

XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

CARACTERIZAÇÃO E PRODUÇÃO DE ÁCIDO γ -POLIGLUTÂMICO EM DIFERENTES CULTIVARES DE SOJA

Valquíria Campos⁽¹⁾; Thales Augusto de Miranda Medeiros⁽²⁾; Suzan da Silva Lessa⁽³⁾; Isaac Jamil Sayeg⁽⁴⁾; Nilton Pereira Alves⁽⁵⁾

⁽¹⁾Docente; Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba; UNESP; Av. Três de Março 511, Sorocaba, São Paulo; vcampos@sorocaba.unesp.br; ⁽²⁾Pesquisador; Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba; UNESP; Av. Três de Março 511, Sorocaba, São Paulo; thales_aug@hotmail.com; ⁽³⁾Pesquisadora; Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba; UNESP; Av. Três de Março 511, Sorocaba, São Paulo; sudolab@sorocaba.unesp.br; ⁽⁴⁾Pesquisador; Instituto de Geociências; USP; Rua do Lago 562; São Paulo; ⁽⁵⁾ Pesquisador; Quimlab Produtos de Química Fina; Rod. Geraldo Scavone, 2300, Jacareí, São Paulo.

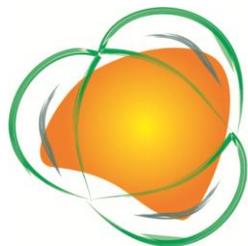
2. Saúde, Segurança e Meio Ambiente

Resumo - O ácido γ -poliglutâmico é um biopolímero aniônico, solúvel em água, biodegradável, biocompatível, comestível e atóxico para humano e ambiente. Em função dessas características especiais, sua aplicação tem sido direcionada para o setor ambiental. O ácido γ -poliglutâmico está presente, naturalmente, na mucilagem de produtos fermentados de soja, consumidos nos países asiáticos, sendo a soja e seus derivados, portanto, substratos potenciais para a produção do biopolímero. O uso do ácido γ -poliglutâmico no tratamento de águas, proporciona incremento da atividade floculante, entre outras propriedades. O objetivo deste trabalho volta-se para produção de ácido γ -poliglutâmico utilizando-se de diferentes cultivares de soja, como o convencional (BRS 284), o cultivar transgênico (BRS 359RR) e o cultivar transgênico de segunda geração (BRS 1001IPRO). Para amostra BRS 284 em caldo E foi obtido biopolímero, de massa molecular média de $1,4 \times 10^6$ g.mol⁻¹ e viscosidade aparente de 42,08 mPa.s⁻¹. Espera-se que os cultivares de soja possuam diferenças na composição centesimal, o que irá influenciar na produção de γ -PGA.

Palavras-chave: Sustentabilidade. Biopolímero. Coagulante.

Abstract - γ -polyglutamic acid (γ -PGA) is a water soluble biodegradable anionic biopolymer that is edible and non-toxic to humans and the environment. Due to these special characteristics, it has been applied in the environmental sector γ -PGA is naturally present in the mucilage of fermented soy products consumed in Asian countries; therefore, soy and its derivatives are potential substrates for the production of this biopolymer. The use of γ -PGA in water treatment increases its flocculation activity, among other properties. This work focuses on the production of γ -PGA using soybeans fermented with *Bacillus subtilis*. For sample BRS 284 were obtained polymer, average molecular weight of 1.4×10^6 g mol⁻¹ and apparent viscosity of the 42.08 mPa.s⁻¹. It is expected that the soybean cultivars have differences in chemical composition, which will influence the production of γ -PGA.

Key words: Sustainability. Biopolymer. Coagulant.



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

Introdução

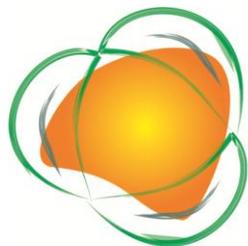
Graves problemas ambientais são decorrentes da utilização de materiais que possuem vida-longa pós-utilização e, portanto, geram resíduos não biodegradáveis. A pesquisa de novos materiais, ambientalmente seguros, torna-se de grande relevância e biopolímeros obtidos a partir de recursos renováveis, surgem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

Os coagulantes comerciais como sulfato de alumínio e policloreto de Al, apresentam considerável teor de alumínio, entretanto, como o alumínio não é biodegradável, elevadas concentrações do elemento químico podem ocasionar problemas à saúde humana (CLAYTON, 1989), além de gerar elevado volume de lodo (NDABIGENGESERE e NARASIAH, 1998). O uso do ácido γ -poliglutâmico (γ -PGA), no tratamento de água, tem sido descrito por diversos pesquisadores e, nesses estudos, o incremento da atividade floculante ocorre quando cátions multivalentes são adicionados ao sistema (MAHMOUD, 2006; SHIH e VAN, 2001; YOKOI et al., 1996). A modificação na molécula de γ -PGA também pode aumentar a atividade do polímero, como agente coagulante (KUNIOKA, 2004).

