


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PRODUÇÃO, ESTABILIDADE E ISOLAMENTO DE
BIOEMULSIFICANTE OBTIDO A PARTIR DA FERMENTAÇÃO DE
ÓI FO. NIFSEI COMERCIAL POR *Saccharomyces lipolytica*

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por ALVARO SILVA LIMA e aprovada pela Comissão Julgadora em 26.02.97.

Campinas, 26 de fevereiro de 1997.


Prof. Dr. RANULFO MONTE ALEGRE

Presidente da Banca

ALVARO SILVA LIMA
Engenheiro Químico

PROF. DR. RANULFO MONTE ALEGRE
Orientador

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos

Campinas-1997



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
V.	L628p
Ex.	
TOMBO BC/	30236
PROC.	281/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/05/97
N.º CPD	

CM-00098070-4

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

L628p

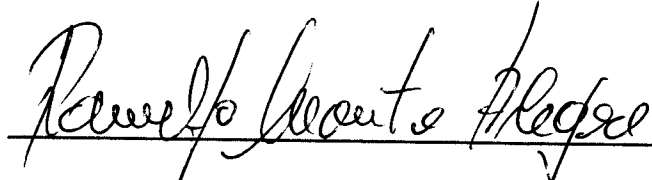
Lima, Álvaro Silva

Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* / Álvaro Silva Lima. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Ranulfo Monte Alegre
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

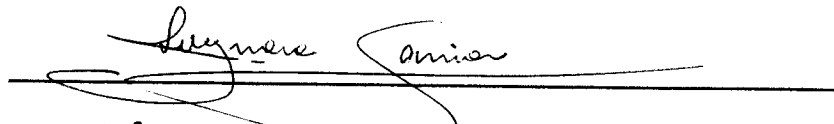
1. *Saccharomyces lipolytica*. 2. Óleo diesel.
3. Hidrocarboneto - fermentação. I. Alegre, Ranulfo Monte.
II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. RANULFO MONTE ALEGRE

Orientador



Dr^a TEREZINHA DE JESUS GARCIA SALVA

Membro



Prof. Dr. GIL EDUARDO SERRA

Membro

Prof.^a Dr.^a ADILMA REGINA PIPPA SCAMPARINI

Membro

*Dedico esta tese à minha mãe Níbia,
minha avó Celestina e minha irmã Aida*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Ranulfo Monte Alegre pela orientação, compreensão e dedicação durante a realização deste trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, irmãos e familiares pelo estímulo e carinho, mesmo a 3000 Km de distância.

Aos colegas do laboratório de Processos Fermentativos: Ana Catarina, Tânia, Marcelo, Romildo, Simone, Maria Ássima e Mauro.

Aos amigos Lia, Flávio e Gabriel pelo convívio nestes últimos anos.

A todos os funcionários, colegas da pós-graduação, amigos e àqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xvii
SUMMARY	xix
1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVOS	3
3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1- MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS	4
3.2. DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS E MECANISMO DE ATAQUE DOS MICRORGANISMOS	7
3.3. SUBSTRATOS UTILIZADOS NA FERMENTAÇÃO	12
3.4- FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO DE HIDROCARBONETOS	15
3.5- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS BIOEMULSIFICANTES	19
3.6- PROPRIEDADES DO BIOEMULSIFICANTE	23
3.7- ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE	27
3.8- APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE BIOEMULSIFICANTES E ASPECTOS ECOLÓGICOS	30
4- MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1- MICRORGANISMO	34
4.1.1- MEIO DE MANUTENÇÃO	34
4.1.2- MEIO DE CULTURA	35
4.2- SUBSTRATO	36

4.3- FERMENTAÇÃO	36
4.3.1- EFEITO DA VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA	36
4.3.2- EFEITO DA TEMPERATURA NA FERMENTAÇÃO	37
4.4- DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOEMULSIFICANTE	37
4.5- ESTABILIDADE DE OUTRAS EMULSÕES	39
4.6- ISOLAMENTO DO BIOEMULSIFICANTE	39
4.7- METODOLOGIA ANALÍTICA	40
4.7.1- DETERMINAÇÃO DO pH	40
4.7.2- DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR E DA MASSA CELULAR SECA	40
4.7.3- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE	41
4.7.3.1- ATIVIDADE EMULSIFICANTE DO CALDO DE CULTURA (AE)	41
4.7.3.2- ATIVIDADE EMULSIFICANTE DO BIOEMULSIFICANTE ADERIDO A PAREDE CELULAR (AE _{extração})	41
4.7.4- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA	42
4.7.5- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATO	42
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1- FERMENTAÇÃO	44
5.1.1- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO NA FERMENTAÇÃO	44
5.1.2- EFEITO DA PERCENTAGEM DE SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO	49
5.1.3- EFEITO DA TEMPERATURA NA FERMENTAÇÃO	52
5.1.4- EFEITO DA ADIÇÃO DE SUBSTRATO	56
5.2- ESTABILIDADE DA EMULSÃO	61
5.2.1- EFEITO DO pH E TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES	61
5.2.2- COMPARAÇÃO DA ESTABILIDADE EMULSIFICANTE DE FASE AQUOSA DE CULTURA DE <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913	69
5.2.2.1- COMPARAÇÃO COM OUTROS EMULSIFICANTES	69
5.2.2.2- COMPARAÇÃO DE DIFERENTES EMULSÕES EM ÁGUA, ESTABILIZADA POR FASE AQUOSA DE CULTURAS DE <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913	72
5.3- ISOLAMENTO	76
6-CONCLUSÕES	80
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
APÊNDICE A	89
APÊNDICE B	111
APÊNDICE C	126
APÊNDICE D	128

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1: Espécies de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos	5
TABELA 3.2: Efeito da concentração de sulfato de amônio e fosfato na produção de bioemulsificante por bactéria gram negativa PCB-106, crescendo em 3% de etanol.	17
TABELA 3.3: Classificação e estrutura dos tensoativos.	20
TABELA 3.4: Bioemulsificantes, algumas estruturas químicas e seus microrganismos de origem.	22
TABELA 3.5: Métodos utilizados para determinar a capacidade emulsificante.	24
TABELA 3.6: Estabilização de emulsões de óleo vegetal pelo liposan (a).	25
TABELA 3.7: Comparação das propriedades de emulsificação e estabilização(a).	26
TABELA 3.8: Comportamento da atividade emulsificante no processo de purificação.	29
TABELA 4.1: Composição do meio de manutenção para a <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913.	35
TABELA 5.1: Concentração de massa celular seca, pH e atividade emulsificante de bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 cultivada em meio contendo 7% (v/v) de óleo-diesel comercial e 2,5 g/l de NH ₄ Cl.	60
TABELA 5.2: Valores máximos para a estabilidade da emulsão de óleo-diesel em água, estabilizada por fase aquosa de cultura de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913.	62

TABELA 5.3: Fermentação de óleo-diesel por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 em fermentador de bancada para precipitação e diálise do bioemulsificante.	75
TABELA 5.4: Precipitado obtido de fermentação de óleo-diesel (7% v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 com e sem diálise.	79
TABELA A-1: Efeito da concentração de NH ₄ Cl na fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 após 24h.	90
TABELA A-2: Efeito da concentração de NH ₄ Cl na fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 após 48h.	90
TABELA A-3: Efeito da concentração de NH ₄ Cl na fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 após 72h.	90
TABELA A-4: Efeito da concentração de NH ₄ Cl na fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 após 96h.	91
TABELA A-5: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial fermentado por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 em 24h com 5 g/l de NH ₄ Cl.	91
TABELA A-6: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial fermentado por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 em 48h com 5 g/l de NH ₄ Cl.	91
TABELA A-7: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial fermentado por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 em 72h com 5 g/l de NH ₄ Cl.	92
TABELA A-8: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial fermentado por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 em 96h com 5 g/l de NH ₄ Cl.	92
TABELA A- 9: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 26°C com 2,5 g/l de NH ₄ Cl.	92
TABELA A-10: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 28°C com 2,5 g/l de NH ₄ Cl.	93
TABELA A-11: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 30°C com 2,5 g/l de NH ₄ Cl.	93
TABELA A-12: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 32°C com 2,5 g/l de NH ₄ Cl.	94

TABELA A-13: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 34°C com 2,5 g/l de NH ₄ Cl.	94
TABELA A-14: Efeito da adição de substrato (14,3% v/v) na fermentação de óleo-diesel comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 26°C com 2,5 g/l de NH ₄ Cl.	95
TABELA A-15: Efeito da adição de substrato (14,3% v/v) na fermentação de óleo-diesel comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 28°C com 2,5 g/l de NH ₄ Cl.	95
TABELA A-16: Efeito da adição de substrato (14,3% v/v) na fermentação de óleo-diesel comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 30°C com 2,5 g/l de NH ₄ Cl.	96
TABELA A-17: Efeito da adição de substrato (14,3% v/v) na fermentação de óleo-diesel comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 32°C com 2,5 g/l de NH ₄ Cl.	96
TABELA A-18: Efeito da adição de substrato (14,3% v/v) na fermentação de óleo-diesel comercial por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 34°C com 2,5 g/l de NH ₄ Cl.	97
TABELA A-19: Variação da atividade emulsificante na fase aquosa de cultura de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 30°C.	97
TABELA A-20: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel em água por bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 30°C.	98
TABELA A-21: Variação da atividade emulsificante na fase aquosa de cultura de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 40°C.	98
TABELA A-22: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel em água por bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 40°C.	99
TABELA A-23: Variação da atividade emulsificante na fase aquosa de cultura de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 50°C.	99
TABELA A-24: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel em água por bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 50°C.	100

TABELA A-25: Variação da atividade emulsificante na fase aquosa de cultura de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 60°C	100
TABELA A-26: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel em água por bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 60°C.	101
TABELA A-27: Variação da atividade emulsificante de cultura de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 para alguns emulsificantes comerciais comparado com a fase aquosa na temperatura de 50°C e pH 6	101
TABELA A-28: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel em água na temperatura de 50°C e pH 6.	101
TABELA A-29: Variação da atividade emulsificante de cultura de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 para alguns emulsificantes comerciais comparado com a fase aquosa na temperatura de 60°C e pH 7.	102
TABELA A-30: Estabilidade de emulsão óleo-diesel em água na temperatura de 60°C e pH 7.	102
TABELA A-31: Variação da atividade emulsificante utilizando-se diferentes pares óleo-água de cultura de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 50°C e pH 6.	102
TABELA A-32: Estabilidade emulsificante dos pares óleo-água a 50°C e pH 6, estabilizadas por fase aquosa de cultura de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913.	103
TABELA A-33: Variação da atividade emulsificante utilizando-se diferentes pares óleo-água de cultura de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a 60°C e pH 7.	103
TABELA A-34: Estabilidade emulsificante dos pares óleo-água a 60°C e pH 7, estabilizadas por fase aquosa de cultura de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913.	104
TABELA A-35: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 em fermentador de bancada a 32°C e 2,5 g/l de NH ₄ Cl.	102

TABELA A-36: Efeito da temperatura de 90°C na estabilidade de emulsão de óleo-diesel da fase aquosa e fase extraída de cultura de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913.	105
TABELA A-37: Resultados da 1ª fermentação para isolamento de bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913, em fermentador de bancada a 32°C.	105
TABELA A-38: Resultados da 2ª fermentação para isolamento de bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913, em fermentador de bancada a 32°C..	106
TABELA A-39: Resultados da 3ª fermentação para isolamento de bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913, em fermentador de bancada a 32°C.	107
TABELA A-40: Resultados da 4ª fermentação para isolamento de bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913, em fermentador de bancada a 32°C.	108
TABELA A-41: Resultados da 5ª fermentação para isolamento de bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913, em fermentador de bancada a 32°C.	109
TABELA A-42: Resultados da 6ª fermentação para isolamento de bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913, em fermentador de bancada a 32°C.	110
TABELA D-1: Vazão da membrana limpa.	109
TABELA D-2: Vazão com a membrana obstruída com concentrado de leite.	109
TABELA D-3: Determinação da percentagem de limpeza com NaOH 2N a 80°C por 30 min.	109
TABELA D-4: Determinação da percentagem de limpeza com HNO ₃ 0,5% a 55°C por 30 min.	110
TABELA D-5: Determinação da percentagem de limpeza com NaClO 300 ppm a 50°C por 30 min.	110

TABELA D-6: Determinação da percentagem de limpeza com procedimento usual.	110
TABELA D-7: Vazão com a membrana obstruída com concentrado de leite.	111
TABELA D-8: Determinação da percentagem de limpeza utilizando-se bioemulsificante.	111

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 3.1: Modelo simples de transferências de hidrocarbonetos, onde k_D , K_L E K_D são resistências a transferência de massa. Fonte: VELANKAR et al., 1975. 8
- FIGURA 3.2: Esquema da ω -oxidação. Fonte: CONN & STUMPF (1980). 10
- FIGURA 3.3: Esquema da β -oxidação mostrando o ataque enzimático a uma molécula de ácido graxo, envolvendo as enzimas: 1-acil-CoA-sintetase, 2-acil-CoA-desidrogenase, 3-enoil-CoA-hidrase, 4- β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase e 5- β -cetoacil-CoA-tiolase. Fonte: CONN & STUMPF (1980). 11
- FIGURA 3.4: Biosurfactante como aditivo alimentar. Fonte: KUDO (1988). 31
- FIGURA 5.1: Efeito da concentração de NH_4Cl na atividade emulsificante (AE) de caldo de fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *S. lipolytica* CCT 0913. 45
- FIGURA 5.2: Efeito da concentração de NH_4Cl na atividade emulsificante extraída ($\text{AE}_{\text{extração}}$) de células de *S. lipolytica* CCT 0913 em meio contendo óleo-diesel comercial (5% v/v). 46
- FIGURA 5.3: Efeito da concentração de NH_4Cl na massa celular seca (X) da fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *S. lipolytica* CCT 0913. 46
- FIGURA 5.4: Efeito da concentração de NH_4Cl no pH final da fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *S. lipolytica* CCT 0913. 47
- FIGURA 5.5: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial na atividade emulsificante (AE) da fase aquosa de fermentação por *S. lipolytica* CCT 0913 com 5 g/l de NH_4Cl . 50

- FIGURA 5.6: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial na atividade emulsificante extraída ($AE_{\text{extração}}$) de células de *S. lipolytica* CCT 0913 em fermentação com 5 g/l de NH_4Cl . 51
- FIGURA 5.7: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial na concentração de massa celular seca (X), fermentado por *S. lipolytica* CCT 0913 5 g/l de NH_4Cl . 51
- FIGURA 5.8: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial no pH de fermentação por *S. lipolytica* CCT 0913 com 5 g/l de NH_4Cl . 52
- FIGURA 5.9: Fermentação de óleo-diesel comercial 7% (v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da temperatura de 26°C. 53
- FIGURA 5.10: Fermentação de óleo-diesel comercial 7% (v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da temperatura de 28°C. 54
- FIGURA 5.11: Fermentação de óleo-diesel comercial 7% (v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da temperatura de 30°C. 54
- FIGURA 5.12: Fermentação de óleo-diesel comercial 7% (v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da temperatura de 32°C. 55
- FIGURA 5.13: Fermentação de óleo-diesel comercial 7% (v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da temperatura de 34°C. 55
- FIGURA 5.14: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da adição de óleo-diesel na temperatura de 26°C após 96h. 58
- FIGURA 5.15: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da adição de óleo-diesel na temperatura de 28°C após 96h. 58

- FIGURA 5.16: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, com 2,5 g/l de NH₄Cl. Efeito da adição de óleo-diesel na temperatura de 30°C após 96h. 59
- FIGURA 5.17: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, com 2,5 g/l de NH₄Cl. Efeito da adição de óleo-diesel na temperatura de 32°C após 96h. 59
- FIGURA 5.18: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, com 2,5 g/l de NH₄Cl. Efeito da adição de óleo-diesel na temperatura de 34°C após 96h. 60
- FIGURA 5.19a: Variação da atividade emulsificante a 30°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Sccharomyces lipolytica* CCT 0913. 63
- FIGURA 5.19b: Variação da atividade emulsificante, a 30°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Sccharomyces lipolytica* CCT 0913. 63
- FIGURA 5.20a: Variação da atividade emulsificante, a 40°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. 64
- FIGURA 5.20b: Variação da atividade emulsificante, a 40°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. 64
- FIGURA 5.21a: Variação da atividade emulsificante, a 50°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. 65
- FIGURA 5.21b: Variação da atividade emulsificante, a 50°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. 65
- FIGURA 5.22a: Variação da atividade emulsificante, a 60°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. 66

