, 2016.

MACASKIE, L. E.; BASNAKOVA, G. Microbially-enhanced chemisorption of heavy metals: a method for the bioremediation of solutions containing longlived isotopes of neptunium and plutonium. **Environmental Science and Technology**, v. 32, p. 184-187, 1998.

MAHMOUD, D. A. R. Isolation of polyglutamic acid flocculant producing bacteria from extreme Egyptian environments. **Journal of Applied Science Research**, v. 2, n. 9, p. 608-612, 2006.

MAKINO, S.; UCHIDA, I.; TERAKADO, N.; SASAKAWA, C.; YOSHIKAWA, M. Molecular characterization and protein analysis of the cap region, which is essential for encapsulation in *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 722-730, 1989.

MARK, S. S.; CRUSBERG, T. C.; DACUNHA, C. M.; DI IORIO, A. A. A heavy metal biotrap for wastewater remediation using polygamma-glutamic acid. **Biotechnology Progress**, v. 22, p. 523-531, 2006.

MCLEAN, R. J.; BEAUCHEMIN, D.; CLAPHAM, L.; BEVERIDGE, T. J. Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3671-3677, 1990.

MCLEAN, R. C.; BEAUCHEMIN, D.; BEVERIDGE, T. J. Influence of oxidation state on iron binding by *Bacillus licheniformis* capsule. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 405-408, 1992.

MEERAK, J.; IIDA, H.; WATANABE, Y.; MIYASHITA, M.; SATO, H.; NAKAGAWA, Y.; TAHARA, Y. Phylogeny of γ -polyglutamic acid-producing *Bacillus* strains isolated from fermented soybean foods manufactured in Asian countries. **General and Applied Microbiology**, v. 53, p. 315-323, 2007.

MERTZ, L. M.; HENNING, G. A.; CRUZ, H. L.; MENEGHELLO, G. E.; FERRARI, C. S.; ZIMMER, P. D. Structural differences between soybean seed coat with contrasting permeability. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 1, p. 23-29, 2009.

MESNAGE, S.; TOSI-COUTURE, E.; GOUNON, P.; MOCK, M.; FOUET, A. The capsule and S-layer: two independent and yet compatible macromolecular structures in *Bacillus anthracis*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, p. 52-58, 1998.

MIENDA, B. S.; IDI, A.; UMAR, A. Microbiological features of solid state fermentation and its applications: an overview. **Research in Biotechnology**, v. 2, n. 6, p. 21-26, 2011.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; STUART, D. M.; PANDEY, A. New developments in solid-state fermentation II. Rational approaches to the design, operation and scale-up of bioreactors. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1211-1225, 2000.

MITSUIKI, M.; MIZUNO, A.; TANIMOTO, H.; MOTOKI, M. Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of oligo- and poly(glutamic acid)s. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 891-895, 1998.

MOHANRAJ, R.; GNANAMANGAI, B. M.; RAMESH, K.; PRIYA, P.; SRISUNMATHI, R.; POORNIMA, S.; PONMURUGAN, P.; ROBINSON, J. P. Optimized production of gamma poly glutamic acid (γ -PGA) using sago. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 22, p. 101413, 2019.

MORAES, L. P.; ALEGRE, R. M.; BRITO, P. N. Optimisation of poly(γ -glutamic acid) production by *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 in liquid fermentation with molasses as the carbon source without addition of glutamic acid. **International Review of Chemical Engineering**, v. 4, p. 618-623, 2012.

