

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO, EFEITO DA TEMPERATURA E DO pH INICIAL NA PRODUÇÃO DO ÁCIDO γ -POLIGLUTÂMICO PELOS MICRO-ORGANISMOS *Bacillus subtilis* NRRL B - 41094 e *Bacillus subtilis* NRRL B - 41294

L. P. MORAES¹ e R. M. ALEGRE¹

¹ Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Engenharia de Alimentos
E-mail para contato: luanapdmoraes@yahoo.com.br

RESUMO – O ácido γ -poliglutâmico é um biopolímero constituído de D-, L- ácido glutâmico. É hidrossolúvel, biodegradável, atóxico, com diversas aplicações. Neste trabalho foi avaliada a produção de γ -PGA por *Bacillus subtilis* NRRL B-41294 e *Bacillus subtilis* NRRL B-41094 sem ácido glutâmico no meio de cultivo. A concentração de glicerol de biodiesel (40 g/L, 60 g/L, 80 g/L), ácido cítrico (10 g/L, 15 g/L, 20 g/L), temperaturas (27 °C, 32 °C, 37 °C) e pH inicial (5,5, 6,5 e 7,5) foram avaliadas por planejamento fracionado 2⁴⁻¹. As variáveis dependentes foram γ -PGA (g/L), pH_{final} e biomassa (g/L). Os ensaios apresentaram produção de γ -PGA, mas somente o *Bacillus subtilis* NRRL B-41094 atingiu 1 g/L de γ -PGA. Os valores de pH_{final} para o *Bacillus subtilis* NRRL B-41294 extrapolaram a faixa ideal para crescimento. Ambos micro-organismos não apresentaram correlação entre produção de γ -PGA e biomassa, contudo o estudo revelou que o *Bacillus subtilis* NRRL B-41094 é um bom produtor de γ -PGA.

1. INTRODUÇÃO

O ácido gama-poliglutâmico (γ -PGA) é um biopolímero composto das formas D- e L- do ácido glutâmico unidas pela ligação amida entre os grupos α -amino e γ -carboxílico (Zhang *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2006 a, b; Ashiuchi e Misono, 2002; Shih e Van, 2001; Kunioka, 1997; Chibnall *et al.*, 1958).

Foi descoberto por Ivánovics e colaboradores em 1937 como cápsula de *Bacillus anthracis* (Goto e Kunioka, 1992). Após Bovarnick (1942) mostrar que γ -PGA é acumulado em meio de cultura de *Bacillus subtilis* como produto de sua fermentação, muitas pesquisas foram realizadas (Kunioka, 1997). γ -PGA foi identificado como produto da fermentação de outros micro-organismos, como *Bacillus subtilis* ZJU-7 (Huang *et al.*, 2011), *Bacillus subtilis* IFO 3335 (Goto e Kunioka, 1992), *Bacillus subtilis* 3-10 (Yao *et al.*, 2012), *Bacillus licheniformes*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* (Yong *et al.*, 2011; Kambourova *et al.*, 2001; Thorne e Leonard, 1958; Bovarnick, 1942).

γ -PGA é excretado no meio de cultura (Do *et al.*, 2001; Kunioka e Goto, 1994) e também

através da parede celular, formando cápsula durante o crescimento (Do *et al.*, 2001). A biossíntese utilizando bactéria envolve a síntese do L- e D- ácido glutâmico e posteriormente a união destes para formar o γ -PGA (Bajaj e Singhal, 2011; Bajaj e Singhal, 2009).

γ -PGA é um biopolímero aniônico, biodegradável, solúvel em água (Moraes *et al.*, 2013; Yong *et al.*, 2011; Bajaj e Singhal, 2011; Shi *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2006 a, b; Richard e Margaritis, 2003; Goto e Kunioka, 1992). É atóxico para o homem e ambiente (Yong *et al.*, 2011; Bajaj e Singhal, 2011; Richard e Margaritis, 2003; Yoon *et al.*, 2000; Shih e Van, 2001), podendo ser utilizado como espessante, umectante, em indústrias de alimentos, cosmético, medicina (Chung *et al.*, 2013; Pereira *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2011; Hoppensack *et al.*, 2003; Kunioka, 1997; Goto e Kunioka, 1992), farmacêutica (Shi *et al.*, 2007), tratamento de efluentes como agente floculante (Bhunja *et al.*, 2012). O γ -PGA e seus derivados podem ser aplicados como substitutos de hidrogéis e polímeros termoplásticos. Este fato ocorre por causa de sua alta solubilidade em água e biodegradabilidade (Choi e Kunioka, 1995).

