

# PRODUÇÃO DE ÁCIDO $\gamma$ -POLIGLUTÂMICO POR *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 UTILIZANDO GLICEROL DO BIODIESEL COMO FONTE DE CARBONO SEM A UTILIZAÇÃO DE ÁCIDO GLUTÂMICO COMO SUBSTRATO

L. P. MORAES<sup>1</sup> e R. M. ALEGRE<sup>1</sup>

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

**RESUMO** – O ácido  $\gamma$ -poliglutâmico,  $\gamma$ -PGA, é um biopolímero biodegrável, hidrossolúvel, aniônico e atóxico, composto por unidades de D- e L- ácido glutâmico e possui aplicações nas áreas médica, química e de alimentos. Este trabalho teve como objetivo estudar a produção de  $\gamma$ -PGA por fermentação utilizando glicerol subproduto de biodiesel como fonte de carbono. O micro-organismo utilizado foi o *Bacillus velezensis* NRRL B-23189 e a produção de  $\gamma$ -PGA ocorreu sem adição de ácido glutâmico ao meio de cultura. Foram estudadas diferentes concentrações de glicerol, ácido cítrico e sulfato de amônio. A avaliação das condições de cultivo foi feita com agitação de 200 rpm, temperatura de 27 °C, pH inicial de 6,5 (ajustado com NaOH 2N/HCl 2N) durante 72 h mediante delineamento composto central rotacional (DCCR). Para a avaliação da produção de  $\gamma$ -PGA foi utilizada uma metodologia de quantificação via espectrofotometria a 400 nm. A máxima produção de  $\gamma$ -PGA em meio contendo 100 g/L de glicerol foi de 4,17 g/L.

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido gama-poliglutâmico ( $\gamma$ -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 composto das formas D- e L- do ácido glutâmico unidas pela ligação amida entre os grupos  $\alpha$ -amino e  $\gamma$ -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). Posteriormente 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). Após Bovarnick (1942) mostrar que  $\gamma$ -PGA é acumulado em meio de cultura de *Bacillus subtilis* como produto de sua fermentação, muitos pesquisas foram realizadas

(Kunioka, 1997).

$\gamma$ -PGA é excretado através da parede celular, formando cápsula durante o crescimento (Do *et al.*, 2001), e também no meio de cultura (Do *et al.*, 2001; Kunioka e Goto, 1994). A biossíntese utilizando bactéria acontece em duas etapas. Primeiro a síntese do L- e D- ácido glutâmico e depois a união destes para formar o  $\gamma$ -PGA (Bajaj e Singhal, 2011; Bajaj e Singhal, 2009).

$\gamma$ -PGA 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 (Bhunia *et al.*, 2012). O  $\gamma$ -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).

O processo fermentativo para produção do  $\gamma$ -PGA utilizando bactérias exige diferentes requerimentos nutricionais (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  $\gamma$ -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  $\gamma$ -PGA eram provenientes do ácido cítrico e do sulfato de amônio.

Este trabalho relata o efeito do uso de glicerol, ácido cítrico e sulfato de amônio em diferentes concentrações em meio fermentativo sem ácido glutâmico utilizando *Bacillus velezensis* NRRL B – 23189 para a produção do  $\gamma$ -PGA.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Micro-organismo**

O micro-organismo utilizado neste trabalho para a síntese de  $\gamma$ -PGA foi *Bacillus velezensis* NRRL B - 23189, 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	Variada
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,2
MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05
pH inicial = 6,5.	

O pH inicial do meio foi ajustado para 6,5 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 de 27 °C.