- MURRAY, D. R. Nutritive role of the seed coats during embryo development in *Pisum sativum* L. **Plant Physiology**, v. 64, p. 763-769, (1979).
- NDABIGENGESERE, A.; NARASIAH, K. S. Quality of water treated by coagulation using *Moringa oleifera* seeds. **Water research**, v. 32, n. 3, p. 781-791, 1998.
- NIE, G.; ZHU, Z.; LIU, F.; NIE, Z.; YE, Y.; YUE, W. Co-production of nattokinase and poly(γ -glutamic acid) under solid-state fermentation using soybean and rice husk. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 58, n. 5, p. 718-724, 2015.
- OBST, M.; STEINBUCHER, A. Microbial degradation of poly(amino acid)s. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 1166-1176, 2004.
- OGAWA, Y.; YAMAGUCHI, F.; YUASA, K.; TAHARA, Y. Efficient production of gamma-polyglutamic acid by *Bacillus subtilis* (natto) in jar fermenters. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 61, n. 10, p. 1684-1687, 1997.
- OGUNLEYE, A. **Bacterial poly-gamma-glutamic acid (γ -pga) – a promising biosorbent of heavy metals**. 2015. 247 f. Tese – University of Wolverhampton, Wolverhampton, 2015.
- OGUNLEYE, A.; BHAT, A.; IRORERE, VU.; HILL, D.; WILLIAMS, C.; RADECKA, I. Poly- γ -glutamic acid: production, properties and applications. **Microbiology**, v. 161, p. 1-17, 2015.
- OH, S. M.; JANG, E. K.; SEO, J. H.; RUY, M. J.; LEE, S. P. Characterization of γ -polyglutamic acid produced from the solid-state fermentation of soybean milk cake using *Bacillus* sp. **Food Science and Technology**, v. 16, n. 4, p. 509-514, 2007.
- OPPERMANN-SANIO, F.; STEINBÜCHER, A. Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. **Naturwissenschaften**, v. 89, n. 1, p. 11-22, 2002.
- OTANI, Y.; TABATA, Y.; IKADA, Y. Effect of additives on gelation and tissue adhesion of gelatin–poly(l-glutamic acid). **Biomaterials**, v. 19, p. 2167-2173, 1998.
- PASSARINI, M. R. Z.; SANTOS, C.; LIMA, N.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Dracmacidon reticulatum*. **Archives of Microbiology**, v. 195, p. 99-111, 2013.

PATNALA, H. S.; KABILAN, U.; GOPALAKRISHNAN, L.; RAO, R. M. D.; KUMAR, D. S. Chapter four - marine fungal and bacterial isolates for lipase production: a comparative study. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 78, p. 71-94, 2016.

PENG, Y. Y.; JIANG, B.; ZHANG, T.; MU, W. M.; MIAO, M.; HU, YF. High level production of poly(γ -glutamic acid) by a newly isolated glutamate-independent strain, *Bacillus methylotrophicus*. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 329-335, 2015.

PIPOLO, A. E.; SINCLAIR, T. R.; CAMARA, G. M. S. Effects of temperature on oil and protein concentration in soybean seeds cultured *in vitro*. **Annals of Applied Biology**, v. 144, p. 71-76, 2004^a.

PIPOLO, A. E.; SINCLAIR, T. R.; CAMARA, G. M. S. Protein and oil concentration of soybean seed cultured *in vitro* using nutrient solutions of differing glutamine concentration. **Annals of Applied Biology**, v. 144, p. 223-227, 2004^b.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de bacillus e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 26-27, 1998.

RICHARD, A.; MARGARITIS, A. Optimization of cell growth and poly(glutamic acid) production in batch fermentation by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, v. 25, n. 6, p. 465-468, 2003.

ROTUNDO, J. L.; WESTGATE, M. E. Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. **Field Crops Research**, v. 110, p. 147-156, 2009.

ROTUNDO, J. L.; WESTGATE, M. E. Rate and duration of seed component accumulation in water-stressed soybean. **Crop Science**, v. 50, p. 676-684, 2010.

SAKAI, K.; SONODA, C.; MURASE, K. **Bitterness relieving agent**. Japanese Patent WO0021390, 2000.

SANDA, F.; FUJIYAMA, T.; ENDO, T. Chemical synthesis of poly-gamma-glutamic acid by polycondensation of gamma-glutamic acid dimer: synthesis and reaction of poly-gamma-glutamic acid methyl ester. **Journal of Polymer Science, Polymer Chemistry**, v. 39, p. 732-741, 2001.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O. P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1-17, 2004.

SEDIYAMA, T. (Org.). **Tecnologias de produção e usos da soja**. Londrina, PR: Mecenas, 2009, v. 1. 314 p.

SEKINE, T.; NAKAMURA, T.; SHIMIZU, Y.; UEDA, H.; MATSUMOTO, K.; TAKIMOTO, Y.; KIYOTANI, T. A new type of surgical adhesive made from porcine collagen and polyglutamic acid. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 35, p. 305-310, 2000.

SHA, C.; YANG, Z. CHEN, J. **Production of polyglutamic acid using na bean *Bacillus* solid fermentation and its product application**. Chinese Patent CN1718735B, 2004.

SHIGERU, Y.; REIKO, K. **New gamma-polyglutamic acid, production thereof and drink agent containing the same**. Japanese Patent JP403047087A, 1991.

SHIH, I. L. VAN, Y. T.; YEH, L. C.; LIN, H. G.; CHANG, Y. N. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. **Bioresource Technology**, v. 78, n. 3, p. 267-272, 2001.