Os micro-organismos envolvidos no processo fermentativo para produção do γ -PGA exigem diferentes composições de meio de cultura (Kunioka, 1997; Goto e Kunioka, 1992). Alguns micro-organismos requerem diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Algumas bactérias exigem a presença do ácido glutâmico para o crescimento (Kunioka, 1997). Há ainda as que exigem a presença de biotina para a produção do γ -PGA e algumas vitaminas (Goto e Kunioka, 1992). Kunioka e Goto (1994) observaram que aparentemente o ácido glutâmico não era assimilado quando adicionado no meio e sugeriram que as unidades de ácido glutâmico utilizadas para a produção do γ -PGA eram provenientes do ácido cítrico e do sulfato de amônio.

Este trabalho relata o efeito da composição do meio, pH inicial e temperatura no processo fermentativo para produção do γ -PGA sem ácido glutâmico utilizando *Bacillus subtilis* NRRL B – 41094 e *Bacillus subtilis* NRRL B - 41294.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Micro-organismo

O micro-organismo utilizado neste trabalho para a síntese de γ -PGA foi *Bacillus subtilis* NRRL B – 41094 e *Bacillus subtilis* NRRL B - 41294, fornecido pela Agricultural Research Service Culture Collection (também conhecidos como NRRL).

2.2. Meio de Manutenção

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

Depois de inoculado e cultivado a 30 °C por 48 h o micro-organismo foi mantido a 4 °C.

2.3. Preparo do Inóculo

Um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio BHI estéril foi inoculado com alça a partir de cultura em meio semissólido. Após incubação a 30 °C por 12 h e agitação a 200 rpm em “shaker” (TECNAL, mod. TE 421), o conteúdo deste frasco foi utilizado como inóculo, ou seja, 5 mL do meio fermentado foram utilizados para inocular os frascos Erlenmeyers de 250 mL contendo 45 mL de meio de cultura (Tabela 1) e com pH inicial 6,5. Os frascos Erlenmeyers foram incubados em “shaker” com agitação de 200 rpm, 72 h e temperatura de 27 °C.

2.4. Inoculação e Fermentação

Para a realização do processo fermentativo foi utilizado o método batelada.

Utilizou-se como o meio reportado por Bajaj *et al.* (2008) com algumas modificações (Tabela 1).

Tabela 1 – Meio proposto por Bajaj *et al.* (2008) com algumas modificações

Composição	Quantidade (g/L)
Glicerol	Variada
Ácido cítrico	Variada
L-ácido glutâmico	Ausente
Sulfato de amônio	8
K ₂ HPO ₄	1
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,2
MnSO ₄ .7H ₂ O	0,05
pH inicial = variado.	

O pH inicial do meio foi ajustado usando NaOH 6N e/ou HCl 2N. Os meios foram esterilizados em autoclave por 15 min a 121 °C.

A fermentação ocorreu em frascos Erlenmeyers com capacidade para 250 mL contendo 45 mL do meio de cultura com composição descrita conforme Tabela 1, previamente esterilizados a 121 °C por 15 min. Os frascos foram inoculados com 10% de inóculo conforme o item preparo do inóculo e incubados por 72 h, agitação de 200 rpm e temperatura descrita posteriormente.

Todas as fermentações foram realizadas em duplicata. As amostras foram retiradas ao final das 72 h de fermentação para análise de quantificação de γ -PGA.

2.5. Planejamento Experimental

Utilizou-se delineamento fatorial fracionado 2^{4-1} e 4 pontos centrais, totalizando 12 ensaios conforme a Tabela 2 e 4 de resultados e discussão. Os resultados foram analisados utilizando-se como ferramenta o software Statistica 5.0.