- FIGURA 5.22b: Variação da atividade emulsificante, a 60°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. 66
- FIGURA 5.23: Estabilidade de emulsão de óleo -diesel comercial estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, a 30°C. 67
- FIGURA 5.24: Estabilidade de emulsão de óleo -diesel comercial estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, a 40°C. 67
- FIGURA 5.25: Estabilidade de emulsão de óleo -diesel comercial estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, a 50°C. 68
- FIGURA 5.26: Estabilidade de emulsão de óleo -diesel comercial estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, a 60°C. 68
- FIGURA 5.27: Variação da atividade emulsificante, em pH 6 e 50°C, da emulsão de óleo-diesel em água estabilizada por emulsificantes. 70
- FIGURA 5.28: Variação da atividade emulsificante, em pH 7 e 60°C, da emulsão de óleo-diesel em água estabilizada por emulsificantes. 70
- FIGURA 5.29: Estabilidade de emulsão de óleo -diesel comercial estabilizada por emulsificantes em pH 6 e a 50°C. 71
- FIGURA 5.30: Estabilidade de emulsão de óleo -diesel comercial estabilizada por emulsificantes em pH 7 e a 60°C. 72
- FIGURA 5.31a: Variação da atividade emulsificante, em pH 6 e 50°C, das emulsões de óleos, benzeno e querosene em água estabilizada pela fase aquosa da fermentação de culturas de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. 72
- FIGURA 5.31b: Variação da atividade emulsificante, em pH 6 e 50°C, das emulsões de óleos, benzeno e querosene em água estabilizada pela fase aquosa da fermentação de culturas de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. 73

- FIGURA 5.32a: Variação da atividade emulsificante, em pH 7 e 60°C, das emulsões de óleos, benzeno e querosene em água estabilizada pela fase aquosa da fermentação de culturas de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. 73
- FIGURA 5.32b: Variação da atividade emulsificante, em pH 7 e 60°C, das emulsões de óleos, benzeno e querosene em água estabilizada pela fase aquosa da fermentação de culturas de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. 74
- FIGURA 5.33: Estabilidade de emulsões de óleos, benzeno e querosene em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, a pH 6 e 50°C. 75
- FIGURA 5.34: Estabilidade de emulsões de óleos, benzeno e querosene em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, a pH 7 e 60°C. 75
- FIGURA 5.35: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 em fermentador de bancada 32°C e 2,5 g/l de NH₄Cl. 76
- FIGURA 5.42: Acompanhamento da atividade de emulsão de óleo-diesel em água com o tempo de incubação na temperatura de 90°C, estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. 77
- FIGURA B-1: Fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Sacharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da concentração de 1,0 g/l de NH₄Cl. 112
- FIGURA B-2: Fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da concentração de 2,5 g/l de NH₄Cl. 112
- FIGURA B-3: Fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da concentração de 5,0 g/l de NH₄Cl. 113

- FIGURA B-4: Fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da concentração de 7,5 g/l de NH_4Cl . 113
- FIGURA B-5: Fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da concentração de 10,0 g/l de NH_4Cl . 114
- FIGURA B-6: Fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da percentagem de óleo-diesel de 3% com 2,5 g/l de NH_4Cl . 114
- FIGURA B-7: Fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da percentagem de óleo-diesel de 5% com 2,5 g/l de NH_4Cl . 115
- FIGURA B-8: Fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da percentagem de óleo-diesel de 7% com 2,5 g/l de NH_4Cl . 115
- FIGURA B-9: Fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da percentagem de óleo-diesel de 10% com 2,5 g/l de NH_4Cl . 116
- FIGURA B-10: Fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da percentagem de óleo-diesel de 15% com 2,5 g/l de NH_4Cl . 116
- FIGURA B-11a: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 30°C. 117
- FIGURA B-11b: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 30°C. 117
- FIGURA B-12a: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 40°C. 118

- FIGURA B-12b: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 40°C. 118
- FIGURA B-13a: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 50°C. 119
- FIGURA B-13b: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 50°C. 119
- FIGURA B-14a: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 60°C. 120
- FIGURA B-14b: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 60°C. 120
- FIGURA B-15: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por emulsificantes a pH 6 e 50°C. 121
- FIGURA B-16: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por emulsificantes a pH 7 e 60°C. 121
- FIGURA B-17a: Determinação da constante de decaimento de emulsões óleo em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a pH 6 e 50°C. 122
- FIGURA B-17b: Determinação da constante de decaimento de emulsões óleo em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a pH 6 e 50°C. 122
- FIGURA B-18a: Determinação da constante de decaimento de emulsões óleo em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a pH 7 e 60°C. 123

FIGURA B-18b: Determinação da constante de decaimento de emulsões óleo em água estabilizada por bioemulsificante de <i>Saccharomyces lipolytica</i> CCT 0913 a pH 7 e 60°C.	123
FIGURA B-19: Curva padrão de massa celular seca.	124
FIGURA B-20: Curva padrão de proteína.	124
FIGURA B-21: Curva padrão de carboidrato.	125
FIGURA C-1: Ciclo de Krebs. Fonte: CONN & STUMPF, 1980.	127

RESUMO

Uma numerosa quantidade de microrganismos produzem compostos de superfície ativa denominados bioemulsificantes. Apresentam a propriedade de estabilizar emulsões de óleo em água, devido ao abaixamento da tensão interfacial dos líquidos. Estes compostos são basicamente formados por lipídios, proteínas, ácidos graxos e complexos destes elementos. São produzidos por um mecanismo seqüencial de ataque dos microrganismos às gotas de óleo.

Neste trabalho estudou-se a produção de bioemulsificante de fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913. As variáveis que influenciaram a produção do bioemulsificante foram a concentração de NH_4Cl , a percentagem de óleo-diesel e a temperatura. Os melhores valores para estas variáveis foram que permitiram obter atividade emulsificante na faixa de 0,63 a 0,89 U. A adição de óleo-diesel após 96h de fermentação aumentou a produção de biomassa, chegando a 5,02 g/l em 168h e 26°C, mas não houve aumento de atividade emulsificante.

A estabilidade emulsificante foi avaliada em vários pH (2 a 10) e temperaturas (30, 40, 50 e 60°C), com a finalidade de determinar o par ideal para uma dada aplicação. As emulsões de óleos vegetais (óleo de milho, oliva, girasol, soja, canola e dendê) em água apresentaram estabilidade maior que as emulsões de hidrocarbonetos (óleo-diesel, benzeno e querosene) em água, sendo o melhor valor, 650,43 min, encontrado para óleo de oliva em pH 7 e 60°C. Comparando-se a estabilidade emulsificante de alguns tensoativos verificou-se que a fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 produzia o menor valor de estabilidade.

Concentrando a fase aquosa da fermentação em "rota-vapor", seguindo ou não de diálise e precipitação com clorofórmio-metanol (2:1 v/v) conseguiu-

se máxima concentração de 7,34 g/l com 188,84 mg/l de carboidrato, 467,35 mg/l de proteína e 0,55 U de atividade emulsificante quando em solução de 0,75%. Dialisando obteve-se máximo de 0,28 g/l de precipitado.

SUMMARY

A large number of microorganisms produce active surface agents which present good stability of oil-in-water emulsions. These compounds consist of carbohydrates, proteins, fatty acids and mixture of these elements.

During the fermentation the bioemulsifier production was influenced by NH_4Cl concentration, diesel-oil percentage and temperature. The best results of emulsifying activity (0.63 to 0.89 U) were obtained with 2.5 g/l of NH_4Cl , 3% of diesel-oil and 34°C . Diesel-oil addition after 96hr increases the biomass production yielding up to 5.02 g/l in 168 hr and 26°C but there was not increased in emulsifying activity.

The emulsifying stability was studied in pH range between 2 to 10 and temperature between 30 to 60°C with the objective to determine the optimum pair for its specific utilization. Vegetable oil-in-water emulsions yielded the best emulsifying stability. The greatest stabilizing effect was obtained with olive oil at pH 7 and 60°C (650.43 min). Stabilization properties of fermentation aqueous phase of diesel oil by *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 were compared with several commercial emulsifiers and it showed the smallest stabilities values.

The water-soluble bioemulsifier was isolated by solvent extractions (chloroform-methanol 2:1 vol/vol) and the maximum concentration was obtained without dialysis. The bioemulsifier had 188.84 mg/l carbohydrate and 467.35 mg/l proteins in solution with 0,75% (w/vol) of powder which presented activity of 0,55 U.

1- INTRODUÇÃO

Uma grande variedade de microrganismos podem crescer em meio contendo hidrocarbonetos como exclusiva fonte de carbono e energia. Como muitos dos substratos de hidrocarbonetos têm solubilidade limitada em água, o crescimento dos microrganismos degradadores de tais compostos é associado à produção de agentes de superfície ativa (COONEY & BRODERICK, 1981).

Esses agentes extracelulares são denominados bioemulsificantes ou biosurfactantes e são formados por glicolipídeos, álcoois graxos, ácidos graxos, polissacarídeos, peptídeos, complexos de polissacarídeos-proteína, peptídeos-lipídeos, proteína-carboidrato e mistura de lipídeos. Essa composição química depende do tipo de substrato empregado na condução da fermentação e do microrganismo: bactéria, levedura e fungo dos mais variados gêneros. Estes microrganismos, durante a fermentação, entram num processo seqüencial que leva à produção do bioemulsificante, consistindo num processo de diminuição da tensão interfacial óleo-fase aquosa, seguida do ataque das células às microgotas e às macrogotas.

A fermentação de hidrocarbonetos é limitada por várias condições e autores como BLANCH & EINSELE (1973) dividiram a fermentação em dois tipos, com substrato solubilizado na fase aquosa ou não. Fatores como composição do meio, pH, temperatura e taxa de aeração são importantes na condução do processo, pois interferem na taxa de crescimento do microrganismo e produção do bioemulsificante. Após a fermentação o bioemulsificante encontra-se na fase aquosa, necessitando de técnicas apropriadas para o isolamento como precipitação com sulfato de amônia, clorofórmio-metanol ou adição de ácidos, e subseqüente purificação.

Segundo DESAI e PALEJWALA (1989), os bioemulsificantes têm atraído muita atenção, devido as suas propriedades de superfície tais como: possuir atividade emulsificante, ser estabilizante de emulsões e por promover separação de óleos, umedecimento e solubilização. Sua aplicação industrial vai da limpeza de tubulações, tanques de navios que transportam petróleo e efluentes, recuperação de óleo até a produção de proteína unicelular (SCP); aplica-se também nas indústrias de bebidas, alimentícia, têxtil, metalúrgicas, de papel, de cosmético, de petróleo e petroquímica.

Uma outra aplicação do caldo da fermentação é a solubilização de óleos derramados que contaminam ecossistemas, facilitando assim a degradação dos mesmos, porém, há um conceito generalizado que as forças bióticas e abióticas, que prevalecem no meio ambiente marinho, não têm capacidade infinita de remoção dos hidrocarbonetos de petróleo (COLWELL & WALKER, 1977). Tais problemas surgem devido a necessidade de transportar o óleo bruto e refinado, o que por vezes leva a grandes derramamentos.

Estas contaminações afetam diretamente os seres humanos, pois estes óleos crus ou refinados possuem frações mutagênicas, cancerígenas e químicas inibidoras do crescimento. Em pequenas quantidades estes hidrocarbonetos destroem microalgas e formas jovens de muitos microrganismos, afetando conseqüentemente a cadeia alimentar dos ecossistemas marinhos.

2- OBJETIVOS

Devido as vastas aplicações industriais dos bioemulsificantes e à aplicabilidade do caldo de fermentação no campo ecológico, facilitando a despoluição de ecossistemas aquáticos, os principais objetivos deste trabalho foram:

Determinar as melhores condições de produção de bioemulsificante obtido da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica*.

Determinar o efeito do pH e da temperatura na estabilidade das emulsões de hidrocarbonetos e óleos vegetais em fase aquosa de fermentação e comparar com a ação de emulsificantes comerciais como alginato, caseína, pectina e tween 80.

Isolar o bioemulsificante por precipitação com clorofórmio-metanol medindo a atividade emulsificante em cada etapa do processo e determinando sua composição em termos de carboidrato e proteína.

3- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE HIDROCARBONETOS

Segundo ATLAS (1978) existe grande número de produtos metabólicos que podem ser produzidos por degradação microbiana de hidrocarbonetos. O crescimento destes microrganismos em meio com hidrocarbonetos é freqüentemente acompanhado por emulsificação desses compostos de carbono insolúveis em água (GUTINICK *et al.*, 1982).

Os hidrocarbonetos gasosos, líquidos e sólidos, nas séries alifáticas, olefínicas, aromáticas e naftênicas são degradados de acordo com a complexidade de sua estrutura. Uma numerosa quantidade de espécies de microrganismos aptas a atacar os hidrocarbonetos foram listados por ZOBELL (1946) e são mostrados na Tabela 3.1.

Dependendo do microrganismo utilizado a biosíntese do biosurfactante ou bioemulsificante pode estar ou não associada ao crescimento e ser enriquecida pelas condições de limite de crescimento ou por adição de precursores (WAGNER, 1988).

Estudos comparativos da habilidade de degradação de hidrocarbonetos foi realizado por WALKER *et al.* (1975), que dos 30 tipos de microrganismos estudados identificaram como mais efetivos na degradação do substrato a *Pseudomonas aeruginosas*, *Acinetobacter sp*, *Sporobolomyces sp*,

Rhodotorula glutinis, *Candida sp* e *Penicillium sp*. Os alcanos normais de cadeia lateral de 10 a 20 carbonos foram mais facilmente degradados por bactérias e leveduras enquanto que os fungos mostraram menor correlação entre comprimento da cadeia normal de carbono e a sua suscetibilidade à biodegradação.

TABELA 3.1: Espécies de microrganismos capazes de degradar hidrocarbonetos

Tipo de microrganismo	Gênero	
Bactéria	<i>Achromobacter</i> , <i>Acintomyces</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i>	<i>Acinetobacter</i> , <i>Acromonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Brevibacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Streptomyces</i> e
Levedura	<i>Candida</i> , <i>Hansenulas</i> , <i>Rhodospiridium</i> , <i>Sporobolomyces</i> , <i>Trichosporium</i>	<i>Debaryomices</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Torulopsis</i> e
Fungo	<i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Mucor</i> , <i>Penicillium</i> .	<i>Aureobasidium</i> , <i>Cunninghamella</i> , <i>Morticrella</i> , <i>Paecilomyces</i> e

A utilização de leveduras é conhecida na produção de bioemulsificante extracelular quando cresce em substratos imiscíveis em água tais como alcanos ou óleos (JONHSON *et al.*, 1992). BLANCH & EINSELE (1973) examinaram o crescimento de *Candida tropicalis* em n-hexadecano puro, onde o modelo cinético para este crescimento foi proposto por YOSHIDA & YAMANE (1974). A taxa de crescimento específico em n-parafinas C-14 a C-18 e em querosene foi acompanhada por SINGH *et al.* (1990). CIRIGLIANO & CARMAN (1984) produziram bioemulsificante a partir do crescimento de *Candida lipolytica* em n-hexadecano, já PROKOP *et al.* (1971) e GOMA *et al.* (1974) descreveram o crescimento deste microrganismo em outros substratos como dodecano, gasóleo, gasóleo desparafinado e frações específicas de nC-12 a nC-17. SAMPAIO (1995) verificou que *Saccharomyces lipolytica* pode produzir quantidades razoáveis de bioemulsificante e de biomassa com alto teor protéico em meio contendo óleo-diesel comercial como fonte de carbono.

Bactérias, produtoras de bioemulsificante de alta atividade, atuantes na degradação de hidrocarbonetos foram estudadas por SAR & ROSEMBERG (1983), que compararam 16 diferentes sublinhagens de *Acinetobacter calcoaceticus* cujos resultados foram confirmado por GUTINICK & PINES (1986) utilizando a sublinhagem RAG-1 crescendo em óleo cru. ROSEMBERG *et al.* (1979c) utilizaram a *Arthrobacter* RAG-1 (EF-RAG) para produzir um fator emulsificante extracelular puro, que foi utilizado com bons resultados na emulsificação de petróleo, óleo-diesel, variedades de óleos crus e gasóleos em água, já para querosene e gasolina a emulsão formada foi instável, sendo no entanto ricamente emulsificadas quando se adicionou uma certa quantidade de compostos aromáticos. Muitas das *Pseudomonas* testadas por ZAJIC *et al.* (1981) produzem agentes de superfície ativa cujas propriedades dependem do microrganismo e em muitos casos da fonte de carbono.

Segundo SHILO *et al.* (1989) em fermentações utilizando-se algumas bactérias é necessário manter as condições de crescimento exponencial por aproximadamente 6 dias até a bactéria aumentar o nível de produção do bioemulsificante, seguindo após isto as demais etapas de crescimento.

3.2. DEGRADAÇÃO DE HIDROCARBONETOS E MECANISMO DE ATAQUE DOS MICRORGANISMOS.

A degradação de hidrocarbonetos depende de sua composição e estado físico, da presença e espécie de microorganismo, quantidade de oxigênio viável, água, temperatura, pH e nutrientes inorgânicos (VAN DYKE *et al.*, 1981).

Segundo KÄPPELI e FIECHTER (1977) a afinidade entre a célula e o hidrocarboneto é devida à parede celular. Para GUTIERREZ & ERICKSON (1978) a área interfacial determina a quantidade de células que podem atacar as gotas de óleo. Para COONEY & BRODERICK, (1981) e ZAJIC *et al.* (1981) a degradação é acompanhada pela necessidade do contato direto entre células e uma larga quantidade de gotas de óleo. A quantidade de hidrocarboneto dissolvida na fase aquosa é devida também à formação de submicrogotas ou micelas. Em cada caso a superfície celular serve como um mediador da interação não enzimática adsortiva entre o substrato e a superfície celular (KÄPPELI e FIECHTER, 1977).