SHIH, I. L.; VAN, Y. T. The production of poly(γ -glutamic acid) from microorganisms and its various applications. **Bioresource Technology**, v. 79, n. 3, p. 207-225, 2001.

SHIH, I. L.; VAN, Y. T.; CHANG, Y. N. Application of statistical experimental methods to optimize production of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis* CCRC 12826. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 3, p. 213-220, 2002.

SHIH, I. L. Antifreeze activities of poly(γ -glutamic acid) by *Bacillus licheniformis*. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1709-1712, 2003.

SHIH, I. L.; WU, P. J.; SHIEH, C. J. Microbial production of a poly(γ -glutamic acid) derivative by *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 8, p. 2827-2832, 2005.

SHIN, I. L.; VAN, Y. T.; YEH, L. C. Production of a biopolymer flocculant from *Bacillus licheniformis* and its flocculation properties. **Bioresource Technology**, v. 78, p. 267-272, 2001.

SILVA, B. S. **Produção e otimização do processo de obtenção de ácido γ -poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53.** 2010. 115 f. Tese – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SILVA, S. B.; CANTARELLI, V. V.; AYUB, M. A. Z. Production and optimization of poly- γ -glutamic acid by *Bacillus subtilis* BL53 isolated from the Amazonian environment. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 37, p. 469-479, 2014.

SIRISANSANEEYAKUL, S.; CAO, M.; KONGKLOM, N.; CHUENSANGJUN, C.; SHI, Z.; CHISTI, Y. Microbial production of poly- γ -glutamic acid. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, p. 173, 2017.

SOLIMAN, N. A.; BEREKAA, M. M.; ABDEL-FATTAH, Y. R. Polyglutamic acid (PGA) production by *Bacillus* sp. SAB-26: application of Plackett-Burman experimental design to evaluate culture requirements. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 3, p. 259-267, 2005.

SONG, D. Y.; REDDY, L. V.; CHARALAMPOPOULOS, D.; WEE, Y. J. Poly-(γ -glutamic acid) production and optimization from agro-industrial bioresources as renewable substrates by *Bacillus* sp. FBL-2 through response surface methodology. **Biomolecules**, v. 9, p. 754, 2019.

SPECHT, J. E.; CHASE, K.; MACRANDER, M.; GRAEF, G. L.; CHUNG, J.; MARKWELL, J. P.; GERMANN, M.; ORF, J. H.; LARK, K. G. Soybean response to water: A QTL analysis of drought tolerance. **Crop Science**, v. 41, p. 493-509, 2001.

STANLEY, N. R.; LAZAZZERA, B. A. Defining the genetic differences between wild and domestic strains of *Bacillus subtilis* that affect poly-gamma-dl-glutamic acid production and biofilm formation. **Molecular Microbiology**, v. 57, p. 1143-1158, 2005.

STOLF-MOREIRA, R.; MEDRI, M. E.; NEUMAIER, N.; LEMOS, N. G.; PIMENTA, J. A.; TOBITA, S.; BROGIN, R. L.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; FARIAS, J. R. B.; ABDELNOOR, R. V.; NEPOMUCENO, A. L. Soybean physiology and gene expression during drought. **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p. 1946-1956, 2010.

SUNG, M. H.; PARK, C.; KIM, C. J.; POO, H.; SODA, K.; ASHIUCHI, M. Natural and edible biopolymer poly-gamma-glutamic acid: synthesis, production, and applications. **The Chemical Record**, v. 5, p. 352-366, 2005.

SUNG, H. W.; LIANG, H.F.; TU, H. **Nanoparticles for paracellular drug delivery**. United States Patent 20060073210, 2006.

TANAKA, R. T.; MASCARENHAS, H. A. A; BORKET, C. M. Nutrição mineral da soja. In: ARANTES, N. E.; SOUZA, P. I. M. (Eds). **Cultura de soja nos cerrados**. Piracicaba: Potafos, 1993. 535p.

TANG, B.; LEI, P.; XU, Z.; JIANG, Y.; XU, Z.; LIANG, J.; FENG, X.; XU, H. Highly efficient rice straw utilization for poly-(γ -glutamic acid) production by *Bacillus subtilis* NX-2. **Bioresource Technology**, v. 193, p. 370-376, 2015.