O ácido γ -poliglutâmico pode ser obtido através de cultivo microbiano, sendo *Bacillus subtilis* o microrganismo mais utilizado. *B. subtilis* é utilizado no Japão para a produção do natto, alimento de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] fermentada que possui consistência mucilaginosa, decorrente de sua composição, mistura de γ -PGA e levana (SHIH e VAN, 2001; NAGAI e TAMANG, 2010). Estima-se que o natto apresente concentração de 10 g kg^{-1} de ácido γ -poliglutâmico. A utilização da soja, como substrato para produção de γ -PGA, justifica-se pelo fato do Brasil ser um grande produtor de soja. A diferença entre os cultivares de soja dá-se na sua adaptação ao solo e clima, produtividade e resistência a doenças (SEDYAMA et al., 1999). Já a diferença na composição de grãos corresponde ao percentual de óleo, proteínas, umidade, carboidratos, fibras e cinzas (DEMBORGUSKI, 2003). Assim, tem-se como objetivo avaliar a produtividade de γ -PGA em *Bacillus subtilis*, em diferentes cultivares de soja.

Materiais e Métodos

A análise de composição centesimal de três cultivares de soja, está sendo realizada, com dois cultivares transgênicos de diferentes gerações e um cultivar convencional. Utiliza-se de cultivar convencional BRS 284, cultivar transgênico de primeira geração, tolerante ao herbicida glifosato, BRS 359RR e cultivar de segunda geração, que apresenta resistência a insetos e tolerância ao herbicida glifosato BRS



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS
21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

1001IPRO. Estes cultivares apresentam mesmas condições edafoclimáticas, uma vez que estão adaptados para cultivo na macrorregião sojícola 1, especificamente, na região edafoclimática 103. Esta região abrange os estados como Rio Grande do Sul (Serra do Nordeste e Planalto Superior), Santa Catarina (Serra Geral e Centro-Norte), Paraná (Centro-Sul) e São Paulo (Sul) (KASTER e FARIA, 2012).

O cultivo em estado sólido foi conduzido em biorreator de vidro e na abertura superior foi colocado tampão de algodão hidrófobo e gaze (Figura 1). Foram selecionados até 25 g de grãos de soja, lavados e imersos em água (3:1) a 10 °C por em pH 6,5. Os grãos foram autoclavados por uma hora a 130 °C e resfriados a 50 °C para serem inoculados. O inóculo na concentração de 6% (v/m) foi distribuído sobre a superfície do substrato e, posteriormente, submetido à temperatura de 37 °C por 72 horas com agitação de 150 rpm e umidade maior que 95%. Para interromper o processo de fermentação, a mistura foi refrigerada por oito horas, em temperatura entre três e 10 °C, com baixa umidade (KIUCHI e WATANABE, 2004).

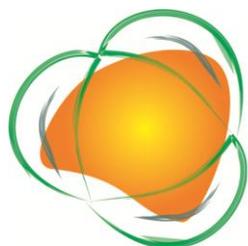


Figura 1. Fluxograma do processo de produção de ácido γ -poliglutâmico utilizando soja como substrato.

Para construção da curva padrão foi utilizado do ácido γ -poliglutâmico (92%), importado da China. O método foi adaptado de Kanno e Takamatsu (1995). Os padrões foram estabelecidos nas seguintes concentrações: 0, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções foram preparadas a partir de solução estoque 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em balão volumétrico de 250 mL e, em seguida, pipetadas para balão de 50 mL para diluição, atingindo as concentrações previstas. Em béquer, foi adicionado 1 mL de solução padrão, 4 mL de tampão fosfato pH 7 e 1 mL de solução de CTAB 0,1M/NaCl 1M, para cada padrão. Levou-se em banho com temperatura controlada de 30°C por 20 min, em seguida, determinada curva em espectrofotômetro Hach, modelo DR 2800.