O contato direto entre as células e as gotas de hidrocarbonetos não é essencial para o crescimento. A solubilização dos hidrocarbonetos pelo surfactante depende da função de transferência do hidrocarboneto. As moléculas do hidrocarboneto difundem-se para a superfície da gota e através da interface na fase aquosa, como mostra a Figura 3.1. Elas então difundem-

se pelo meio aquoso ou são transportadas pelo líquido para a vizinhança da célula. Em cada etapa existe uma resistência (VELANKAR *et al.*, 1975).

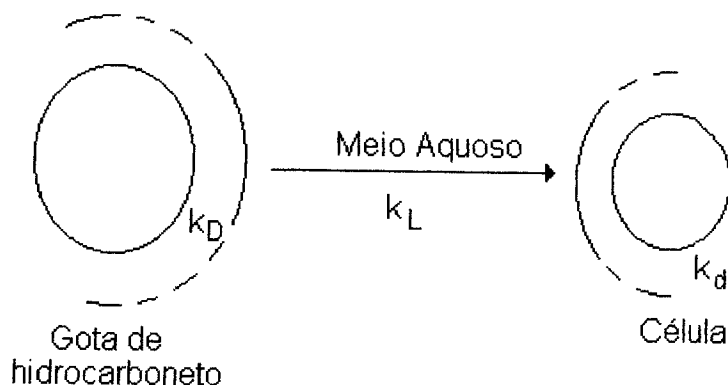


FIGURA 3.1: Modelo simples de transferências de hidrocarbonetos, onde k_D , k_L e k_d são resistências a transferência de massa. Fonte: VELANKAR *et al.*, 1975

O fenômeno de consumo de alcanos pelos microrganismos proposto por GUTIERREZ & ERICKSON, (1978), está dividido em dois estágios:

Os microrganismos modificam as propriedades físico-químicas e reológicas do sistema.

Os microrganismos modificam as propriedades do substrato, tais como a solubilidade.

Estes fatos reforçam a teoria sugerida por ROHNS (1992) citado por VAN LOOSDSRECHT *et al.* (1996) que expressa a habilidade do microrganismo usar os componentes oleosos e a necessidade de uma quantidade de emulsificante excedendo a concentração micelar crítica (CMC). O óleo-diesel apresenta comportamento degradante diferenciado quando

comparado com o hexadecano, quando utilizam-se microrganismos degradadores de hidrocarbonetos na temperatura de 30°C, pH entre 6,5 e 7,5 e agitação de 900 rpm. No início dos experimentos em batelada cerca de 14% do óleo da mistura consistia de n-alcanos, após 22h a percentagem caía para 1,5%. Neste período de tempo 90% dos alcanos lineares e 2% dos ramificados foram consumidos.

De acordo com ZOBELL (1946), há uma seletividade na degradação de óleos crus em virtude da variação de composição o qual propôs:

Parafinas e alifáticos são mais facilmente degradados que hidrocarbonetos aromáticos;

Parafinas de cadeia longa são degradadas preferencialmente às de cadeia curta;

Compostos saturados são degradados mais facilmente que os insaturados;

A biodegradação de misturas complexas de hidrocarbonetos de petróleo é geralmente incompleta e leva a resíduos asfálticos. Segundo CONN & STUMPF (1980), as reações que degradam hidrocarbonetos envolvem um mecanismo seqüencial denominado co-oxidação; que se inicia com a hidroxilação de um grupo metil terminal a álcool primário e subsequente oxidação de aldeído a ácido carboxílico como mostra a Figura 3.2.

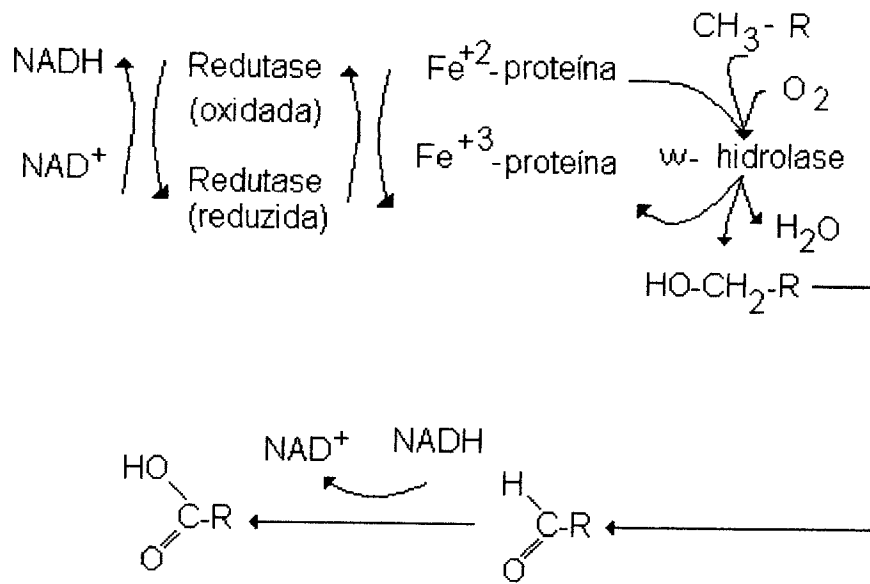
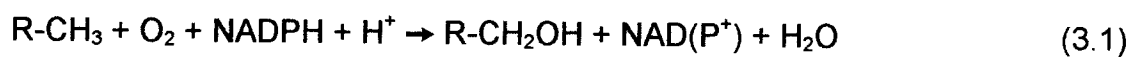


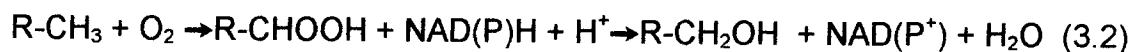
FIGURA 3.2: Esquema da ω -oxidação. Fonte: CONN & STUMPF (1980)

Segundo MORGAN & WATKINSON (1990) a conversão do n-alcano ao correspondente álcool pode seguir dois processos:

Por hidroxilação através da hidrolase:



Por utilização da oxigenase:



O ácido graxo por sua vez entra no processo de β -oxidação (Figura 3.3) formando ácido graxo com dois átomos de carbono a menos, CO_2 e acetil CoA que entra no ciclo de Krebs (Figura C-1 do Apêndice C).

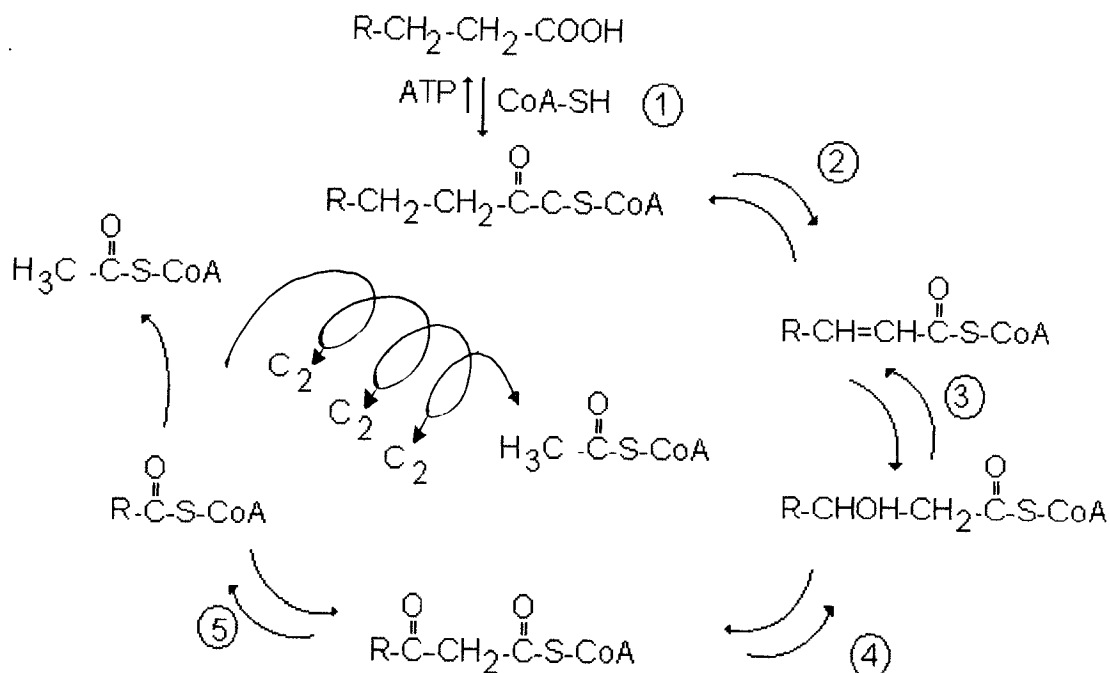


FIGURA 3.3: Esquema da β -oxidação mostrando o ataque enzimático a uma molécula de ácido graxo, envolvendo as enzimas: 1-acil-CoA-sintetase, 2-acil-CoA-desidrogenase, 3-enoil-CoA-hidrase, 4- β -hidroxiacil-CoA-desidrogenase e 5- β -cetoacil-CoA-tiolase. Fonte: CONN & STUMPF (1980)

O caminho geral para a degradação das n-parafinas leva à produção de unidades de C-2, para os hidrocarbonetos aromáticos envolve a hidroxilação da estrutura do anel benzênico e a formação de um diol (catecol). O anel é então quebrado formando um ácido carboxílico (ácido mucônico). A degradação dos compostos aromáticos geralmente procede-se por β -oxidação inicial da cadeia lateral, seguida da divisão da estrutura benzênica (dihidroxilação). A substituição alquil retarda a taxa de degradação dos alcanos. O importante do estudo foi a descoberta que os hidrocarbonetos podem ser degradados por co-oxidação. Neste processo um hidrocarboneto serve como substrato para o crescimento e o segundo, não servindo para o crescimento, é gratuitamente degradado. Assim aqueles que resistem ao ataque microbiológico podem ser degradados em uma mistura. Alguns

compostos de petróleo que são resistentes à degradação acumulam-se como poluentes, porém são removidos por degradação associativa. Alguns, no entanto, são poupados do ataque microbiológico, enquanto outros são perfeitamente atacados (diauxia). Assim co-oxidação e diauxia podem ocorrer em uma mistura, facilitando a degradação de compostos mais complexos como óleos refinados.

Quando utiliza-se *Candida lipolytica* o mecanismo proposto por GUTIERREZ & ERICKSON (1978): as células produzem material de superfície ativa que reduz a tensão superficial entre óleo e fase aquosa e conseqüentemente o diâmetro médio das gotas de óleo, ocorrendo também o aumento da área interfacial. Algumas células atacam grandes gotas de óleo e alimentam-se delas. Paralelamente começa a formação de mais microgotas através da explosão de bolhas de ar que envolvem o filme de óleo na superfície líquida dessas microgotas, por sua vez, são carregadas para dentro da fase aquosa por células que se soltam das grandes gotas e lá são adsorvidas. Para PROKOP & ERICKSON (1972), MOO-YONG & SHIMIZU (1971) e YOSHIDA & YAMAKE (1974) as microgotas são adsorvidas na superfície celular e permanecem lá até serem consumidas. Já os estudos de GOMA *et al.* (1973 e 1974) mostraram que a solubilidade aparente do óleo cresce durante a fermentação, devido a maior solubilidade dos hidrocarbonetos usados como substrato.

3.3. SUBSTRATOS UTILIZADOS NA FERMENTAÇÃO

Na fermentação de compostos hidrofóbicos por microrganismos, vários tipos de fontes de carbono podem ser utilizadas, como óleos vegetais, águas residuárias e compostos aromáticos. Por esta razão WAGNER (1988), afirmou que diferentes substratos levam a mudanças na composição dos ácidos graxos

e, conseqüentemente, propiciam modificações na configuração estrutural dos compostos formados.

Compostos no estado gasoso e líquido são mais rapidamente degradados, porém líquidos de baixo peso molecular podem ser inibidores de microrganismos, devido o seu efeito solvente. A solubilidade dos alifáticos decresce rapidamente com o aumento do peso molecular. Do ponto de vista biológico, a solubilidade de compostos alifáticos pode ser considerada como significativa para a sua degradação, exceto para os compostos de peso molecular muito baixo. (MORGAN & WATKINSON, 1990).

A emulsificação de hidrocarbonetos de cadeia reta e ramificada foi promovida pelo bioemulsificante produzido por *Arthrobacter* RAG-1, onde observou-se que os compostos sólidos não foram emulsionados, bem como pentano e hexadecano. Nos aromáticos os compostos sólidos não foram emulsionados da mesma forma que o 3-feniltolueno e o 1 e 2-metil-naftaleno. As cicloparafinas apresentaram valores baixos para atividade emulsificante, exceto o octaciclobuteno (109 U) e deciclohexano (79 U). Quase todos os hidrocarbonetos aumentaram a atividade emulsificante quando misturados com hexano e 1-metilnaftaleno (ROSEMBERG *et al.*, 1979a).

Entretanto, DESAI & PALEJWALA (1989) utilizando o sobrenadante da cultura de bactéria PCB-106 em diferentes substratos de hidrocarboneto, com o intuito de promover um estudo comparativo, verificaram que nos alifáticos havia atividade emulsificante enquanto nos aromáticos os valores não foram significativos.

A taxa de utilização individual de n-alcanos em gásóleo não é sempre uniforme. Segundo PROKOP & ERICKSON (1972), alguns n-alcanos são utilizados mais rapidamente que outros durante o estágio inicial da

fermentação em batelada, enquanto outros são consumidos em quantidades relativamente altas no último estágio da fermentação. GOMA *et al.* (1973) atribuíram este fato ao fenômeno de solubilização que é altamente específico. N-alcanos são solubilizados durante o crescimento de *Candida lipolytica* sendo que os hidrocarbonetos que são utilizados como substrato tornam-se mais solúveis.

Óleos minerais são misturas complexas de compostos hidrofóbicos, mono e poliaromáticos. O óleo-diesel é um dos maiores poluentes do solo e água e é constituído principalmente de alcanos lineares e ramificados (VAN LOOSDRECHT *et al.*, 1996).

Outros tipos de substratos foram utilizados por JUWARKAR *et al.* (1996), que compararam a fermentação de soro de queijo e água residuária de destilaria. Em soro de queijo ocorreu maior taxa de crescimento microbiano e pequena produção de bioemulsificante. Já nas águas residuárias de destilaria foi alto o crescimento devido talvez à presença de ácidos graxos voláteis em alta proporção, juntamente com a presença de raminose e acetato; que são mais facilmente convertidos em CoA (coenzima A).

Carboidratos são raramente utilizados como fonte de carbono e energia para a produção de bioemulsificante com exceção de *Artrobacter sp.*, *Penicillus subtilis*, *Torulopsis bombecol* e *Pseudomonas aeruginosas*. DESAI & PALEJWALA (1989) utilizando etanol a 2% (p/v) verificaram uma atividade emulsificante de 115 uni/ml. Tais valores aumentaram com a percentagem de etanol até 3% quando observou-se uma redução do bioemulsificante devido ao efeito inibitório do etanol no crescimento da bactéria.

3.4- FATORES QUE INFLUENCIAM A FERMENTAÇÃO DE HIDROCARBONETOS.

Segundo GUTIERREZ & ERICKSON (1977) além de ser necessário prover os microrganismos em crescimento de todas as suas necessidades reprodutivas e maior quantidade de oxigênio, além do fato do substrato estar presente em uma fase separada e seu limite de solubilidade em água ser baixo. BLANCH & EINSELE (1973) dividiram a fermentação de hidrocarbonetos em dois tipos: aquela onde apenas o substrato puro está envolvido e aquela onde o substrato está dissolvido em uma fase aquosa, sendo que neste último tipo notaram que:

Culturas em batelada exibem duas regiões de crescimento, uma exponencial e outra linear;

A taxa específica de crescimento aumenta com adição de surfactantes (geralmente utilizados na proporção 0,01 a 0,1%), e;

Existência de uma forte afinidade entre o microrganismo e o substrato por ele degradado.

AIBA *et al.* citado por GUTIERREZ & ERICKSON (1978) afirma que a taxa específica de crescimento depende das condições operacionais do fermentador. Já MOO-YONG *et al.* (1971) propuseram que tal efeito pode ser explicado devido a cinética de crescimento celular ser controlada pelo grau de possíveis ligações entre células e submicrogotas de óleo. Tal fato reforça as conclusões de VELANKAR *et al.* (1975) que observaram o aumento do crescimento exponencial com o aumento da agitação e altas taxas de agitação

aliada com altas concentrações celulares promovem o início do crescimento linear, o que pode ser explicado pela formação de mais micélios, aumentando assim o número de sítios de crescimento e concentração efetiva do substrato próximo da vizinhança da célula. HOMMEL (1990) citado por VAN LOOSDRECHT *et al.* (1996) afirmaram que a produção de bioemulsificante ocorre na última parte da fase exponencial e durante a fase estacionária, o que está de acordo com DESAI e PALEJWALA (1989).