TANIGUCHI, M.; KATO, K.; MATSUI, O.; PING, X.; NAKAYAMA, H.; USUKI, Y.; ICHIMURA, A.; FUJITA, K.; TANAKA, T.; TARUI, Y.; HIRASAWA, E. Flocculation activity of cross-linked poly- γ -glutamic acid against bentonite and *Escherichia coli* suspension pretreated with FeCl_3 and its interaction with Fe^{3+} . **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, n. 2, p. 207-211, 2005^a.

TANIGUCHI, M.; KATO, K.; SHIMAUCHI, A.; PING, X.; NAKAYAMA, H.; FUJITA, K.; TANAKA, T.; TARUI, Y.; HIRASAWA, E. Proposals for wastewater treatment by applying flocculating activity of cross-linked poly- γ -glutamic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 3, p. 245-251, 2005^b.

TANIGUCHI, M.; KATO, K.; SHIMAUCHI, A.; XU, P.; FUJITA, K.; TANAKA, T.; TARUI, Y.; HIRASAWA, E. Physicochemical properties of cross-linked poly- γ -glutamic acid and its flocculating activity against kaolin suspension. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 2, p. 130-135, 2005^c.

TANIMOTO, H.; SATO, H.; KURAISHI, C.; KIDO, K.; SEGUTO, K. **High absorption mineral-containing composition and foods**. United State Patent US5447732, 1995.

TANIMOTO, H.; SATO, H.; KARASAWA, M.; IWASAKI, K.; OSHIMA, A.; ADACHI, S. **Feed composition containing poly- γ -glutamic acid**. Japanese Patent WO9635339, 2000.

TANIMOTO, H. Food applications of poly-gamma-glutamic acid. In: Hamano, Y. (Ed.). **Amino-acid homopolymers occurring in nature**, New York: Springer, 2010. p. 156-166.

TAVERNIER, I. **Microbial production of poly(glutamic acid)**. 2014. 67 f. Dissertação – Universiteit Gent, Gent, 2014.

THOMAS, J. M. G.; BOOTE, K. J.; ALLEN-JR, L. H.; GALLO-MEAGHER, M.; DAVIS, J. M. Elevated temperature and carbon dioxide effects on soybean seed germination and transcript abundance. **Crop Science**, v. 43, p. 1548-1557, 2003.

THORNE, C. B.; GOMEZ, C. G.; HOUSEWRIGHT, R. D. Transamination of D-amino acids by *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 69, n. 3, p. 357-362, 1955.

TRAN, L. S.P.; NAGAI, T.; ITOH, Y. Divergent structure of the ComQXPA quorum-sensing components: molecular basis of strain-specific communication mechanism in *Bacillus subtilis*. **Molecular Microbiology**, v. 37, p. 1159-1171, 2000.

UCHIDA, I.; MAKINO, S.; SASAKAWA, C.; YOSHIKAWA, M.; SUGIMOTO, C.; TERAOKADO, N. Identification of a novel gene, *dep*, associated with depolymerization of the capsular polymer in *Bacillus anthracis*. **Molecular Microbiology**, v.9, p. 487-496, 1993.

UEDA, S. Industrial Application of *B. subtilis*. In: Maruo, B.; Yoshikawa, H. (Ed.). ***Bacillus subtilis: Molecular Biology and Industrial Application***, Tokyo: Kodansha, 1989. p. 143-161.

URUSHIBATA, Y.; TOKUYAMA, S.; TAHARA, Y. Characterization of the *Bacillus subtilis ywsC* gene, involved in gamma-polyglutamic acid production. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 2, p. 337-343, 2002.

USDA – United States Department of Agriculture. **World Agricultural Production**. Circular Series WAP 7-20 July 2020. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acessado em 06 jul. 2020.

VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LEBEAULT, J. M. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 175-178, 2000.

VERNETTI, F. J. **Soja: planta, clima, pragas, moléstias e invasoras**. Campinas: Fundação Cargill, 1983.

WANG, O.; CHEN, S.; ZHANG, J.; SUN, M.; LIU, Z.; YU, Z. 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. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3318-3323, 2008.

WANG, J.; YUAN, H.; WEI, X.; CHEN, J.; CHEN, S. Enhancement of poly- γ -glutamic acid production by alkaline pH stress treatment in *Bacillus licheniformis* WX-02. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, p. 2399-2403, 2016.

WEI, X.; JI, Z.; CHEN, S. Isolation of halotolerant *Bacillus licheniformis* WX-02 and regulatory effects of sodium chloride on yield and molecular sizes of poly- γ -glutamic acid. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, p.1332-1340, 2010.