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

## 2.5. Planejamento Experimental

Usou-se planejamento fatorial  $2^3$  com seis pontos axiais e quatro pontos centrais, totalizando 18 ensaios conforme a Tabela 2, de resultados e discussão, que apresenta os valores reais e codificados das variáveis: glicerol ( $x_1$ ), ácido cítrico ( $x_2$ ) e sulfato de amônio ( $x_3$ ) para os 18 tratamentos. Os resultados foram analisados pela metodologia de superfície de resposta, utilizando-se como ferramenta o software Statistica 5.0. O polinômio empregado para ajuste do modelo foi o descrito pela Equação 1:

$$Y = b_o + \sum_{i=1}^4 b_i x_i + \sum_{i=1}^4 b_{ii} x_i^2 + \sum_{i \neq j=1}^4 b_{ij} x_i x_j \quad (1)$$

Em que:  $b_o$  = constante,  $b_i$  = coeficiente linear,  $b_{ii}$  = coeficiente quadrático,  $b_{ij}$  = coeficiente da interação,  $x_i$  e  $x_j$  = níveis das variáveis independentes e  $Y$  = variável dependente.

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

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o estudo do efeito da concentração de glicerol, ácido cítrico e sulfato de amônio no processo fermentativo utilizando *Bacillus velezensis* NRRL B – 23189 para a produção de  $\gamma$ -PGA realizou-se um DCCR  $2^3$ . As condições para o processo fermentativo foram temperatura de 27 °C, pH inicial 6,5 e agitação de 200 rpm em “shaker”.

A Tabela 2 apresenta os resultados da produção do  $\gamma$ -PGA. Segundo Richard e Margaritis (2003) e Kunioka e Goto (1994), a adição de glicerol ou outra fonte de carbono no meio fermentativo contribuem para biossíntese do  $\gamma$ -PGA. A Tabela 2 mostra que a adição de glicerol como fonte de carbono e do sulfato de amônio não indicam aumento na biossíntese do  $\gamma$ -PGA. A partir da concentração de 100 g/L para o glicerol e 8 g/L para o sulfato de amônio ocorreu decréscimo no processo produtivo do  $\gamma$ -PGA.

Tabela 2 – Produção do  $\gamma$ -PGA para os tratamentos analisados

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

A máxima produção de  $\gamma$ -PGA foi atingida nos ensaios 15, 16, 17 e 18 que representam o ponto central, onde todas as variáveis encontram-se no nível 0, que representa 100 g/L de glicerol, 20 g/L de ácido cítrico e 8 g/L do sulfato de amônio. Pode-se também observar pela Tabela 2, que o ensaio 2 apresentou valores similares para a produção de  $\gamma$ -PGA. Por outro lado, a mínima biossíntese do  $\gamma$ -PGA foi obtida em níveis com baixa concentração de glicerol ou em níveis com alta concentração de glicerol. Resultados semelhantes foram obtidos por Moraes e colaboradores (2012) utilizando melão como fonte de carbono.

Pelo cálculo da análise da variância (ANOVA) observa-se que o F calculado (3,336) é maior que o F tabelado (2,56), ao nível de 90% de confiança, indicando a validade do modelo proposto para produção de  $\gamma$ -PGA (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão ajustado da produção de  $\gamma$ -PGA

FV	SQ	GL	QM	F calculado	F tabelado (0,05; 9; 8)
Regressão	4,590	9	0,510	3,336	2,56
Resíduo	1,223	8	0,153		
Falta de Ajuste	1,198	5	0,240	28,430	F tabelado (0,05; 5; 3)
Erro Puro	0,0253	3	0,008		5,31
Total	5,814	17	Nível de confiança = 90 %; R <sup>2</sup> = 0,7562		

A equação ajustada pelo modelo de regressão (Tabela 4) para a produção do  $\gamma$ -PGA apresentou coeficiente de determinação de 0,7562, ou seja, 75,62% dos pontos obtidos experimentalmente são explicados pelo modelo (Equação 2).