2.6. Análise dos Resultados

Centrifugação do caldo de cultura: Após 72 h de fermentação, centrifugou-se o caldo de cultura por 20 min a 2300 g para a separação das células, utilizando centrífuga Excelsa Baby II (FANEM, mod. 206-R).

Determinação da massa celular seca (biomassa): amostra de 10 ml dos meios fermentados foram centrifugadas a 2300 g por 20 min em centrífuga (Centribio, mod. 80-2B). A massa de células decantada foi lavada com água destilada e novamente centrifugada por 2 vezes. A secagem foi realizada em estufa à vácuo (Suprilab, mod. MOD. EST-920) a 60 °C até peso constante. A massa celular foi determinada por gravimetria.

Determinação do γ -PGA: Coletou-se uma alíquota do sobrenadante proveniente da centrifugação do caldo de cultura após 72 h de fermentação para a determinação do γ -PGA, seguindo a metodologia descrita por Silva (2010).

Determinação do pH final: O pH final foi determinado em potenciômetro (DIGIMED, mod. DM20).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Planejamento Experimental 2^{4-1} Realizado para o Micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41094

Pela Tabela 2 pode-se observar os valores obtidos para concentração de γ -PGA, biomassa e pH_{final} nos diferentes ensaios realizados com o micro-organismo.

Tabela 2. Concentração do γ -PGA, biomassa e pH final obtidos após 72 h de fermentação com o *Bacillus subtilis* NRRL B-41094, agitação de 200 rpm

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

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

O micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41094 apresentou concentrações de γ -PGA próximas ou superiores a 1 g/L em diferentes ensaios. Foram analisados os efeitos das variáveis para as respostas desejadas (Tabela 3). A única variável que interferiu na produção do γ -PGA foi a temperatura ($p < 0,05$). As demais variáveis não foram estatisticamente significativas ao nível de 10% de significância o que pode ser visualizado através do gráfico de Pareto (Figuras 1, 2, 3). Também foi realizado teste de Pareto para as variáveis dependentes biomassa e pH_{final}, no entanto nenhuma das variáveis estudadas foi estatisticamente significativa ao nível de 10% de significância.

Tabela 3. Estimativa dos efeitos para a concentração do γ -PGA

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

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

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

Como a concentração de γ -PGA atingiu a 1 g/L e esta resposta foi considerada a mais relevante, este micro-organismo poderá ser estudado em trabalhos futuros.

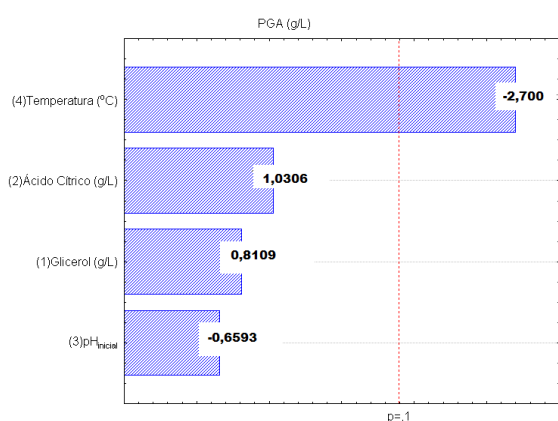


Figura 1. Diagrama de Pareto para a produção do γ -PGA, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41094.

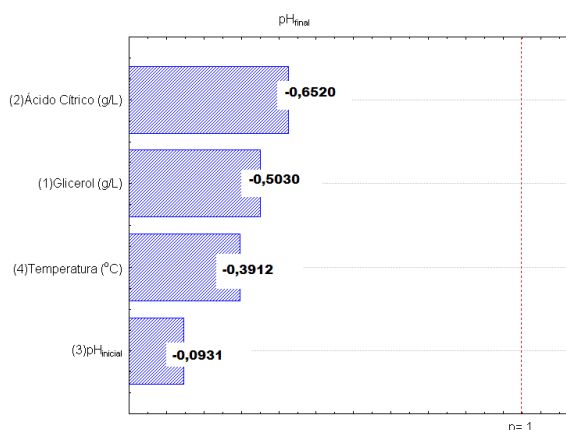


Figura 2. Diagrama de Pareto avaliando o pH_{final} , ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41094.