WIJEWARDANA, C.; REDDY, K. R.; BELLALOU, N. Soybean seed physiology, quality, and chemical composition under soil moisture stress. **Food Chemistry**, v. 278, p. 92-100, 2019.

WU, Q.; XU, H.; XU, L.; OUYANG, P. K. Biosynthesis of poly(γ -glutamic acid) in *Bacillus subtilis* NX-2: regulation of stereochemical composition of poly(γ -glutamic acid). **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1650-1655, 2006.

WU, J. Y.; YE, H. F. Characterization and flocculating properties of an extracellular biopolymer produced from a *Bacillus subtilis* DYU1 isolate. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1114-1123, 2007.

WU, Q. ; XU, H.; SHI, N.; YAO, J.; LI, S.; OUYANG, P. Improvement of poly(γ -glutamic acid) biosynthesis and redistribution of metabolic flux with the presence of different additives in *Bacillus subtilis* CGMCC 0833. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, p. 527-535, 2008.

XU, K.; STRAUCH, M. A. Identification, sequence, and expression of the gene encoding gamma-glutamyltranspeptidase in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, p. 4319-4322, 1996.

XU, Z.; SHI, F.; CEN, P. Production of polyglutamic acid from mixed glucose and sucrose by co-cultivation of *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. In: The 2005 AIChE Annual Meeting, Cincinnati, 2005.

XU, H.; JIANG, M.; LI, H.; LU, D.; OUYAN, P. Efficient production of poly(γ -glutamic acid) by newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 519-523, 2005^a.

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

XU, Q.; YAJIMA, T.; LI, W.; SAITO, K.; OHSHIMA, Y.; YOSHIKAI, Y. Levan (β -2, 6-fructan), a major fraction of fermented soybean mucilage, displays immunostimulating properties via Toll-like receptor 4 signalling: induction of interleukin-12 production and suppression of T-helper type 2 response and immunoglobulin E production. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 36, p. 94-101, 2006.

XU, Z.; ZHANG, H.; CHEN, H.; SHI, F.; HUANG, J.; WANG, S.; SONG, C. Microbial production of poly- γ -glutamic acid. In: YANG, S. T.; EL-ENSHASY, H. A.; THONGCHUL, N. (Ed.). **Bioprocessing technologies in biorefinery for sustainable production of fuels, chemicals, and polymers**. New Jersey: John Wiley & Sons, 2013. p. 427-439.

XU, Z.; FENG, X.; ZHANG, D.; TANG, B.; LEI, P.; LIANG, J.; XU, H. Enhanced poly(γ -glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis* NX-2 immobilized in an aerobic plant fibrous-bed bioreactor. **Bioresource Technology**, v. 155, p. 8, 2014.

YAMANAKA, S. **New gamma-polyglutamic acid, production therefore and drinking agent containing the same**. Japanese Patent 3047087, 1991.

YAMASHIRO, D.; YOSHIOKA, M.; ASHIUCHI, M. *Bacillus subtilis* *pgsE* (Formerly *ywtC*) stimulates poly- γ -glutamate production in the presence of zinc. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 108, n. 1, p. 226-230, 2011.

YAN, S.; YAO, H.; CHEN, Z.; ZENG, S.; XI, X.; WANG, Y.; HE, N.; LI, Q. Poly- γ -glutamic acid produced from *Bacillus licheniformis* CGMCC 2876 as a potential substitute for polyacrylamide in the sugarcane industry. **Biotechnology Progress**, v. 31, p. 1287-1294, 2015.

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.

YAO, D.; JI, Z.; WANG, C.; QI, G.; ZHANG, L.; MA, X.; CHEN, S. Co-producing iturin A and poly- γ -glutamic acid from rapeseed meal under solid state fermentation by the newly isolated *Bacillus subtilis* strain 3-10. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, p. 985-991, 2012.

YAZID, N. A.; BARRENA, R.; SÁNCHEZ, A. Assessment of protease activity in hydrolysed extracts from SSF of hair waste by and indigenous consortium of microorganisms. **Waste Management**, v. 49, p. 420-426, 2016.

YOKOI, H.; ARIMA, T.; HIROSE, J.; HAYASHI, S.; TAKASAKI, Y. Flocculation properties of poly(γ -glutamic acid) produced by *Bacillus subtilis*. **Journal Fermentation of Bioengineering**, v. 82, p. 84-87, 1996.

YONG, X.; RAZA, W.; YU, G.; RAN, W.; SHEN, Q.; YANG, X. 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**, v. 102, n. 16, p. 7548-7554, 2011.