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

Tabela 4 – Coeficientes estimados pelo modelo de regressão ajustados da produção do  $\gamma$ -PGA

Variáveis Independentes	Coeficientes	de p-valor
	Regressão	
Interceptação	4,184	0,000000
Glicerol (L) *	0,058	0,599007
Glicerol (Q)	-0,250	0,052545
Ácido Cítrico (L)	0,159	0,171592
Ácido Cítrico (Q)	-0,217	0,083677
Sulfato de Amônio (L) *	-0,013	0,906639
Sulfato de Amônio (Q) *	-0,349	0,013167
Glicerol X Ácido Cítrico*	-0,258	0,099532
Glicerol X Sulfato de Amônio*	-0,178	0,233302
Ácido Cítrico X Sulfato de Amônio*	0,247	0,111810

O efeito do componente que mais influenciou a produção do  $\gamma$ -PGA foi o ácido cítrico ( $p < 0,1$ ). Em geral, todos os efeitos influenciaram pouco na produção do  $\gamma$ -PGA.

As Figuras 1, 2 e 3 mostram as superfícies de resposta para a resposta produção do  $\gamma$ -PGA. Na construção das superfícies as variáveis não explicitadas estão fixadas no ponto central (nível 0).

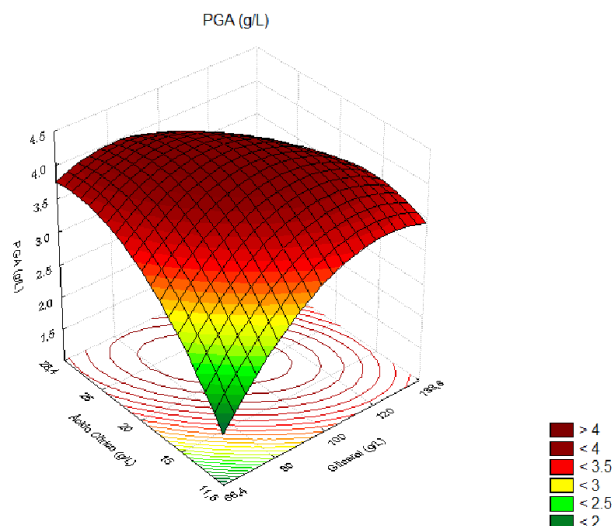


Figura 1 – Superfície de resposta gerada pela resposta concentração de  $\gamma$ -PGA, em função da concentração de sulfato de amônio no ponto central, em meio fermentado contendo glicerol como substrato, produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

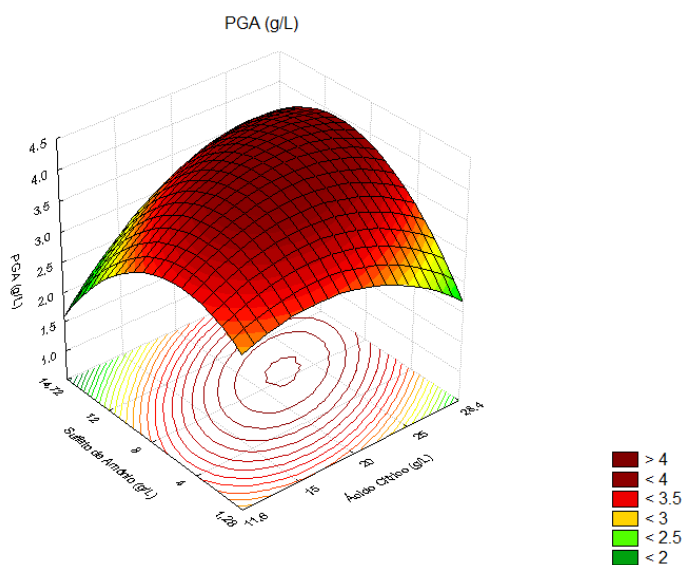


Figura 2 – Superfície de resposta para a resposta  $\gamma$ -PGA, em função da concentração de glicerol no ponto central, em meio fermentado contendo glicerol como substrato, produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