As condições ambientais são fatores importantes na condução da fermentação, podendo-se citar: nutrientes, pH e temperatura. Nutrientes para o crescimento do microrganismo são necessários à boa condução do processo fermentativo. Os maiores rendimentos segundo KITAMOTO *et al.* (1990) ocorrem com a utilização de NaNO_3 na concentração de 0,2%, KÄPPELI *et al.* (1984), utilizando amônio, chegaram ao mesmo resultado. JOHNSON *et al.* (1992) verificaram que a fonte de nitrogênio afetava a atividade emulsificante (AE) mas não a concentração de biomassa. DESAI & PALEJWALA (1989), estudaram a influência da concentração de sulfato de amônio e fosfato, observaram que as concentrações de sulfato de 0,1 a 1% (g/g) influenciaram a atividade emulsificante, chegando a um máximo a 0,4% (g/g), como mostra a Tabela 3.2. Já a melhor concentração de fosfato foi 1,72% (g/g).

Para KÄPPELI *et al.* (1984) a razão C/N atingia um valor ótimo para a produção de biosurfactante num valor de 18, por outro lado quando a razão aumentava acima da concentração limite de nitrogênio, ocorria a diminuição da concentração de biomassa. A razão C/Fe também foi investigada em culturas contínuas e quanto menor a razão menor a concentração de bioemulsificante. Já a concentração de fósforo não teve nenhuma importância no metabolismo. HOMMEL *et al.* (1987) afirma que a quantidade absoluta de nitrogênio e não sua concentração relativa aparenta ser importante na produção de biomassa.

TABELA 3. 2: Efeito da concentração de sulfato de amônio e fosfato na produção de bioemulsificante por bactéria gram negativa PCB-106, crescendo em 3g% de etanol.

Sulfato de Amônio (% g/g)	AE (U/ml)	Fosfato (% g/g)	AE (U/ml)
0,1	13,9	0,71	28,2
0,2	184,5	0,95	63,8
0,3	200,0	1,19	28,2
0,4	216,5	1,43	45,2
0,6	174,8	1,72	208,0
0,8	156,4	2,13	142,1
1,0	165,4	2,38	23,1

Fonte: DESAI & PALEJWALA, 1989

KÄPPELI *et al.* (1984) e SHILO *et al.* (1989) variaram o pH, encontrando um valor ótimo entre pH 5,0 e 9,0. Abaixo e acima destes valores observaram um lento decréscimo da atividade. ROSEMBERG *et al.* (1979c) encontraram uma melhor atividade para pH 5 a 6 na fermentação de etanol com *Acinetobacter calcoaceticus*. Já PROKOP *et al.* (1971) trabalhando com *Candida lipolytica* obtiveram um intervalo ótimo de atividade emulsificante para pH entre 4 e 5,5. COOPER & GOLDENBERG. (1987), SINGH *et al.* (1990), PROKOP & ERICKSON (1972) e SAMPAIO (1995) verificaram que o controle do pH no nível desejado ao longo da fermentação, produziu melhores rendimentos celulares e atividade emulsificante.

A temperatura é outro fator importante no processo fermentativo, segundo KINSELLA *et al.* (1981), já que menores e mais numerosas gotas de

óleo são observadas em emulsões preparadas entre 10 e 20 °C. A temperatura deve afetar a interface formada e a taxa de adsorção, melhorando a formação e estabilização das gotas de emulsão. Assim nas baixas temperaturas (menores que 8 °C) a taxa de difusão e a taxa de desnaturação da interface óleo-água é reduzida, pois a energia cinética, isto é, a energia térmica da dispersão é também reduzida. Em altas temperaturas o aumento da energia cinética provoca adsorção mais rápida, melhorando a forma e a estabilidade do filme interfacial.

PROKOP & ERICKSON (1972) estudaram o controle difusional para estimar a energia de ativação aparente através de estudos da variação da temperatura entre 23 e 30 °C. JONHSON *et al.* (1992) afirmaram que a produção de bioemulsificante é significativamente influenciada pela temperatura.

Para SAMPAIO (1995) a maior eficiência na produção de bioemulsificante e massa celular na fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica*, foi verificada para meios de cultura contendo cloreto de amônio como fonte de nitrogênio. Verificou também que nos experimentos conduzidos nos fermentadores de bancada comparados com frascos agitados, o tempo necessário à fermentação foi reduzido, a atividade emulsificante aumentou em até 16% e o rendimento celular em 26%. Os maiores rendimentos celulares foram obtidos para concentração de substrato de 3% (v/v), porém as maiores atividades emulsificantes e maiores taxas de degradação do óleo-diesel ocorreram a uma concentração de 5% (v/v) e as maiores atividades emulsificantes foram conseguidas a pH 5.0.

3.5- COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS BIOEMULSIFICANTES

Existem duas classes de emulsificantes: os sintetizados quimicamente e aqueles produzidos biologicamente. Ainda podem ser classificados como aniônicos, catiônicos e não iônicos. Para emprego comercial determina-se o número HLB (balanço hidrofílico-lipolítico) que caracteriza os compostos de superfície ativa, porém pouca atenção é dada à possibilidade que emulsificantes com idêntico número HLB possam ter diferentes interações com substrato de hidrocarbonetos (ROSENBERG *et al.*, 1979b).

Certas substâncias são capazes de solubilizar-se tanto em água como em óleo. A solubilidade em óleo lhe é conferida pela cadeia carbônica enquanto o grupo polar, por sua alta afinidade com a água, é capaz de arrastá-la e quando em um meio óleo-água orienta-se de modo a manter os grupos hidrofílicos na fase aquosa e as cadeias carbônicas na oleosa. Estes tensoativos são representados na Tabela 3.3:

Para WAGNER (1988) a parte hidrofílica dos surfactantes pode ser um mono, oligo ou polissacarídeo, aminoácido, peptídeo cíclico, proteína ou fosfoéster. A porção lipofílica usualmente consiste de um ou mais ácidos graxos de cadeia longa, ácido graxo hidroxilado ou α -alquil- β -hidroxilado ácido graxo com um número de carbono de 30 a 40. Em geral os compostos de superfície ativa são classificados pela sua composição química: glicolipídeos, lipopeptídeos, lipopolissacarídeos e polissacarídeos-lipídeo complexo, fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros (HOROWITZ *et al.*, 1990).

TABELA 3. 3: Classificação e estrutura dos tensoativos.

Classe	Radical	Fórmula
Aniônico	Carboxil	$-\text{COO}^-\text{Na}^+$
	Sulfato Orgânico	$-\text{OSO}_3^-\text{Na}^+$
	Sulfonato Orgânico	$-\text{SO}_3^-\text{Na}^+$
	Éter de Acido Fosfórico	$-\text{OPO}_3^-(\text{Na}^+)_2$
Catiônico	Amina Primária	$-\text{NH}_3^+\text{Cl}^-$
	Amina Secundária	$-\text{NH}_2^+\text{Cl}^-$
	Amina Terciária	$-\text{NH}^+\text{Cl}^-$
	Amina Quartenária	$-\text{N}^+\text{Cl}^-$
Não Aniônico	Éter	$-\text{O}-$
	Hidroxi	$-\text{OH}-$
	Ester de Ác. Carboxílico	$-\text{COO}-$
	Carboamida	$-\text{CONH}-$
	Sulfoamida	$-\text{SO}_2\text{NH}-$
	Compostos com (=) (Alcenos)	$-\text{CH}=\text{CH}-$

Segundo ZAJIC e GERSON (1979) glicolipídeos são freqüentemente encontrados no caldo de fermentação que emprega bactérias, consistem de dissacarídeos esterificados oriundos da modificação de ácidos graxos. Lipopolissacarídeos são componentes presentes na parede celular de bactérias, várias frações e produtos da degradação da parede celular possuem atividade surfactante. Lipopeptídeos tem alto peso molecular, tem atividade superficial e só são isolados de bactérias.

A composição química do bioemulsificante depende do microrganismo e do substrato que será fermentado. A Tabela 3.4 mostra a relação dos microrganismos e a estrutura química do bioemulsificante obtido (ROSENBERG & SCHINDLER, 1977). Esta relação torna-se clara quando analisa-se o bioemulsificante produzido por *Candida lipolytica* cultivada em mistura de hidrocarbonetos C-13 a C-14, que apresenta 44,2% de carboidrato, 26,8% de proteína e 3,15% de ácidos graxos. Os carboidratos são formados por raminose, manose, galactose, xilose e glicose e a proteína é formada por ácido aspártico, treonina, serina, ácido glutâmico e alanina (PAREILLEUX, 1979). Utilizando n-hexadecano o bioemulsificante, produzido com *Candida lipolytica*, era formado por 83% de carboidrato e 17% de proteína (CIRIGLIANO & CARMAN, 1985).

Emulsan é a forma extracelular de um bioemulsificante polianiónico formado por associação de células na degradação de óleo por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (FOGHT *et al.*, 1989). ROSENBERG *et al.* (1979b) produziram um bioemulsificante heteropolissacarídeo aniônico de peso molecular $9,9 \times 10^5$, com o microrganismo anteriormente citado. Ele era constituído de D-galactosamina, ácido D-galactosamina urônico e uma hexosamina não identificada. SHILO *et al.* (1989) obtiveram um bioemulsificante com peso molecular de 200.000 Daltons, composto de açúcar, ácido graxo e proteína, já o obtido por COOPER & GOLDENBERG. (1987), utilizando duas espécies de *Bacillus* revelaram por eletroforese a ocorrência de 10 componentes com peso molecular entre 70.000 e 100.000 Daltons. Sua parcial caracterização mostrou depois de dialisado e hidrolisado a presença de D-glucosamina e pouca quantidade de dois outros amino-açúcares.

TABELA 3.4: Bioemulsificantes, algumas estruturas químicas e seus microrganismos de origem.

Substância	Microrganismo
Trialoselipídeo	<i>Arthrobacter paraffinus</i> , <i>Nocardia asteroides</i> , <i>Brevibacterium vitarumen</i> , <i>Corynebacterium ovis</i> , <i>Propionibacterium shermanii</i> , <i>Rhodococcus erythropolis</i> ,
Ramnolipídeo	<i>Pseudomonas aeruginosas</i> , <i>Pseudomonas sp.</i>
Soforeselipídeo	<i>Torulopsis magnoliae</i> , <i>T. grapenigiesseri</i>
Diglicosil- Diglicerídeo	<i>Lactobacillus fermenti</i>
Polissarilipídeo Complexo (proteína)	<i>Arthrobacter calcoaceticus</i> , <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , <i>Candida lypolitica</i> , <i>Candida tropicalis</i>
Lipopeptídeo	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Candida petrophilum</i>
Ornitina - Lisina Lipídeo	<i>Agrobacterrium tumefacious</i> , <i>Gluconobacter cerineu</i>
Proteína	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Fosfolipídeo	<i>Thiobacillus thiooxidans</i> , <i>Corynebacterium alkannus</i>
Ácidos Graxos	<i>Micrococcus cerificans</i>
Ácido Corinomicólico	<i>Corynebacterium lepus</i>
Álcoois Graxos	<i>Arthrobacter sp.</i> , <i>Mycobacterium lacticolum</i>
Glicerídeos Ésteres	e <i>Acinetobacter sp.</i> , <i>Mycrobacterium rhodochrous</i>

Fonte: BÜLLER & SCHINDLER (1984)

3.6- PROPRIEDADES DO BIOEMULSIFICANTE

Propriedades emulsificantes, segundo KINSELA *et al.* (1978), são muito importantes em várias aplicações nas indústrias alimentícias, principalmente em alimentos protéicos. Essas propriedades são discutidas em termos da capacidade emulsificante (CE), estabilidade emulsificante (ES) e atividade emulsificante (AE). A capacidade emulsificante revela a máxima quantidade de óleo que é emulsificada sob condições específicas. As variáveis que afetam a capacidade emulsificante são: velocidade de mistura, desenho do equipamento, taxa de adição de óleo, espécie de óleo e natureza da proteína; portanto, a capacidade emulsificante não é uma propriedade da proteína somente, mas sim do sistema da emulsão, do equipamento utilizado e dos métodos. A Tabela 3.5 mostra estes métodos.

TABELA 3.5: Métodos utilizados para promover emulsão.

Autor/ano	Método	Característica
SWIFT <i>et al.</i> (1961)	Micromisturador	Evita formação da emulsão em ar-livre
TSAI <i>et al.</i> (1970)		
HAQ <i>et al.</i> (1973)	Impedância da corrente alternada	Índice objetivo de colapso das bolhas
CROWELGE <i>et al.</i> (1974)	Viscosidade	Queda da viscosidade devido a corrente elétrica
MARSHALH (1975)	Adição de óleo solúvel	Reconhecimento visual da fase inversa

Fonte: KINSELA *et al.* 1978

A estabilidade emulsificante é definida como a quantidade de óleo e/ou creme separado da emulsão durante um certo período de tempo. Este parâmetro depende da temperatura, campo gravitacional e concentração de óleo na emulsão. A dependência é devida ao fato de diferentes fatores poderem quebrar a emulsão formada. A estabilidade emulsificante pode ser determinada por turbidimetria, transmissão de luz, ressonância magnética nuclear, dentre outras.

CIRIGLIANO & CARMAN (1985) estudaram o comportamento da atividade e estabilidade emulsificante na produção de Liposan como mostra a Tabela 3.6. Quando se emulsionava óleos vegetais em água a emulsão separava-se em 10 minutos, entretanto quando se adicionava o bioemulsificante a estabilidade passava a 50 minutos. A Tabela 3.7 mostra comparativamente as propriedades do Liposan frente a outros emulsificantes.

As propriedades surfactantes ou emulsificantes resultam da presença de porções hidrofílicas e hidrofóbicas da mesma molécula (FIECHTER, 1992). Estas propriedades são afetadas pelo pH, força iônica e temperatura.

COOPER *et al.* (1988) verificaram o efeito do pH em emulsões com bioemulsificante purificado (0,05% p/v) de *Saccharomyces cerevisiae*, numa faixa de 2 a 10. Quando trabalharam com duas espécies de *Bacillus* (1987) em vários pH obtiveram um maior índice de emulsão entre 4 e 8, porém para valores acima de 9 e abaixo de 3 o índice de emulsão caía à metade e acima de 11 não havia emulsão e quando neutralizava-se os pH altos não havia recuperação da estabilidade.

TABELA 3.6: Estabilização de emulsões de óleo vegetal pelo Liposan (a).

Óleo Vegetal	Constante de decaimento k_d (10^{-3})		
	c/ Liposan	s/ Liposan	Diferença
Caroço de algodão	-8,6	-2,6	6,0
Milho	-7,7	-2,6	5,1
Soja	-7,3	-2,3	5,0
Amendoim	-8,2	-3,3	4,9
Oliva	-5,4	-2,7	2,7
Safflower	-6,6	-4,3	2,3
Girassol	-6,2	-4,1	2,1

(a) - quanto menor o valor de k_d (constante de decaimento) maior a estabilidade. Fonte: CIRIGLIANO & CARMAN (1985).

A máxima atividade emulsificante, utilizando *Acinetobacter calcoaceticus*, foi encontrada entre o pH 5 e 9, acima deste valor formava-se um precipitado que impedia a correta determinação da emulsão. Já nas soluções contendo tampão ou sais diluídos o melhor valor para pH ficou entre 5 e 6 e acima do valor 7 a atividade foi perdida (ROSENBERG *et al.*, 1979a).

Para SINGH & DESAI (1988) a atividade emulsificante do caldo sobrenadante de cultura de *Acinetobacter paraffineus* decresceu por tratamento em banho de água fervente por 15 min, não foi afetada por pH entre 5 e 10 e por concentração de NaCl e CaCl₂ a 10% e 0,3% respectivamente, o que indica que as emulsões não são termoestáveis e efetiva em condições salinas e alcalinas. Entretanto ROSENBERG *et al.* (1979a) utilizando *Acinetobacter calcoaceticus* verificou a influência de MgSO₄

e MgCl_2 na atividade, encontrando um valor máximo a 1,5 mM Mg^{2+} , 10 mM CaCl_2 e 10 mM MnCl_2 .

TABELA 3.7: Comparação das propriedades de emulsificação e estabilização(a).

Emulsificante	Atividade (U)	Emulsificante	$K_d (10^{-3})$ (min)
Caragenina	1,75	Tween 80	-2,1
Tween 80	1,60	HPMC	-2,1
Tween 20	1,35	Tween 20	-2,9
Pectina	1,21	Gelatina	-3,8
Triton X-100	1,20	Alginato	-5,2
Liposan	0,75	Caragenina	-5,7
Caseína	0,65	Goma arábica	-5,9
Alginato	0,60	Triton X-100	-5,9
Goma Arábica	0,59	Liposan	-6,0
Goma gati	0,47	Caseína	-7,2
HPMC	0,30	Goma gati	-7,6
Dextrana	0,22	Pectina	-8,9
Gelatina	0,08	Dextrana	-21,0

(a) - Atividade emulsificante (U), foi descrita como a quantidade de bioemulsificante que provoca uma absorbância de 1,0 a 540 nm, usando n-hexadecano como hidrocarboneto. Fonte: CIRIGLIANO & CARMAN (1985)

O bioemulsificante produzido por *Bacillus licheniformes* 86 foi estável por 20 min de incubação numa faixa de temperatura de 25 a 120°C, observando um aumento da tensão superficial a 75°C (HOROWITZ *et al.*, 1990). Na taxa de diluição entre 0,20 e 0,25h a tensão superficial decresce, pois o aumento da concentração celular leva ao aumento da atividade superficial do material produzido (GUTIERREZ e ERICKSON, 1978).