YOON, S. H.; LEE, S. Y. Comparison of transcript levels by DNA microarray and metabolic flux based on flux analysis for the production of poly- γ -glutamic acid in recombinant *Escherichia coli*. **Genome Inform**, v. 13, p. 587-588, 2002.

ZENEON, O.; PASCUET, N. S. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde/ANVISA São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2005.

ZENG, W.; CHEN, G.; ZHANG, Y.; WU, K.; LIANG, Z. Studies on the UV spectrum of poly(γ -glutamic acid) based on development of a simple quantitative method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, p. 83-90, 2012.

ZENG, W.; LI, W.; SHU, L.; YI, J.; CHEN, G.; LIANG, Z. Non-sterilized fermentative co-production of poly(γ -glutamic acid) and fibrinolytic enzyme by a thermophilic *Bacillus subtilis* GXA-28. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 697-700, 2013.

ZHAN, Y.; ZHU, C.; SHENG, B.; CAI, D.; WANG, Q.; WEN, Z.; CHEN, S. Improvement of glycerol catabolism in *Bacillus licheniformis* for production of poly- γ -glutamic acid. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, p. 7155-7164, 2017.

ZHANG, H. L.; ZHU, J. Z.; ZHU, X. C.; CAI, J.; ZHANG, A. Y.; HONG, Y. Z.; HUANG, J.; HUANG, L.; XU, Z. N. High-level exogenous glutamic acid independent production of poly-(γ -glutamic acid) with organic acid addition in a new isolated *Bacillus subtilis* C10. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 241-246, 2012.

ZHANG, C.; WU, D.; QIU, X. Stimulatory effects of amino acids on γ -polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis*. **Scientific Reports**, v. 8, p. 17934, 2018.

ZHANG, C.; WU, D.; REN, H. Economical production of agricultural γ -polyglutamic acid using industrial wastes by *Bacillus subtilis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 146, p. 117-123, 2019.

ZHAO, C.; ZHANG, Y.; WEI, X.; HU, Z.; ZHU, F.; XU, L.; LUO, M.; LIU, H. Production of ultra-high molecular weight poly- γ -glutamic acid with *Bacillus licheniformis* P-104 and characterization of its flocculation properties. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 562-572, 2013.

ZHU, R.; GAO, X.; XIAO, Y.; YANG, N.; JIN, Y. Improved performance in γ -polyglutamic acid production by *Bacillus subtilis* LX on industrial scale by impeller retrofitting and its unstructured microbial growth kinetics model. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, n. 3, p. 307-314, 2019.

APÊNDICE 1

Postos pluviométricos utilizados no levantamento dos dados de precipitação total.

Município	Posto Pluviométrico
Altair (SP)	B6-025
	B6-057
Miguelópolis (SP)	B5-040
	B5-052
	B4-034
Matão (SP)	C5-074
Nova Europa (SP)	C5-048
Araraquara (SP)	C5-012
	C5-017
	C5-050
	C5-124
	C5-125

Estações utilizadas no levantamento dos dados de temperatura média compensada.

Município	Estação
Altair (SP)	83623
	83676
Miguelópolis (SP)	83630
Matão (SP)	
Nova Europa (SP)	83726
Araraquara (SP)	

ANEXO 1

Exemplo de algumas características diferenciais entre espécies do gênero *Bacillus*.

	<i>B. subtilis</i>	<i>B. licheniformis</i>
Crescimento anaeróbio	-	+
Crescimento em:		
50 °C	v	+
65 °C	-	-
Reação da gema do ovo	-	-
Hidrólise da caseína	+	+
Hidrólise de amido	+	+
Arginina diidrolase	-	+
Produção de indol	-	-
Hidrólise da gelatina	+	+
Redução de nitrato	+	+
Gás de carboidratos	-	-
Formação de ácido por:		
D-arabinose	-	-
Glicerol	+	+
Glicogênio	+	+
Inulina	(+)	v
Mantiol	+	+
Salicina	+	+
D-trealose	+	+
Glicose	+	nd
Degradação da tirosina	-	+

Fonte: Rabinovitch e Oliveira (2015), modificado.

Símbolos. +: ≥85% positivo; (+): 75% ou 84% positivo; v, variável (26% a 74% positivo); -: 0 a 15% positivo. Arginina diidrolase, produção de indol, hidrólise da gelatina, redução do nitrato, são reações determinadas com o emprego de tiras do API20 E (bioMérieux). Reações de carboidratos são determinadas com o emprego de API 50(bioMérieux).