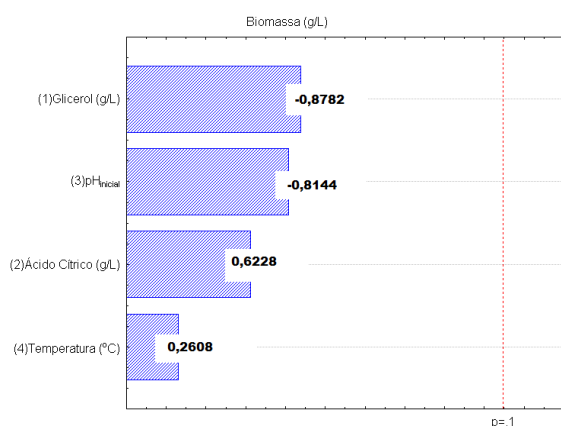


Figura 3. Diagrama de Pareto para a produção de biomassa, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41094.

3.2. Planejamento Experimental 2⁴⁻¹ Realizado para o Micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41294

Na Tabela 4 podemos observar os valores obtidos para concentração de γ -PGA, biomassa e pH_{final} nos diferentes ensaios realizados utilizando o *Bacillus subtilis* NRRL B-41294.

Tabela 4. Concentração do γ -PGA, biomassa e pH_{final} obtidos após 72 h de fermentação com o *Bacillus subtilis* NRRL B-41294, agitação de 200 rpm

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

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

Pela Tabela 4, observa-se que as concentrações de γ -PGA obtidas após 72 h de fermentação nas condições determinadas pelo planejamento experimental não atingiram a 1 g/L. Além disto, os valores do pH_{final} extrapolaram a faixa de pH ideal para crescimento, que é entre pH 6 e pH 8, fator que pode ter contribuído para diminuição da produção do γ -PGA.

Observa-se pelas Figuras 4, 5, e 6 que somente a biomassa não foi afetada por nenhuma variável ao nível de 10% de significância. Já a produção do γ -PGA e pH_{final} foram afetados positivamente pela variável temperatura. Um incremento no valor da temperatura (nível +1 para +1) conduziu a um acréscimo na concentração do γ -PGA e a um acréscimo no valor do pH_{final} .

Ao comparar com o micro-organismos *Bacillus subtilis* NRRL B-41094, para o *Bacillus subtilis* NRRL B-41294 a temperatura interferiu de forma diferente, afetando positivamente a produção do γ -PGA. Apesar do aumento da temperatura aumentar a concentração do γ -PGA, este aumento foi pequeno, podendo ter sido ocasionado por um stress térmico, sendo que a diminuição da temperatura para o *Bacillus subtilis* NRRL B-41094 provocou um aumento na produção do γ -PGA chegando a um valor considerável, 1 g/L.

Para a produção de Biomassa, nenhuma variável estudada teve efeito significativo ($p < 0,1$).

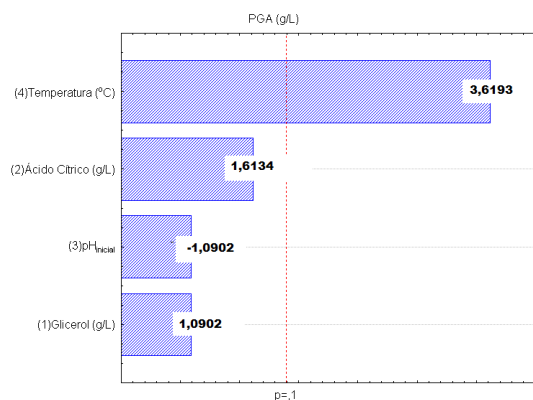


Figura 4. Diagrama de Pareto para a produção do γ -PGA, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41294.