Resultados e Discussão

Como representado pela estrutura química molecular (Figura 2), o ácido γ -poliglutâmico ocorre, naturalmente, na forma de homopoliamida composta por unidades



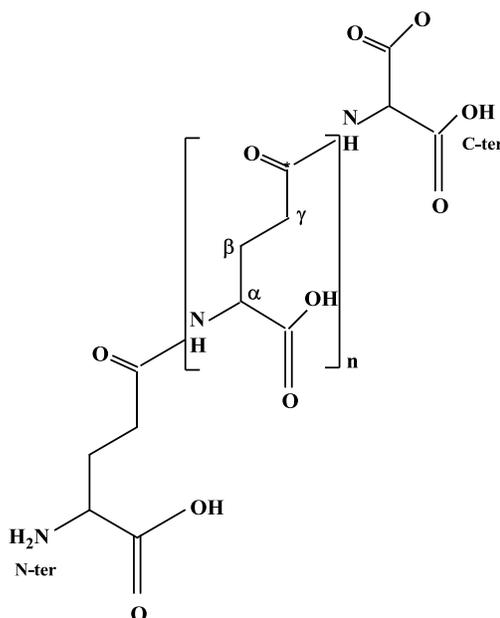
XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

de D- e L- ácido glutâmico, as unidades monoméricas estão conectadas por ligações amidas entre o grupo α -amino e grupo γ -carboxílico (GOTO e KUNIOKA, 1992; DE CESARO, 2013). Por possuir essa ligação amida entre os grupos α e γ , o ácido γ -poliglutâmico apresenta resistência às proteases, uma vez que são capazes de agir apenas sobre ligações entre grupos α , como no caso das proteínas (CANDELA e FOUET, 2006).



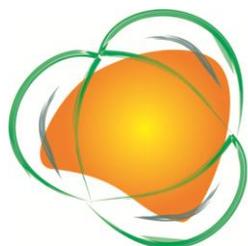
Fonte: CANDELA e FOUET (2006)

Figura 2. Estrutura química molecular do ácido γ -poliglutâmico.

O ácido γ -poliglutâmico produzido por *B. subtilis* foi extraído do meio de cultivo. O microrganismo foi cultivado em caldo E (SILVA, 2010) e mantido em duplicata até 72 horas. Na Tabela 1 tem-se os resultados de análise elementar da soja BRS 284 e apontam percentuais de CHN na composição do grão de soja e, posteriormente, 72 horas de cultivo para obtenção do ácido γ -poliglutâmico. O cultivo de microrganismos ocorreu em diferentes concentrações de soja BRS 284 (15, 20 e 25 g L⁻¹) e, em tempos de 24 e 72 horas, os valores de viscosidade aparente são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Teor de CHN da soja BRS 284 e ácido γ -poliglutâmico.

Amostra	C/%	H/%	N/%	Total
soja	47,06	7,17	7,18	66,43
γ -PGA	43,22	5,86	9,67	58,75



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

Tabela 2. Valores de viscosidade aparente ($\text{mPa}\cdot\text{s}^{-1}$) para ácido γ -poliglutâmico após 24 e 72h de cultivo.

Concentração g L^{-1}	Viscosidade/24h	Viscosidade/72h
15	11,04	14,3
20	19,13	24,10
25	32,15	42,08

Para todas as concentrações estudadas, as amostras de 72 horas de cultivo, apresentaram viscosidade maior quando comparadas às de 24 horas. Para amostra de $25 \text{ g L}^{-1}/72\text{h}$ foi obtido biopolímero de massa molecular média de $1,4 \times 10^6 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. A viscosidade das soluções foi elevada com o aumento da concentração do polímero. Este comportamento pode ser atribuído às interações intermoleculares e entrelaçamentos, devido ao acréscimo efetivo nas dimensões da macromolécula e na massa molar (GARCIA-OCHOA et al., 2000). De Cesaro (2013) constatou que a elevação da concentração de ácido γ -poliglutâmico em solução aquosa, resulta no aumento linear da viscosidade. O autor também observou que em cultivos de 48h e 96h, para o maior tempo de cultivo, resulta em maior viscosidade. Esse resultado foi atribuído ao fato de que há maior distribuição da massa molar, em torno da massa molar média, encontrada no espalhamento de luz, para o γ -PGA obtido em cultivos de 96 horas, indicando que frações de massa molares mais elevadas, causem esse efeito na viscosidade. Através de análise por microscopia eletrônica de varredura, observa-se que as partículas de soja apresentam morfologia com arestas boleadas (Figura 3).