3.7- ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE BIOEMULSIFICANTE

Após a fermentação, o bioemulsificante permanece na fase aquosa, portanto faz-se necessário isolá-lo desta fase. Muitos autores utilizam o método de centrifugação para separar as células da fase líquida. Apesar da centrifugação o bioemulsificante ainda permanece na fase aquosa e por isso autores como CIRIGLIANO & CARMAN (1984) desenvolveram um método para o isolamento do bioemulsificante. Este método consiste de filtrações e utilização de diálise seguida de extrações com solvente (clorofórmio-metanol). As experiências mostraram que a razão 10:1 v/v de clorofórmio-metanol era ótima para as extrações, sendo que quanto menor a razão maior seria a quantidade de extrações para se obter o mesmo resultado. O rendimento médio foi de 600mg/300ml de meio, com atividade emulsificante de 30%. Já ROSENBERG *et al.* (1979a) utilizaram dois métodos para proceder o isolamento do bioemulsificante produzido por *Arthrobacter sp.* RAG-1: a- extração com heptano de culturas crescidas em hexadecano, e b- precipitação com sulfato de amônia de culturas que cresceram em etanol. No primeiro caso obtiveram um rendimento de bioemulsificante liofilizado denominado EF-RAG9HD de 1,5 g/ 27 l com atividade específica de 205 U/mg e para o segundo método obtiveram rendimento de 2,1 g/ 10 l com atividade de 300U/mg.

A purificação de Liposan foi estudada por CIRIGLIANO & CARMAN (1985) e o método constava da passagem da suspensão de bioemulsificante isolado em um tampão (pH 7,4) por uma coluna contendo Affi-gel concavalin A. O bioemulsificante foi parcialmente purificado e continha 83% de carboidratos e 17% de proteínas, com atividade emulsificante de 53% e o peso molecular foi estimado em 27.600 g/mol. No estudo foi verificado o comportamento da atividade emulsificante durante o procedimento de purificação que está representado na Tabela 3.8:

TABELA 3.8: Comportamento da atividade emulsificante durante o processo de purificação de Liposan.

Passos da Purificação	AE _{total} U	Carboidrato (mg)	Proteína (mg)	Rendimento (%)
Filtrado de células livres	172	38,0	12,0	100
Filtrado concentrado	159	37,1	11,8	92
Precipitado branco	84	36,8	11,5	49
Affi-gel Con. A ^a	32	9,1	1,8	18

a- Dados para 300 mL de cultura. Fonte: CIRIGLIANO & CARMAN (1985)

SANCHEZ *et al.* (1996) purificaram Cladosan, bioemulsificante obtido do *Cladosporium resinae*, por cromatografia em fase reversa utilizando metanol-água (35:65), com subsequente evaporação do solvente, rendendo 156 mg/l de bioemulsificante do qual 75% da fração total era composta de seis compostos.

Com o surfactante produzido por *Bacillus licheniformes* 86, HOROWITZ *et al.* (1990) obtiveram o produto purificado contendo 0,6 a 1,2 mg/g de glicose consumida. Já a manoproteína, usada como bioemulsificante, obtida da *Saccharomyces cerevisiae* foi isolada por precipitação com 3 volumes de etanol e 1% de ácido acético e apresentou 44% de carboidratos e 17% de proteína (COOPER *et al.*, 1988).

Uma maneira de se obter emulsificante biodegradável é usar lipase em anidrido de piridina. A enzima catalisa a transesterificação entre açúcares em solvente orgânico e estes serão usados como agente emulsificante, porém esta reação é relativamente ineficiente devido à baixa solubilidade dos açúcares nos solventes orgânicos. O aumento da síntese é gradual com o progresso da reação. O emulsificante foi isolado e depois purificado por cromatografia usando clorofórmio-metanol (8:1), obtendo-se cerca de 48 mg de acilfrutose puro (LEE *et al.*, 1996).

SINGH *et al.* (1990) utilizaram água quente (80 a 90°C) para extrair o bioemulsificante da parede celular. Tal procedimento mostrou que a atividade emulsificante era idêntica ou maior que a apresentada na fase aquosa da fermentação, sugerindo que uma quantidade significativa do bioemulsificante encontrava-se preso a parede celular, verificaram também que a atividade não é perdida no calor. Com uma segunda extração observaram a não remoção de atividade, o que levaram a crer que todo o bioemulsificante já tinha sido extraído das células.

3.8- APLICAÇÃO INDUSTRIAL DE BIOEMULSIFICANTES E ASPECTOS ECOLÓGICOS.

O potencial de aplicação de compostos de superfície ativa de microrganismo é baseada em suas propriedades funcionais, que incluem: emulsificação, separação, umedecimento, solubilização, de-emulsificação, inibição de corrosão e redução da viscosidade de líquidos. Essas propriedades são aplicadas em campos diversos da agricultura, construção e nas indústrias alimentícias, de bebidas, papel, metal, têxtil, cosméticos, farmacêuticas, petróleo e petroquímica (FIECHTER, 1992). SHILO *et al.* (1989) completaram as indicações da aplicação de bioemulsificantes em limpeza de tanques, preparo de misturas óleo-álcool para combustíveis e dispersão de óleos derramados em ecossistemas aquáticos.

O uso de biosurfactantes em alimentos é restrito devido às questões de segurança, qualidade sensorial, custo, propriedades funcionais, costume e leis. O fator segurança pesa mais e requer que o biosurfactante seja biologicamente degradado e não forme compostos tóxicos ao corpo humano e ao meio ambiente. Quando utilizado em alimentos dividem-se em lipídeos, proteínas e polissacarídeos como mostra a Figura 3.4.

As proteínas são produzidas naturalmente, suas propriedades emulsificantes nem sempre satisfazem às necessidades das indústrias, portanto muitas modificações são feitas (ex. acilação de glicina ou caseína para aumentar a atividade emulsificante). Lecitina é um termo utilizado para designar misturas de fosfatídeos que são derivados de plantas e animais. Industrialmente estima-se seu uso em 130.000 a 380.000 ton e são também modificadas para melhorar suas propriedades (ex. hidroxilação e hidrogenação) (KUDO, 1988). Segundo FIECHTER (1992) os compostos de superfície ativa na indústria alimentícia são usados como emulsificantes em aditivos alimentares no processamento da matéria-prima, quer seja pela sua

importância na formação da consistência e textura apropriadas, bem como na dispersão de fases. Em padarias e na indústria de carnes influenciam as características reológicas da farinha ou a emulsificação das gorduras.

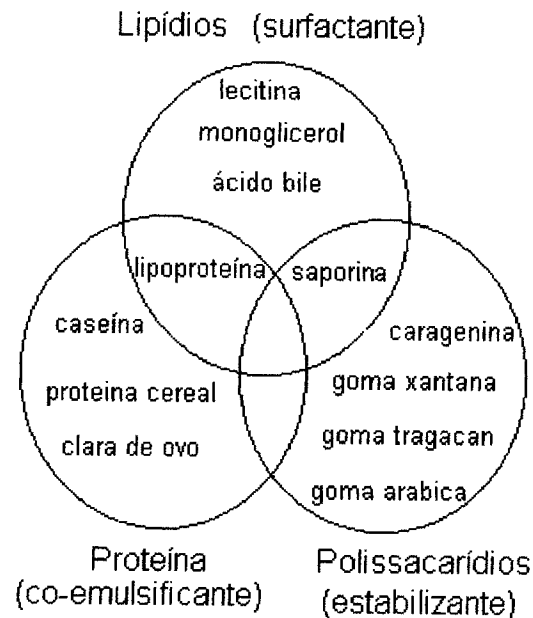


FIGURA 3.4: Biosurfactante como aditivo alimentar. Fonte: KUDO (1988)

O potencial de recuperação de óleo é baseado na sua aplicação como agente emulsificante, de-emulsificante e redutor da viscosidade de óleos crus pesados (KÄPPELI *et al.*, 1984). Para ZAJIC e GERSON (1979) 30 a 50% do petróleo total não é recuperado. Um método promissor para a recuperação é a injeção de surfactantes e água ou vapor no poço não produtor (recuperação terciária), apesar de tecnicamente fácil o processo é economicamente questionável devido à larga quantidade de surfactante requerida.

Na agricultura os surfactantes são necessários para hidrofilição de solos pesados para obtenção de boa umidade e realizar igual distribuição dos fertilizantes no solo. Na cosmética são encontrados nos shampoos e condicionadores (FIECHTER, 1992).

De acordo com ATLAS (1978) aproximadamente 10 milhões de toneladas de petróleo são derramados nos oceanos por ano, provenientes das operações diárias, e segundo SAMPAIO (1995) estes derramamentos estimularam a pesquisa e o desenvolvimento de métodos para a limpeza, bem como para sua degradação.

As principais formas de eliminar a poluição é: evaporação (transfere os hidrocarbonetos para a atmosfera), biodegradação (transforma os hidrocarbonetos em compostos contendo oxigênio) e biodegradação completa (obtenção de CO₂ e H₂O). A poluição de petróleo segundo ATLAS (1978) depende de:

Natureza do poluente, “composição química” da mistura de hidrocarboneto;

Presença de aditivos;

Concentração dos componentes, e;

O meio ambiente que recebe o poluente de petróleo (quando e onde ocorre a contaminação).

COLWELL & WALKER (1977) verificaram em seus estudos que óleos crus possuem taxas de degradação mais elevadas do que óleos refinados, devido à presença de hidrocarbonetos resistentes à degradação. Além disso, verificaram que no meio ambiente a degradação dos hidrocarbonetos é

influenciada pela falta de nutrientes como nitrato, fosfatos e pela presença de oxigênio. Estas diferenças sofrem modificações regionais, e depende da profundidade em que se dá a contaminação. No fundo do mar, por exemplo, ocorre a influência da pressão e da temperatura.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1- MICRORGANISMO

Saccharomyces lipolytica CCT 0913 (NCYC 825) obtida junto à Coleção de Cultura Tropical da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tossello” (FTPT), foi utilizada no presente trabalho e mantida em estoque no laboratório de Processos Fermentativos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

4.1.1- MEIO DE MANUTENÇÃO

O microrganismo foi estocado em tubos de ensaio com agar inclinado, tendo como fonte de carbono óleo-diesel comercial a 5% (v/v) e composição de acordo com a Tabela 4.1 (SAMPAIO, 1995).

A ativação da cultura foi realizada acrescentando 2% de óleo diesel comercial e 2,5 g/l de extrato de levedura ao meio de manutenção (Tabela 4.1).

TABELA 4.1: Composição do meio de manutenção para a *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

Composição	Concentração (g/l)
Óleo-diesel	5 *
KH ₂ PO ₄	7,0
MgSO ₄ .H ₂ O	0,4
NaCl	0,1
NH ₄ Cl	5,0
Extrato de levedura	1,0
Ágar	20,0

* percentagem (v/v)

4.1.2- MEIO DE CULTURA

O meio de cultura líquido utilizado na fermentação teve composição semelhante ao meio de manutenção, exceto pela ausência de ágar. Na condução da fermentação utilizou-se inicialmente 5% (v/v) de óleo-diesel e 5,0 g/l de NH₄Cl, de acordo com SAMPAIO (1995). Em outros ensaios variou-se a concentração da fonte de carbono e de nitrogênio.

4.2- SUBSTRATO

O óleo-diesel comercial proveniente da Refinaria de Paulínia (REPLAN) e adquirido de um único lote, foi utilizado como fonte de carbono. De acordo com a Refinaria, a composição química média do óleo era: parafinas (18-27% v/v), aromáticos (23-34% v/v), naftênicos (35-45% v/v), saturados (60-70% v/v) e olefinas (30-40% v/v). As principais propriedades físicas eram: densidade relativa de 0,856 g/cm³, ponto inicial de ebulição de 140°C e percentagem máxima de enxofre da ordem de 0,32%

4.3- FERMENTAÇÃO

Primeiramente o processo foi conduzido em frascos (erlenmeyers 500 ml) contendo cada um 100 ml do meio de cultura, agitados em agitador rotativo tipo Fermentation Design, a 200 rpm por 168 h e inoculado com 10 ml de inóculo com 96h, obtido nas mesmas condições da fermentação. Depois o processo passou a ser realizado em fermentador de bancada (fermentador LSL-Biolafite SA de 6l de capacidade) com um volume de trabalho de 4,4l a pH inicial 5 por 48 ou 72h, aeração de 1,5 vvm e agitação de 400 rpm. O inóculo de 400 ml foi proveniente de fermentação em frasco agitado (96h).

4.3.1- EFEITO DA VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Incorporou-se diferentes percentagens de substrato (3 a 15%) e concentração de nitrogênio (1,0 a 10,0 g/l), na forma de NH₄Cl. Inicialmente

variou-se a percentagem de substrato e depois a concentração de NH_4Cl , com o intuito de determinar a composição do meio para obter a maior atividade emulsificante. Foi estudado também o efeito da adição de substrato (14,3% v/v) na atividade emulsificante após 96 h de fermentação.

4.3.2- EFEITO DA TEMPERATURA NA FERMENTAÇÃO

Foram realizados ensaios em frascos agitados em diferentes temperaturas (26, 28, 30, 32 e 34°C) de fermentação usando óleo-diesel comercial, com a finalidade de determinar a temperatura ótima de crescimento do microrganismo que levava a melhor atividade emulsificante. O meio líquido continha 7% (v/v) de óleo diesel comercial e 2,5 g/l de NH_4Cl . O pH inicial foi ajustado com NaOH para 5,0 e as fermentações ocorreram com agitação de 200 rpm em mesa rotativa.

4.4- DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE DO BIOEMULSIFICANTE

De uma fase aquosa obtida conforme o item 4.7.2 tomaram-se alíquotas de 5 ml que foram incubadas a diferentes valores de pH (2 a 10) e temperaturas (30 e 60°C), com a finalidade de determinar o efeito dessas variáveis na emulsão de óleo-água formada, bem como determinar a estabilidade das emulsões. Para tanto a atividade emulsificante foi medida conforme item 4.7.3 em intervalos regulares de tempo.

Com os dados obtidos determinou-se a constante de decaimento característica da cinética de perda de atividade do bioemulsificante.

Supondo-se uma cinética de 1ª ordem:

$$\frac{d(AE)}{dt} = -k_d(AE) \quad (4.1)$$

Onde: AE \Rightarrow Atividade emulsificante.

t \Rightarrow Tempo.

k_d \Rightarrow Constante de decaimento.

Integrando-se a equação 4.1 entre 0 e t e AE_o e AE_f , obteve-se:

$$\ln \left(\frac{AE_o}{AE_f} \right) = k_d \times t \quad (4.2)$$

Finalmente, construindo-se um gráfico $\ln(AE_f)$ versus t, determinou-se o k_d pelo coeficiente angular da reta obtida. A estabilidade da emulsão (ES) é inversamente proporcional à constante de decaimento obtida do gráfico, ou seja:

$$E = \frac{1}{k_d} \quad (4.3)$$

A estabilidade do bioemulsificante também foi determinada utilizando-se outros óleos vegetais comestíveis (óleo de milho, girasol, soja, oliva, canola e

dendê), querosene e benzeno substituindo-se o óleo diesel na determinação da atividade emulsificante do item 4.7.3.1.

4.5- ESTABILIDADE DE OUTRAS EMULSÕES

Com o intuito de comparar a estabilidade da fase aquosa da fermentação com outros agentes de superfície ativa, utilizou-se soluções de alginato de sódio, pectina e caseína na concentração de 0,75% (p/v) e tween 80 na concentração de 0,75% (v/v). A estabilidade destas soluções foram determinadas conforme item 4.4, substituindo a fase aquosa pela solução do respectivo emulsificante.

4.6- ISOLAMENTO DO BIOEMULSIFICANTE

Utilizou-se uma adaptação do método descrito por CIRIGLIANO & CARMAN (1985): a cultura fermentada foi centrifugada Fanem a 3000 rpm por 30 min. O sobrenadante livre de óleo foi filtrado em papel de filtro Whattman nº 52. As células foram lavadas com água destilada a 85°C para extrair o bioemulsificante aderido a parede celular e centrifugado a 3000 rpm por 30 min. Misturou-se os sobrenadantes obtidos e concentrou-se sob vácuo de 640 mm Hg a temperatura de 70°C em rota-vapor. O concentrado foi extraído com uma solução de clorofórmio-metanol (2:1 v/v) num funil de separação na temperatura ambiente. O precipitado formado na fase aquosa foi coletado em papel de filtro Whatmann nº 42 e seco em dessecador. Em vários experimentos a fase aquosa concentrada em rota-vapor foi dialisada com membranas Inlab de peso molecular de corte de 12000 a 16000 Daltons, seguindo-se o mesmo procedimento de extração.

4.7- METODOLOGIA ANALÍTICA

4.7.1- DETERMINAÇÃO DO pH

O pH das amostras foram medidas diretamente em potenciômetro Analyser.