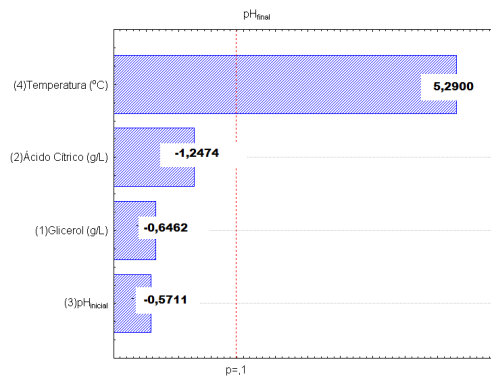


Figura 5. Diagrama de Pareto avaliando o pH_{final}, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41294.

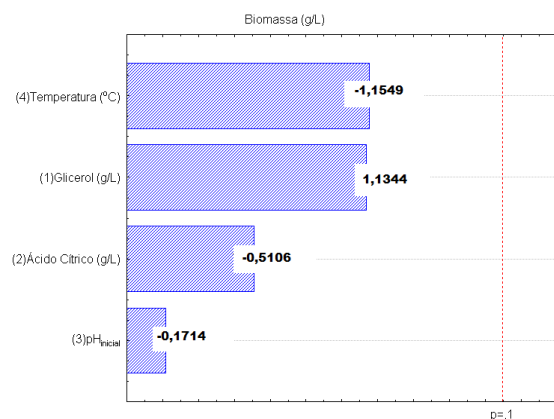


Figura 6. Diagrama de Pareto para a produção de biomassa, ao nível de 10% de significância, em meio fermentado, contendo glicerol como substrato, com o micro-organismo *Bacillus subtilis* NRRL B-41294.

4. CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que é possível produzir γ -PGA utilizando subprodutos industriais, glicerol, como fonte de carbono pelo micro-organismos *Bacillus subtilis* NRRL-41094 sem a necessidade da utilização do ácido glutâmico no meio fermentativo.

Com os resultados obtidos e levando em consideração a produção do γ -PGA observa-se que o *Bacillus subtilis* NRRL B-41094 deverá ser estudado posteriormente. Um estudo mais aprofundado das variáveis utilizadas no processo poderá levar a um incremento da produção do γ -PGA.

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

5. REFERÊNCIAS

ASHIUCHI, M.; MISONO, H. Biochemistry and molecular genetics of poly- γ -glutamate synthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, v. 59, p. 9-14, 2002.

BAJAJ, I. B.; LELE, S. S.; SINGHAL, R. S. Enhanced production of poly(γ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM2324 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 (γ -glutamic acid) from *Bacillus licheniformis* NCIM 2324 by using metabolic precursors. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, v. 159, p. 133-141, 2009.

BAJAJ, I.; SINGHAL, R. An emerging biopolymer of commercial interest. *Bioresource Technology*, v. 102, p. 5551-5561, 2011.

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

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

CHIBNALL, A. C.; RESS, M. W., RICHARDS, F. M. Structure of the polyglutamic acid from *Bacillus subtilis*. *Bioch.*, v. 68, p. 129-135, 1958.

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

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

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

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

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

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

JIANG, F.; QI, G.; JI, Z.; ZHANG, S.; LIU, J.; MA, X. CHEN, S. Expression of *glr* gene encoding glutamate racemase in *Bacillus licheniformis* WX-02 and its regulatory effects on synthesis of poly- γ -glutamic acid. *Biotechnol Lett*, v. 33, p. 1837-1840, 2011.

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

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

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

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 (I.R.E.C.H.E)*, v. 4, p. 618-623, 2012.

MORAES, L. P.; ALEGRE, R. M.; BRITO, P. N. The existing studies on biosynthesis of poly(γ -glutamic acid by fermentation). *Food and Public Health*, v.3, p. 28-36, 2013.

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

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

SHI, F.; XU, Z.; CEN, P. Microbial production of natural poly amino acid. *Sci China Ser B-Chem*, v. 50, p. 291-303, 2007.

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

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

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

SILVA, S. B. Produção e otimização de processo de obtenção de ácido γ -poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Departamento de Engenharia Química, 2010.

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

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

YOON, S. H.; DO, J. H.; LEE, S. Y.; CHANG, H. N. Production of poly- γ -glutamic acid by fed-batch culture of *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*, v. 22, p. 585-588, 2000.

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