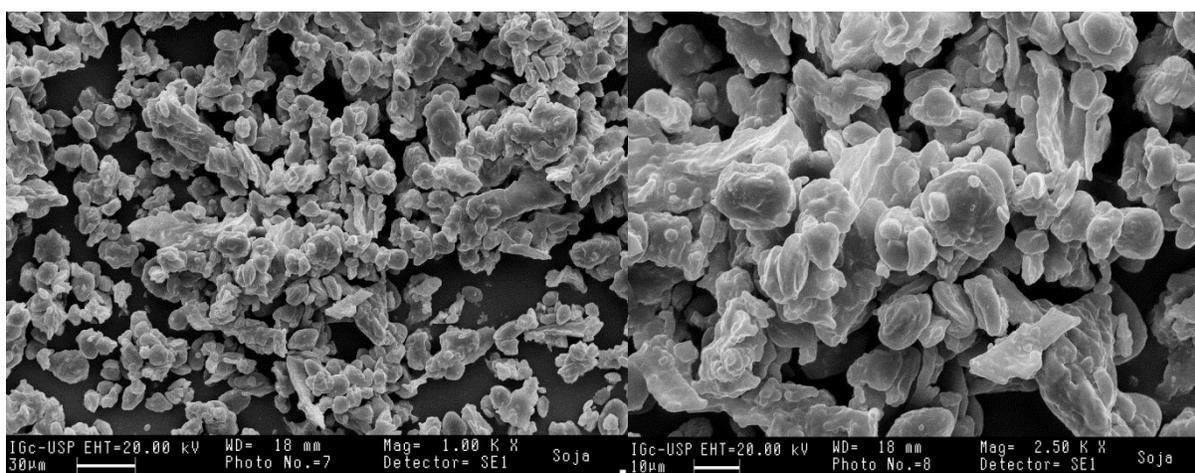
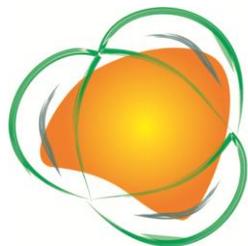


Figura 3. Eletromicrografia obtida em microscópio eletrônico de varredura, apresentando morfologia externa da soja convencional BRS 284 (1000 e 2500x).



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

Conclusões

Nos primeiros ensaios com *Bacillus subtilis* em caldo E pode-se obter a produção de ácido γ -poliglutâmico. Após a análise centesimal espera-se que haja diferença na composição química, entre os cultivares de soja (BRS 284, BRS 359RR e BRS 1001IPRO) e, também, diferença na viscosidade e massa molecular. A partir do cultivar de soja mais indicado para o cultivo em estado sólido, pretende-se estabelecer os parâmetros ideais e aumentar a eficiência na produção de ácido γ -poliglutâmico. Com os resultados obtidos verificou-se intensa polimerização em até 72 horas, em substrato de soja convencional, não transgênica. Estudo preliminar está sendo realizado, para estabelecimento de melhor meio de cultivo aos microrganismos, antes de serem relacionados aos cultivares de soja transgênica.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro através do processo nº 2015/02650-8.

Referências bibliográficas

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

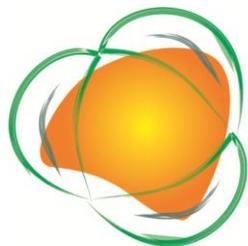
CLAYTON, B.E. Report of the lower moor incident advisory group. *American Journal of Industrial Medicine*, v. 40, n. 3, p. 301-304, 1989.

DE CESARO, A. Uso de carreadores de oxigênio na produção de ácido- γ -poliglutâmico através do cultivo de *Bacillus subtilis* BL53 e caracterização do biopolímero. 2013. 85 f. Dissertação – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2013.

DEMOGURSKI, N.M.S.S. Determinação do preço da soja para trituração e obtenção do óleo com base na qualidade do grão. 2003. 86 f. Dissertação – Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí. 2003.

GONÇALVES, L.C.; ANDRADE, A.P.C.; RIBEIRO, G.P.; SEIBEL, N.F. Chemical composition and technological properties of two soybean cultivars. *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 3, n. 1, p. 33-40, 2014.

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



XIII Congresso Nacional de **MEIO AMBIENTE** de Poços de Caldas

www.meioambientepocos.com.br

XIII CONGRESSO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE DE POÇOS DE CALDAS

21, 22 E 23 DE SETEMBRO DE 2016

KASTER, M.; FARIAS, J.R.B. Regionalização dos testes de valor de cultivo e uso e da indicação de cultivares de soja - terceira aproximação. Londrina: Embrapa Soja, 2012. p. 1-69. (Documentos, 330).

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

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

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.

NAGAI, T.; TAMANG, J. Fermented legumes: soybean and non-soybean products. In: Tamang, J. P.; Kailasapathy, K. (Eds.). Fermented foods and beverages of the world. Boca Raton: CRC Press, 2010. p. 191-224.

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.

SEDIYAMA, T.; TEIXEIRA, R.C.; REIS, M.S. Melhoramento da soja. In: Borém, A. Melhoramento de espécies cultivadas. Viçosa: UFV, 1999. p.487-533.

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, 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.

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.