4.7.2- DETERMINAÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR E DA MASSA CELULAR SECA

Uma amostra da cultura contendo células de leveduras em fase aquosa e oleosa foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min. Foram obtidas três fases: no fundo do tubo, a levedura que estava na fase aquosa; depois uma fase aquosa livre de leveduras e por último uma fase contendo óleo mais levedura. A fase aquosa foi cuidadosamente extraída do tubo com o auxílio de uma pipeta automática. Ao creme de levedura mais a fase oleosa que permaneceram no fundo do tubo, foi adicionado uma mistura de etanol-butanol-clorofórmio (10:10:1 v/v/v) até completar o volume original do meio. Essa mistura foi novamente centrifugada a 6000 rpm por 10 min. O sobrenadante, contendo a mistura de solventes mais o óleo residual, foi descartado. As células, agora livres de óleo-diesel, foram então ressuspensas em água destilada até completar o volume original do meio. Diluiu-se a suspensão com água destilada na proporção 1:10 e determinou-se a densidade ótica a 610 nm.

Um volume conhecido de suspensão concentrada de levedura com densidade ótica conhecida, foi centrifugado e o creme de células obtido foi seco a vácuo de 640 mm Hg a 60°C por 24 h. Por diferença de peso do tubo

com e sem leveduras, calculou-se a massa seca, expressando-a em termos de concentração (g/l). Construiu-se uma curva padrão de densidade ótica versus massa seca (Figura B-19 do Apêndice B), que foi utilizada para as determinações posteriores de massa seca (SAMPAIO, 1995).

4.7.3- DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE EMULSIFICANTE

4.7.3.1- ATIVIDADE EMULSIFICANTE DO CALDO DE CULTURA (AE)

A fase aquosa obtida no ítem 4.7.2 foi novamente centrifugada a 6000 rpm por 10 min e filtrada a vácuo em papel de filtro "Whatman 52", visando evitar a presença de células e gotículas de óleo. Do filtrado resultante, retirou-se uma alíquota de 5 ml e então misturou-se 2% (0,1 ml) de óleo-diesel. Após agitação vigorosa, a emulsão resultante foi deixada em repouso por 10 min, tendo sua absorbância lida a 540 nm contra o branco (filtrado sem adição de óleo-diesel). Uma unidade de atividade emulsificante foi então definida como a quantidade de emulsificante extracelular que provocou uma absorbância de 1,0 a 540 nm (JOHSON *et al.*, 1992, CIRIGLIANO & CARMAN, 1984 e SAMPAIO, 1995).

4.7.3.2- ATIVIDADE EMULSIFICANTE DO BIOEMULSIFICANTE ADERIDO A PAREDE CELULAR (AE_{extração})

A massa de células obtida no ítem 4.7.2 foi resuspensa ao volume original com água destilada com temperatura entre 80-90°C com o intuito de extrair o bioemulsificante da parede celular e determinar a atividade emulsificante extraída do mesmo. A suspensão foi centrifugada a 6000 rpm por

10 min e a fase aquosa obtida sofreu o mesmo tratamento descrito no item 4.7.3.1 (SINGH et al., 1990).

4.7.4- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Lowry: 50 ml de solução A (2g de carbonato de sódio anidro com 0,02g de tartarato duplo de sódio e potássio em 100 ml de hidróxido de sódio 0,1N), foram adicionados a 1 ml de solução B (0,5g de sulfato de cobre com 2 gotas de ácido sulfúrico em 100 ml de água destilada), foram usadas para preparar o reagente colorimétrico. Uma amostra de 1 ml foi adicionada a 3ml de reagente (solução A com solução B) e agitada por 10 min. Adicionou-se 0,3 ml de Folin-Ciocalteu N/2 (normalidade do composto diluída à metade), esta mistura foi agitada e deixada em repouso por 30 min. A concentração de proteína foi obtida com o auxílio de uma curva padrão de absorbância a 750 nm versus concentração de albumina bovina padrão, apresentada na Figura B-20 do Apêndice B.

4.7.5- DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CARBOIDRATO

A concentração de carboidrato foi determinada pelo método da antrona citado por MORRIS (1948). Um tubo de ensaio contendo 1 ml de amostra, previamente diluída para conter carboidratos na faixa de 20 a 40 μ g, foi posto em banho de gelo. Adicionaram-se lentamente sob agitação 3 ml de solução de antrona (0,2% em ácido sulfúrico) deixando escorrer lentamente pelas paredes do tubo. Levou-se a mistura ao banho-maria a 80°C por 10 min. Determinou-se a absorbância a 620 nm contra um branco preparado nas mesmas condições, apenas substituindo a amostra por água destilada. A

concentração de carboidrato foi obtida com o auxílio de uma curva padrão de absorvância a 620 nm versus concentração de glicose mostrada na Figura B-21 do Apêndice B.

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- FERMENTAÇÃO

As determinações das melhores condições de fermentação para obtenção das mais altas atividades emulsificantes foram realizadas em erlenmeyers de 500 ml sob agitação de 200 rpm e com temperatura controlada no nível desejado.

Determinou-se a melhor atividade emulsificante em função da concentração ideal de NH_4Cl (1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 g/l), da percentagem de óleo-diesel (3, 5, 7, 10 e 15%), da temperatura (26, 28, 30, 32 e 34°C) e da adição de 14,3% (v/v) de óleo-diesel após 96h de fermentação.

5.1.1- EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE NITROGÊNIO NA FERMENTAÇÃO

Os resultados do efeito da concentração de NH_4Cl na fermentação de óleo-diesel comercial 5% (v/v) é mostrado nas Figuras 5.1 a 5.4, Figuras B-1 a B-5 do Apêndice B e Tabelas A-1 a A-4 do Apêndice A. Observou-se um comportamento não uniforme para os valores da atividade emulsificante do caldo (AE) e da atividade emulsificante extraída das células com água destilada a 80-90°C ($\text{AE}_{\text{extração}}$), determinadas conforme itens 4.7.3.1 e 4.7.3.2 respectivamente. Os altos valores de tais determinações são atribuídos, segundo SAMPAIO (1995), a passos metabólicos diferenciados onde co-oxidação e diauxia interagem havendo o consumo de frações menos

facilmente degradáveis que levam a menores atividades emulsificantes. Outro fator que pode alterar a atividade do bioemulsificante é o fato deste poder encontrar-se nas três fases físicas da fermentação: na fase aquosa, aderido a parede celular do microrganismo, preso as gotas de óleo na interface óleo-água e na fase oleosa. Esta dispersão do bioemulsificante leva aos picos obtidos nas Figuras 5.1 e 5.2. Tal afirmação é confirmada pelas leituras obtidas para a atividade emulsificante da extração e pelas conclusões do trabalho de SINGH *et al.* (1990). A parte lipofílica do bioemulsificante pode estar saturada de óleo, que o arrasta para a fase oleosa e interface óleo-água, impedindo sua detecção na fase oleosa pelo método utilizado.

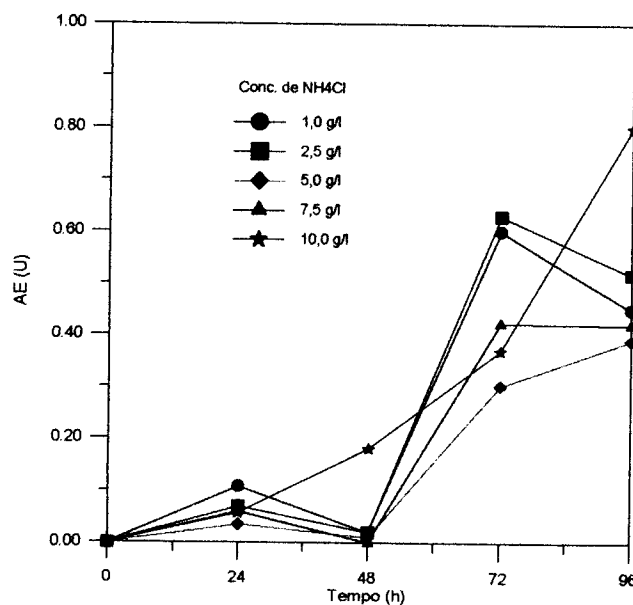


FIGURA 5.1: Efeito da concentração de NH₄Cl na atividade emulsificante (AE) de caldo de fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *S. lipolytica* CCT 0913.

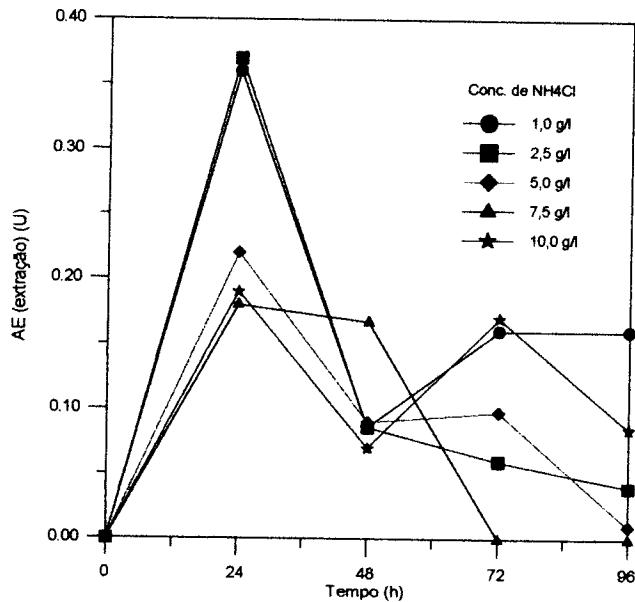


FIGURA 5.2: Efeito da concentração de NH_4Cl na atividade emulsificante extraída ($\text{AE}_{\text{extração}}$) de células de *S. lipolytica* CCT 0913 em meio contendo óleo-diesel comercial (5% v/v).

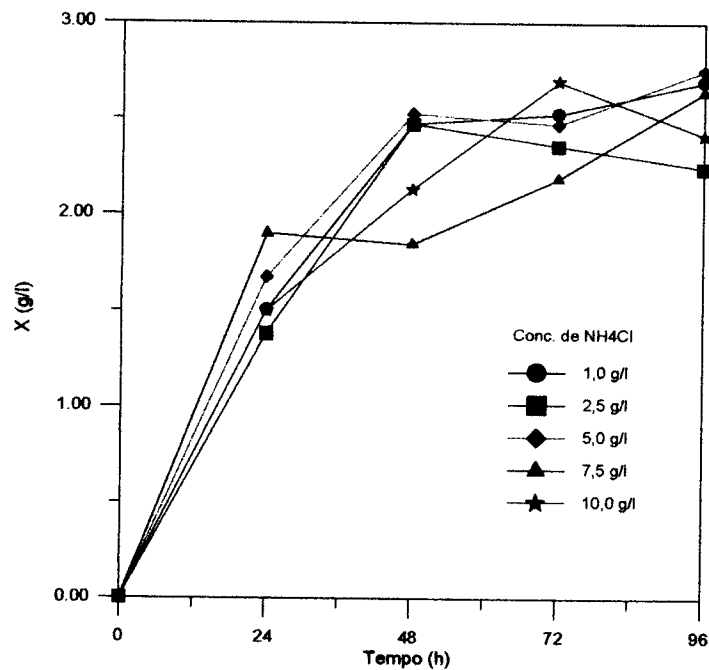


FIGURA 5.3: Efeito da concentração de NH_4Cl na massa celular seca (X) da fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *S. lipolytica* CCT 0913.

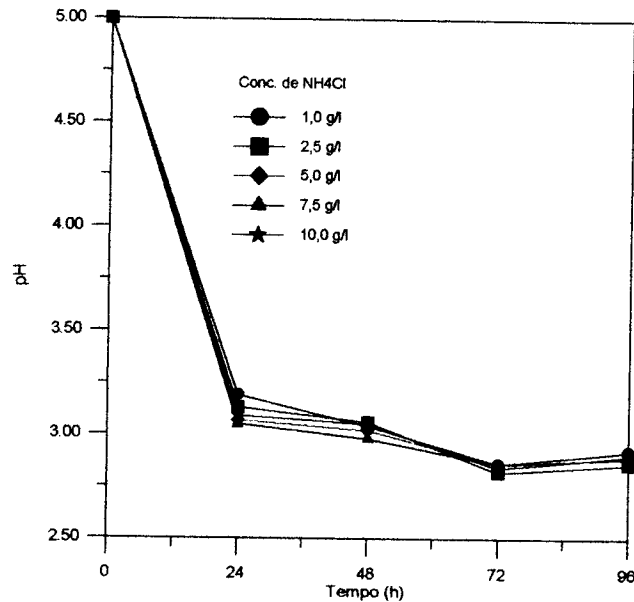


FIGURA 5.4: Efeito da concentração de NH_4Cl no pH da fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *S. lipolytica* CCT 0913.

Em todas as concentrações de NH_4Cl o tempo de fermentação de 48h foi crítico para a obtenção do bioemulsificante, pois levava aos menores valores de atividade emulsificante. Por outro lado, as maiores atividades foram encontradas a 96h para as concentrações 5,0 e 10,0 g/l de NH_4Cl com valor de 0,80 e 0,39 U respectivamente. Já com concentrações de 1,0; 2,5 e 7,5 g/l os máximos valores de atividade emulsificante foram encontrados em 72h de fermentação, com valores de 0,60; 0,63 e 0,42 U respectivamente.

A concentração de NH_4Cl influencia a atividade emulsificante na fase aquosa. Na concentração de NH_4Cl de 10 g/l, aumentando o tempo de fermentação de 24 para 96h, houve um aumento de atividade de 0,057 U para 0,8 U, como observado por DESAI & PALEJWALA (1989) que também relacionou o aumento da atividade emulsificante com a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Nas atividades emulsificantes extraídas (Figura 5.2) o máximo valor foi sempre obtido nas primeiras 24h de fermentação, sendo na concentração de 2,5 g/l NH_4Cl encontrado o ponto ótimo igual a 0,37 U. Esses valores de atividade emulsificante extraída apresentaram-se maiores que a atividade emulsificante na fase aquosa (Figura 5.1) no tempo de 24h.

A concentração de massa seca aumentou com o decorrer da fermentação, chegando a um valor de 2,75 g/l com concentração de 5,0 g/l de NH_4Cl a 96h de fermentação. Observa-se pela Figura 5.3 que a partir das primeiras 24h o microrganismo teve sua velocidade de crescimento diminuída, entrando na fase de crescimento estacionário a partir de 48h, com exceção dos experimentos com 7,5 e 10 g/l de NH_4Cl . A partir deste ponto ocorre a fase estacionária e a efetiva detecção de bioemulsificante na fase aquosa, o que está de acordo com HOMMEL *et al.* (1987), observaram que a produção de bioemulsificante ocorreu durante a última parte da fase exponencial e durante a fase estacionária de crescimento celular.

O pH foi reduzido abruptamente nas primeiras 24h (Figura 5.4), onde o crescimento celular encontrava-se na fase exponencial e ocorria a maior atividade emulsificante extraída. Após este tempo sua redução foi menos acentuada e o pH final para todas as concentrações de NH_4Cl apresentaram valores próximos a 2,89, demonstrando que não houve efeito da concentração de NH_4Cl no pH na faixa de concentração estudada.

A concentração de 2,5 g/l de NH_4Cl foi escolhida para realizar outros experimentos, pois necessitava de um tempo menor para que a fermentação se processasse e por ter-se obtido um alto valor para a atividade emulsificante (0,63 U) e o máximo valor para a atividade emulsificante de extração (0,37 U).

5.1.2- EFEITO DA PERCENTAGEM DE SUBSTRATO NA FERMENTAÇÃO

As Figuras 5.5 a 5.8 e as Tabelas A-5 a A-8 do Apêndice A e Figuras B-6 a B-10 do Apêndice B mostram o efeito da percentagem de substrato (óleo-diesel) na produção de bioemulsificante, massa celular seca e pH do meio por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

Em todas as percentagens de substrato o tempo de 48h, como no efeito da concentração de NH_4Cl , foi crítico para a obtenção de bioemulsificante, isto é, após este tempo os valores da atividade emulsificante aumentaram, exceto para a percentagem de 15% (v/v) de óleo-diesel, cuja fase aquosa não provocou emulsão, denotando uma inibição do microrganismo pelo substrato. Para o valor de 3% (v/v) de óleo-diesel a atividade emulsificante aumentou gradualmente até 96h, atingindo valor máximo de 0,75 U (Figura 5.5). Para outras percentagens de óleo, o máximo também ocorreu a 96h. CIRIGLIANO & CARMAN (1984) não encontraram variação da atividade emulsificante quando trabalharam com concentrações de n-hexadecano entre 1 a 5% (v/v) no meio de fermentação usando *Candida lipolytica*, SAMPAIO (1995) verificou maior atividade emulsificante a 5% (v/v) de óleo-diesel, já DESAI & PALEJWALA (1989) produziram bioemulsificante extracelular a partir de etanol com maior atividade na concentração de 3% (v/v).