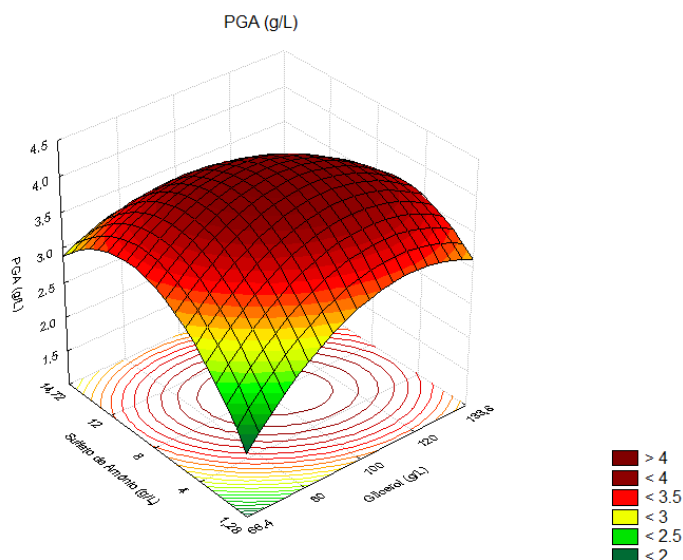


Figura 3 – Superfície de resposta para a resposta  $\gamma$ -PGA, em função da concentração de ácido cítrico no ponto central, em meio fermentado contendo glicerol como substrato, produzido por *Bacillus velezensis* NRRL B-23189, 72 h, agitação de 200 rpm.

Observando os gráficos pode-se afirmar que a maior produção de  $\gamma$ -PGA ocorreu próximo ao ponto central com 100 g/L de glicerol, 8 g/L do sulfato de amônio e entre 20 e 25 g/L do ácido cítrico.

Para obtenção da melhor resposta fez-se nova fermentação em duplicata, nas mesmas condições, dos ensaios 2 e 15 que proporcionaram melhores resultados com relação à produção do  $\gamma$ -PGA e aplicou-se o teste de Tukey a 5% de probabilidade para observar se existia diferença entre as médias. Os resultados de quantificação do  $\gamma$ -PGA estão descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Produção do  $\gamma$ -PGA utilizando *Bacillus velezensis* NRRL B - 23189, temperatura de 27 °C, após 72 h, pH inicial de 6,5 e agitação de 200 rpm

Ensaios	$\gamma$ -PGA (g.L <sup>-1</sup> )
3	4,152 $\pm$ 0,0376 <sup>a</sup>
15	4,205 $\pm$ 0,0376 <sup>a</sup>

As médias seguidas por uma mesma letra não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

## 4. CONCLUSÃO

Neste trabalho mostrou-se que ocorre produção do  $\gamma$ -PGA sem a necessidade de adição do ácido glutâmico no meio fermentativo e que a adição da fonte de carbono e nitrogênio não



aumenta a produção de  $\gamma$ -PGA. A máxima produção do  $\gamma$ -PGA foi de aproximadamente 4 g/L e ocorreu em 2 diferentes formulações de meio de cultura, sendo uma delas 100 g/L de glicerol, 8 g/L do sulfato de amônio e 20 g/L de ácido cítrico produzindo 4,17 g/L do  $\gamma$ -PGA.

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

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

## 6. REFERÊNCIAS

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

BAJAJ, I. B.; LELE, S. S.; SINGHAL, R. S. Enhanced production of poly( $\gamma$ -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 ( $\gamma$ -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 ( $\gamma$ )-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  $\gamma$ -irradiation from microbial poly( $\gamma$ -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 ( $\gamma$ -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  $\gamma$ -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( $\gamma$ -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( $\gamma$ -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- $\gamma$ -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( $\gamma$ -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( $\gamma$ -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( $\gamma$ -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- $\gamma$ -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- $\gamma$ -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  $\gamma$ -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-( $\gamma$ -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  $\gamma$ -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- $\gamma$ -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- $\gamma$ -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( $\gamma$ -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.