A atividade emulsificante extraída utilizando percentagens altas de óleo-diesel (7, 10 e 15%), renderam valores máximos nas primeiras 24h (Figura 5.6), de forma semelhante aos experimentos onde variou-se a concentração de NH_4Cl . Para baixas concentrações de óleo-diesel (3 e 5%) os valores de atividade aumentaram, sendo o maior igual a 0,59 U para 3%. Com 3% de óleo observa-se claramente uma fase exponencial até 48h, seguida de uma fase estacionária (Figura 5.7). Com outras percentagens de óleo tais fases não ficaram claras devido talvez ao consumo diferenciado de substrato. Inicialmente ocorre o consumo das frações lineares seguido do consumo de

frações mais complexas. Os maiores valores de concentrações de massa celular seca ocorreram a 72h para todas as percentagens de óleo, sendo o maior valor encontrado para 15% de óleo (3,49 g/l).

A Figura 5.8 mostra que o pH caiu abruptamente nas primeiras 24h e nas concentrações de 7, 10 e 15% de óleo caiu moderadamente até o final das fermentações. Entretanto nas concentrações baixas (3 e 5%) ocorreu um leve aumento do pH após 48h. Ao final das 96h de fermentação verificou-se que os maiores valores de pH ocorreram para as menores percentagens de substrato.

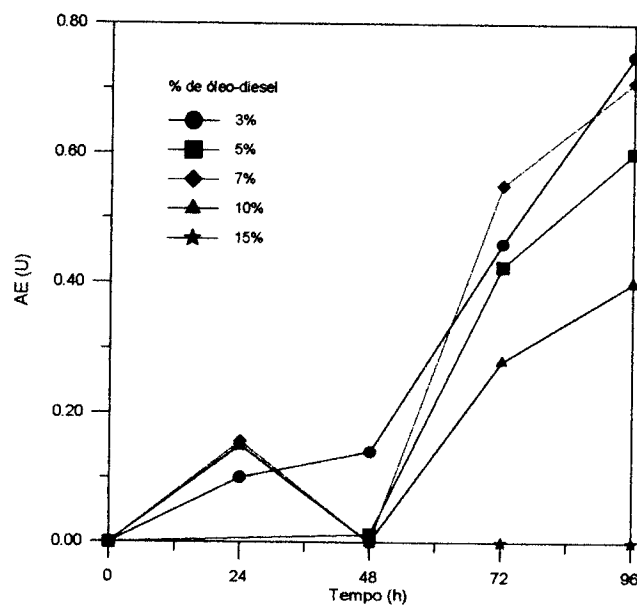


FIGURA 5.5: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial na atividade emulsificante (AE) da fase aquosa de fermentação por *S. lipolytica* CCT 0913 com 5 g/l de NH_4Cl .

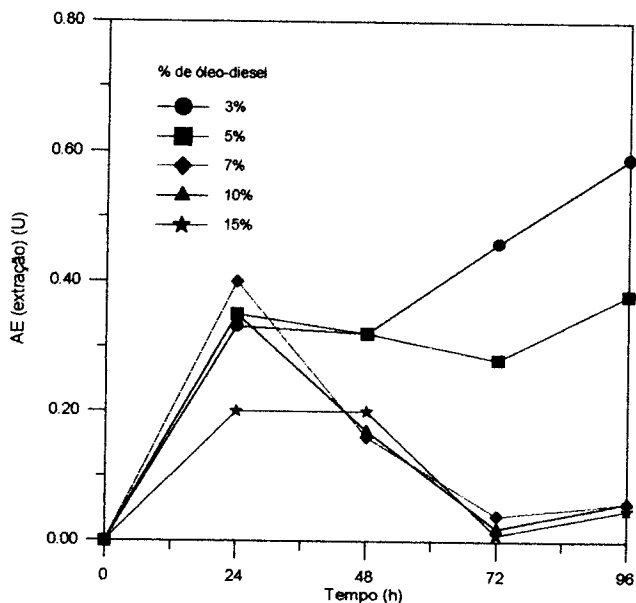


FIGURA 5.6: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial na atividade emulsificante extraída ($AE_{\text{extração}}$) de células de *S. lipolytica* CCT 0913 em fermentação com 5 g/l de NH_4Cl .

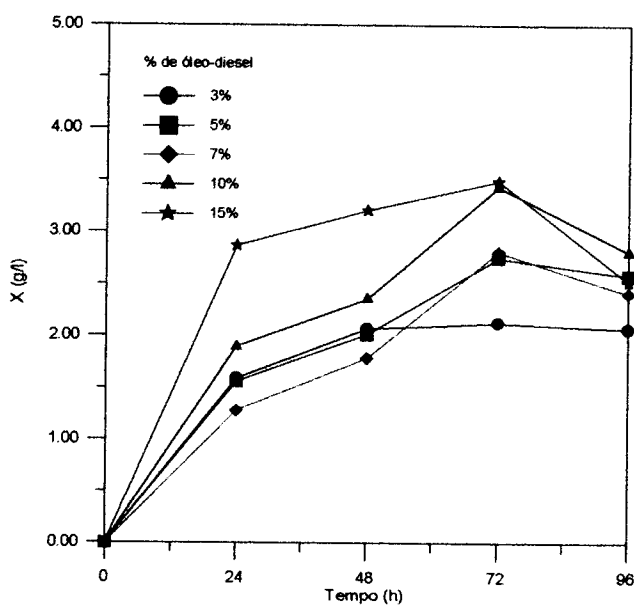


FIGURA 5.7: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial na concentração de massa celular seca (X), fermentado por *S. lipolytica* CCT 0913 com 5 g/l de NH_4Cl .

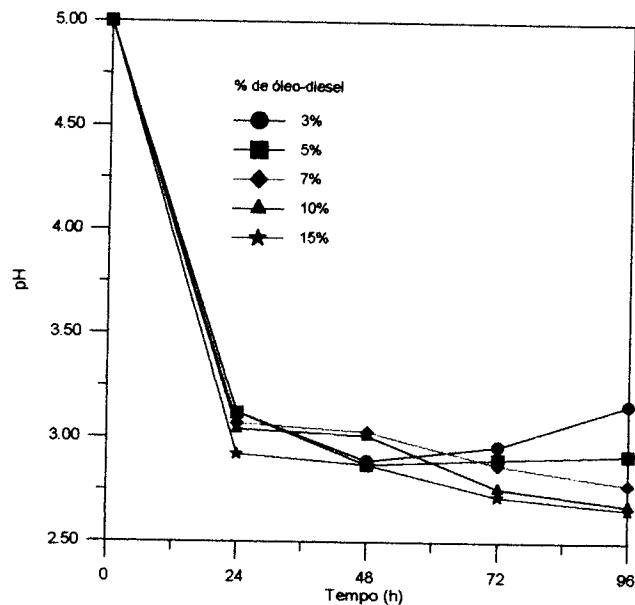


FIGURA 5.8: Efeito da porcentagem de óleo-diesel comercial no pH de fermentação por *S. lipolytica* CCT 0913 com 5 g/l de NH_4Cl .

Em todos os experimentos (Figuras B-6 a B-10 do Apêndice B) verificou-se que a atividade emulsificante extraída foi maior que a atividade emulsificante da fase aquosa, exceto para a porcentagem de 15% de óleo. Porém verificou-se que a porcentagem de óleo que levou ao melhor valor da atividade emulsificante (Figura 5.5) e conseqüentemente a produção de bioemulsificante foi 3% (v/v), já que a atividade emulsificante é uma medida indireta de concentração de bioemulsificante.

5.1.3- EFEITO DA TEMPERATURA NA FERMENTAÇÃO

Utilizando-se meio com 2,5 g/l de NH_4Cl e 7% de óleo-diesel, estudou-se o efeito da temperatura na fermentação cujos resultados estão apresentados nas Figuras 5.9 a 5.13 e Tabelas A-9 a A-13 do Apêndice A. A atividade emulsificante apresentou maior valor na temperatura de 34°C e 72h

de fermentação. Os valores obtidos a 30°C foram os mais baixos; praticamente não houve formação de emulsão com a fase aquosa desta fermentação, já as maiores atividades foram conseguidas a 32 e 34°C. Grandes oscilações nas determinações da atividade emulsificante foram verificadas na fase aquosa da fermentação a 28°C, o que denota haver uma saturação do bioemulsificante por óleo-diesel antes da determinação da atividade. PROKOP & ERICKSON (1972), trabalhando com *Candida lipolytica* e óleo cru como substrato, consideraram como temperatura ótima 32°C.

Na atividade emulsificante extraída obteve-se valores altos quando comparados com a atividade da fase aquosa, atingindo o valor de 1,35 U a 32°C e 24h de fermentação. Nas temperaturas mais baixas (26 e 28°C) o ponto máximo de atividade emulsificante extraída ocorreu a 144h, já nas altas (30, 32 e 34°C) o máximo encontrava-se nas primeiras 48h.

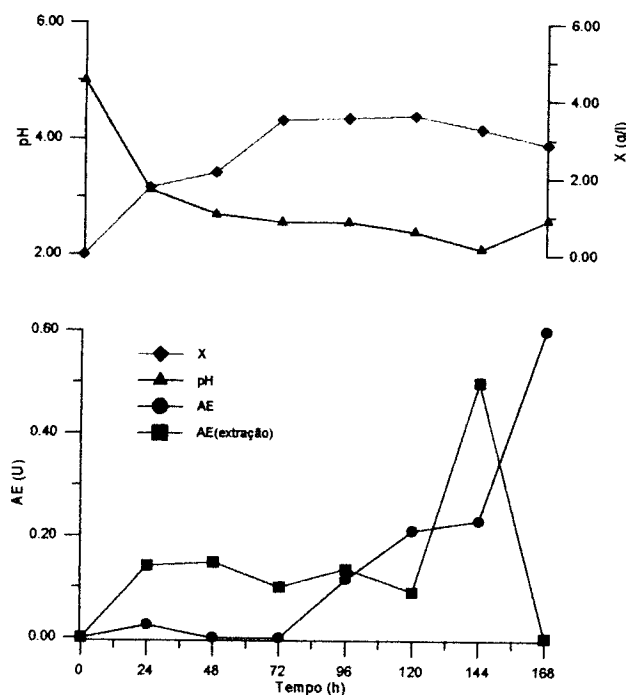


FIGURA 5.9: Fermentação de óleo-diesel comercial 7% (v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da temperatura de 26°C.

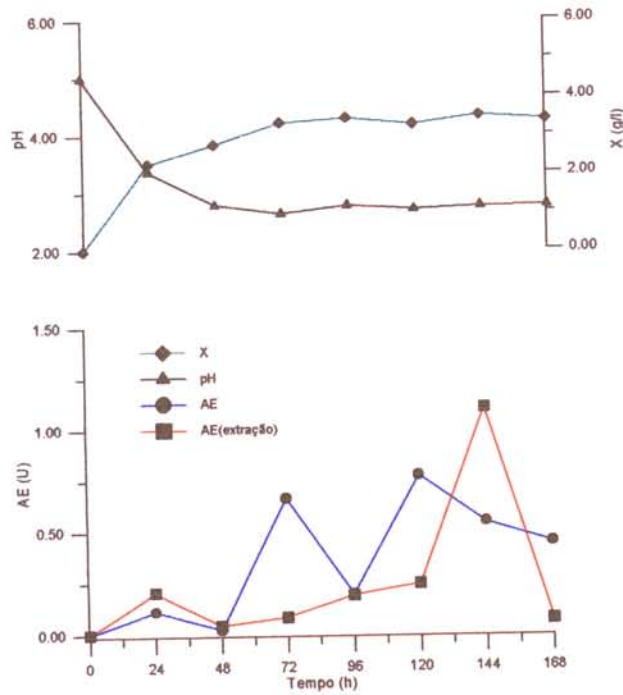


FIGURA 5.10: Fermentação de óleo-diesel comercial 7% (v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da temperatura de 28°C.

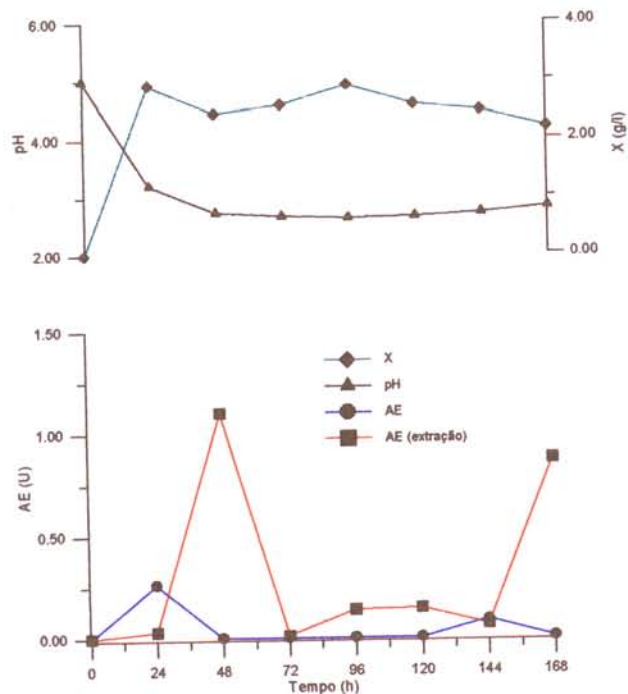


FIGURA 5.11: Fermentação de óleo-diesel comercial 7% (v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da temperatura de 30°C.

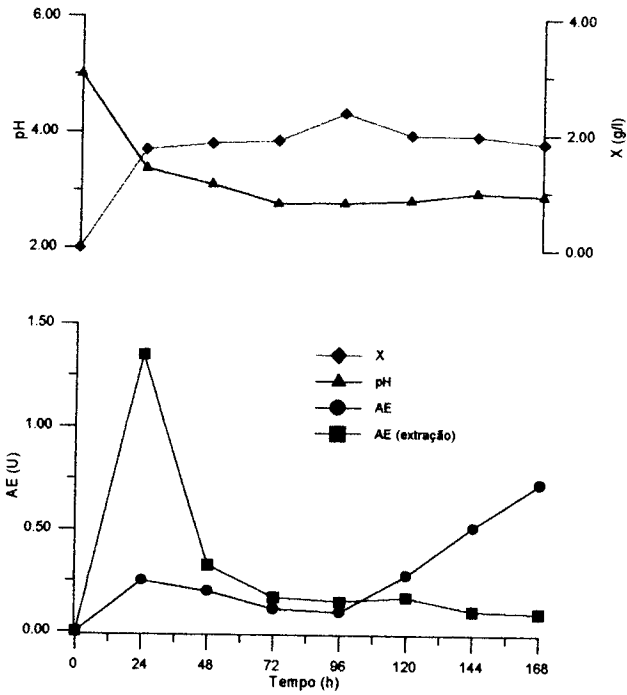


FIGURA 5.12: Fermentação de óleo-diesel comercial 7% (v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da temperatura de 32°C.

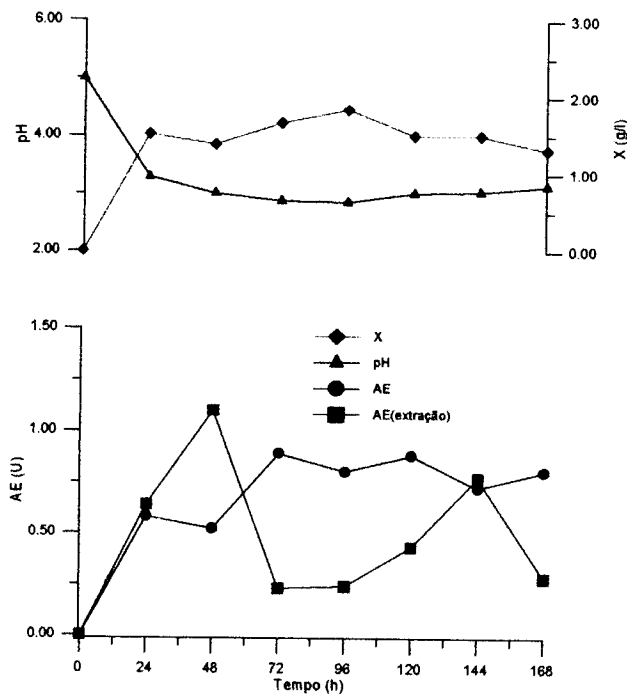


FIGURA 5.13: Fermentação de óleo-diesel comercial 7% (v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da temperatura de 34°C.

A fase estacionária iniciava-se mais rapidamente com o aumento da temperatura, o que está de acordo com PROKOP & ERICKSON (1972) que verificaram o aumento da taxa de crescimento máximo, crescimento linear e produtividade do bioemulsificante com o aumento da temperatura na faixa de 23 a 32°C e uma diminuição rápida a partir de 34°C. A 26 e 28°C a fase estacionária iniciava-se a 72h, a 30°C a 48h e a 32 e 34°C a 24h de fermentação. Observa-se também que quanto maior a temperatura menor o valor de concentração máxima de massa celular seca. Estes máximos ocorreram entre 96 e 120h, sendo o melhor resultado encontrado a 26°C e 120h (3,60 g/l) e o menor a 34°C e 96h (1,84 g/l).

De igual forma aos experimentos anteriores, observou-se queda abrupta no pH nas primeiras 24h. Ao final da fermentação quanto maior a temperatura maior o pH.

A máxima atividade emulsificante extraída foi sempre maior que a atividade emulsificante da fase aquosa, exceto a 26°C, o que pode ser observado na Tabela 5.1. Observando-se todos estes experimentos verifica-se que a maior produção de bioemulsificante ocorreu nas temperaturas de 32 e 34°C.

5.1.4- EFEITO DA ADIÇÃO DE SUBSTRATO

Para o meio contendo 2,5 g/l de NH₄Cl e 7% (v/v) de óleo-diesel, foram realizadas fermentações nas mesmas temperaturas do ítem 5.1.3, nas quais adicionou-se 14,3% v/v (10 ml) de óleo-diesel comercial, após 96h de

fermentação, cujos resultados podem ser vistos nas Figuras 5.14 a 5.18 e nas Tabelas A-14 a A-18 do Apêndice A. Passadas as 96h verificou-se uma queda dos valores da atividade emulsificante, exceto nas temperaturas de 30 e 32°C (Figuras 5.16 e 5.17). Os maiores valores de atividade ocorreram antes da adição de substrato, a 34°C a atividade foi 0,89 U em 96h (Figura 5.18), a 30°C o melhor valor foi 0,42 U obtido após a adição do óleo (168h).

Após a adição do substrato houve uma redução da concentração de células que voltou a subir após novo crescimento exponencial até atingir um máximo em 168h de fermentação. Observou-se que quanto maior a temperatura menor a concentração de massa celular seca; a 26°C obteve-se 5,02 g/l ao passo que a 34°C obteve-se 2,36 g/l (Tabela 5.1).

O pH final sofreu um leve aumento quando adicionou-se substrato, mas voltou a diminuir, comportamento que não foi verificado na temperatura de 34°C. A adição de óleo não se mostra eficiente na produção de bioemulsificante, exceto a 32°C. Os valores máximos da atividade emulsificante são sempre maiores sem adição de óleo, porém a concentração de massa seca foi maior nos experimentos com adição de substrato, mostrando que adicionar substrato à fermentação deve ser considerada quando o objetivo for obter massa celular. Estas comparações são verificadas na Tabela 5.1.

Nos experimentos com e sem adição de substrato a atividade emulsificante extraída foi maior que a da fase aquosa, exceto na temperatura de 26°C.

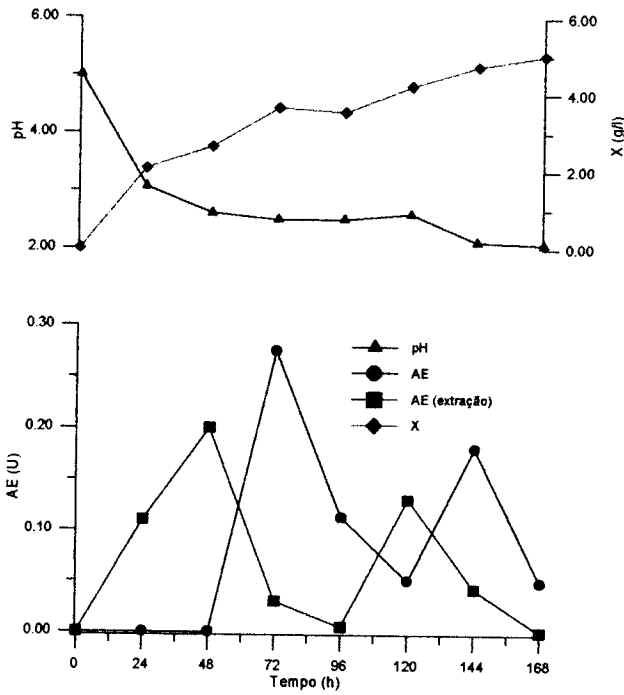


FIGURA 5.14: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da adição de óleo diesel na temperatura de 26°C após 96h.

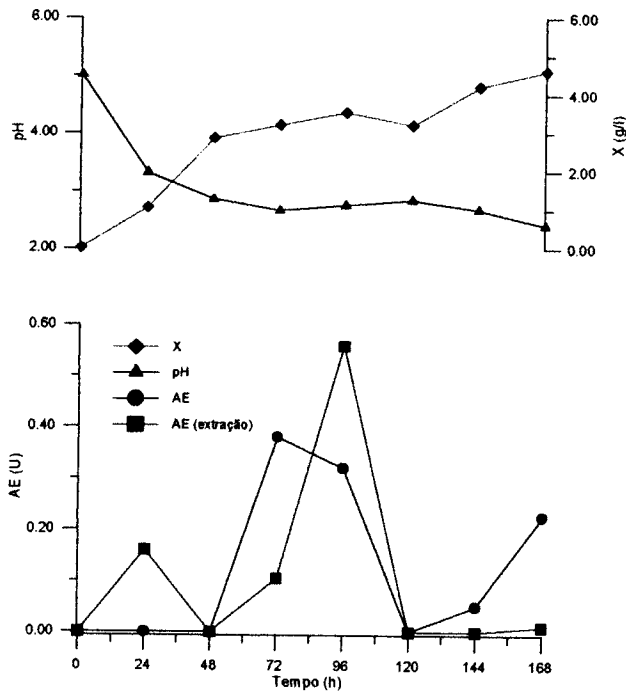


FIGURA 5.15: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da adição de óleo diesel na temperatura de 28°C após 96h.

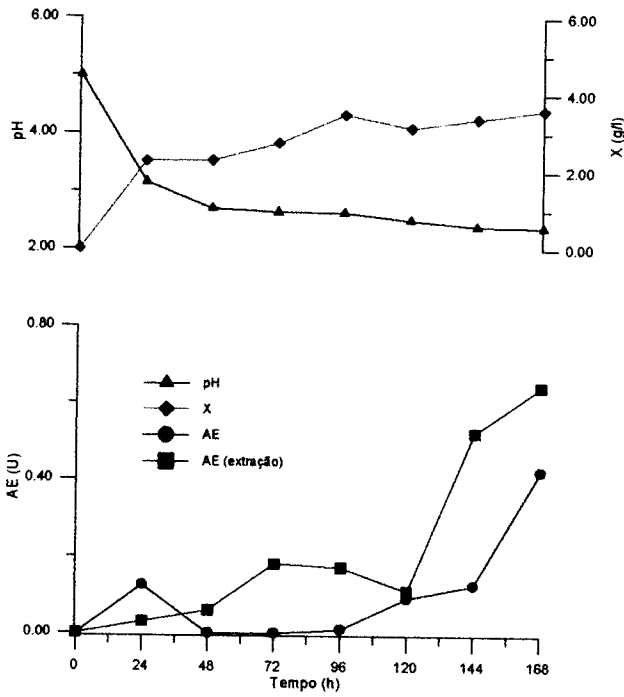


FIGURA 5.16: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da adição de óleo diesel na temperatura de 30°C após 96h.

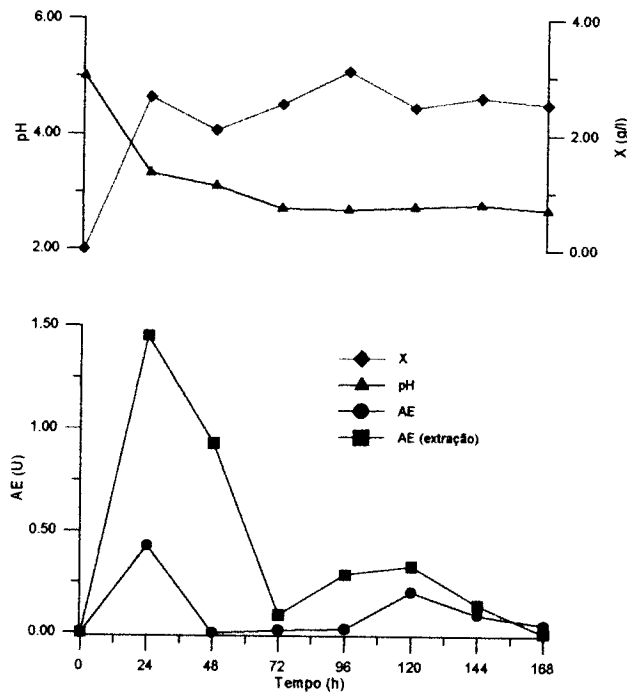


FIGURA 5.17: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da adição de óleo diesel na temperatura de 32°C após 96h.

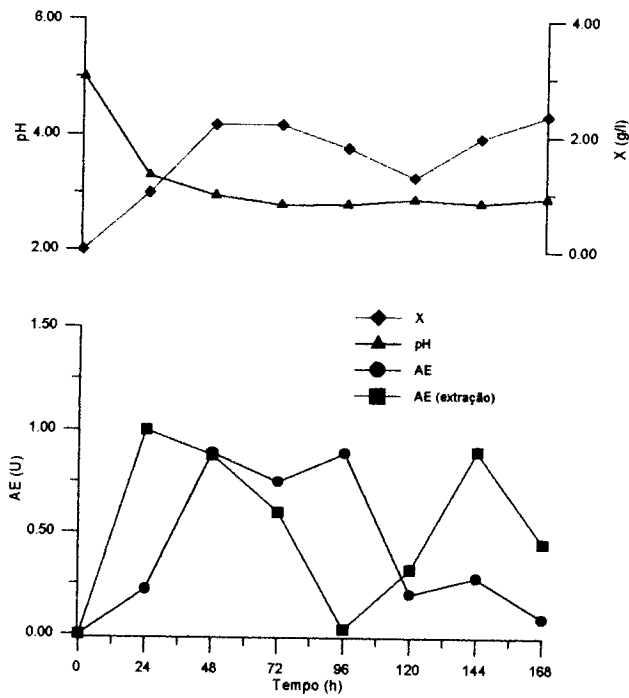


FIGURA 5.18: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, com 2,5 g/l de NH_4Cl . Efeito da adição de óleo diesel na temperatura de 34°C após 96h.

TABELA 5.1: Concentração de massa celular seca, pH e atividade emulsificante de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 cultivada em meio contendo 7% (v/v) de óleo-diesel comercial e 2,5 g/l de NH_4Cl .

Medidas	Sem adição de substrato					Com adição de substrato(*)				
	26°C	28°C	30°C	32°C	34°C	26°C	28°C	30°C	32°C	34°C
pH final	2,60	2,75	2,81	2,93	3,13	2,07	2,42	2,37	2,69	2,92
AE (U)	0,60	0,77	0,26	0,73	0,89	0,27	0,38	0,42	0,47	0,89
AE _(extração) (U)	0,50	1,10	1,10	1,35	1,10	0,20	0,56	0,64	0,93	1,00
X (g/l)	3,60	3,49	2,92	2,35	1,84	5,02	4,62	3,60	2,64	2,35

* Adição de óleo após 96h de fermentação. Maiores valores encontrados

5.2- ESTABILIDADE DA EMULSÃO

Paralelamente aos experimentos do item anterior (5.1), foram feitos experimentos de estabilidade de emulsões utilizando fase aquosa e fermentação realizada a 32°C, pH inicial 5,0, concentração de 5,0 g/l de NH₄Cl e 5% (v/v) de óleo-diesel.

5.2.1- EFEITO DO pH E TEMPERATURA NA ESTABILIDADE DAS EMULSÕES

As Figuras 5.19a a 5.22b (Tabelas A-19 a A-26 do Apêndice A), mostram a variação da atividade emulsificante na faixa de pH entre 2 a 10 e temperatura de 30 a 60°C. Da linearização destas curvas, conforme equação 4.2, foram obtidas as respectivas estabilidades emulsificantes (Figuras B-11a a B-14b do Apêndice B) conforme equação 4.3 e estão representadas nas Figuras 5.23 a 5.26.

Na maioria dos experimentos a atividade emulsificante nos primeiros 10 min foi maior quando comparada com a atividade obtida sem a correção de pH e à temperatura ambiente (0,35 U). Porém, foi na temperatura de 50°C que ocorreu as menores diminuições da atividade emulsificante e o maior valor foi obtido a pH 7 e temperatura de 40°C (0,80 U).

Nos pH alcalinos (9 a 10) observou-se a formação de um precipitado que interferiu na determinação das atividades emulsificantes, e conseqüentemente na obtenção dos valores de estabilidade. Igual formação de precipitado foi observada por ROSENBERG *et al.* (1979a) e por COOPER

et al. (1988), que verificaram a insolubilidade do agente emulsificante a pH 9 e a não emulsificação do óleo devido a este fato. Em pH 8, a influência da alcalinidade já era observada, pois neste pH observou-se pequenas alterações no aspecto da fase aquosa.

Os melhores valores para a estabilidade são expressos na Tabela 5.2 e Figuras 5.23 a 5.26. O maior valor encontrado para a estabilidade foi 183,72 min para pH 3 a 60°C, seguido do valor a pH 6 e temperatura de 60°C (137,48 min). COOPER *et al.* (1988) trabalhando com duas espécies de *Bacillus* obtiveram o maior índice de emulsão entre pH 4 e 8.

TABELA 5.2: Valores máximos para a estabilidade da emulsão de óleo-diesel em água, estabilizada por fase aquosa de cultura de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

Temperatura (°C)	pH	ES (min)
30	6	70,068
40	7	79,293
50	6	78,978
60	3	183.718

A aplicabilidade da fase aquosa que contém o bioemulsificante, como agente de superfície ativa, é o fator principal para a escolha do pH e temperatura, que levam à melhor estabilidade.

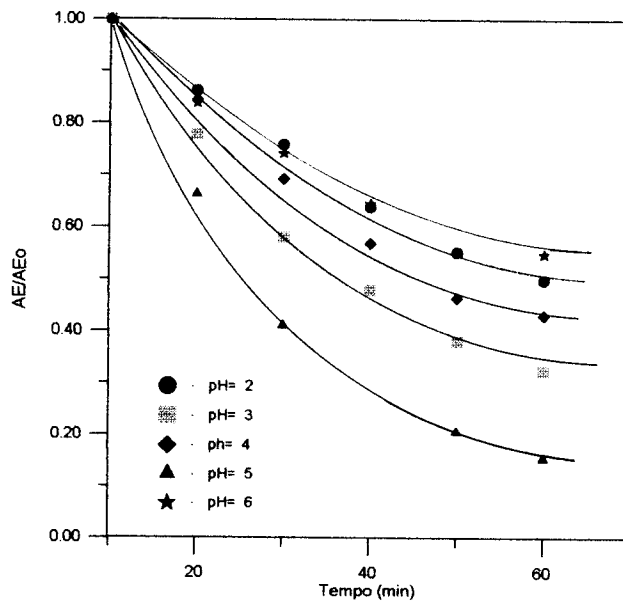


FIGURA 5.19a: Variação da atividade emulsificante, a 30°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

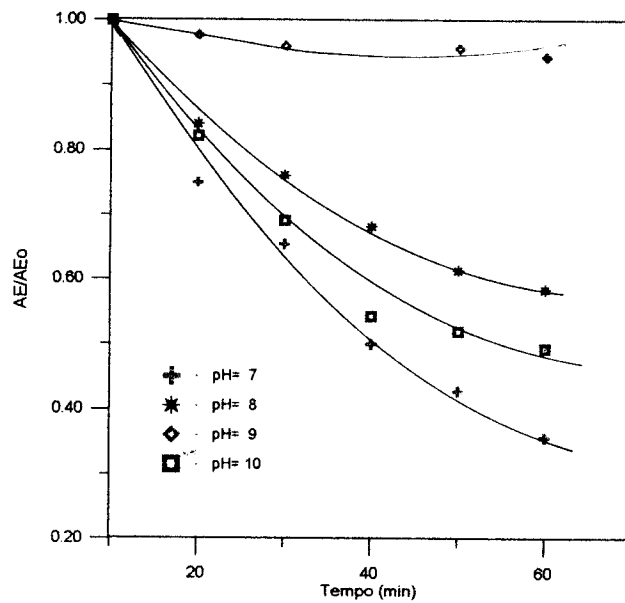


FIGURA 5.19b: Variação da atividade emulsificante, a 30°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

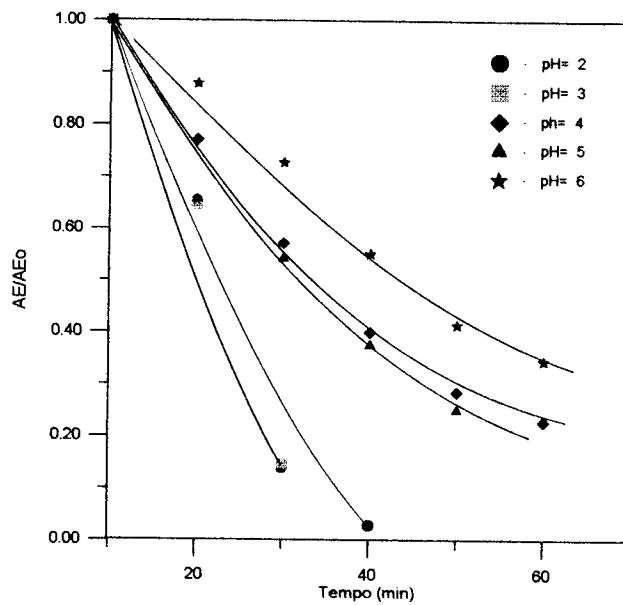


FIGURA 5.20a: Variação da atividade emulsificante, a 40°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

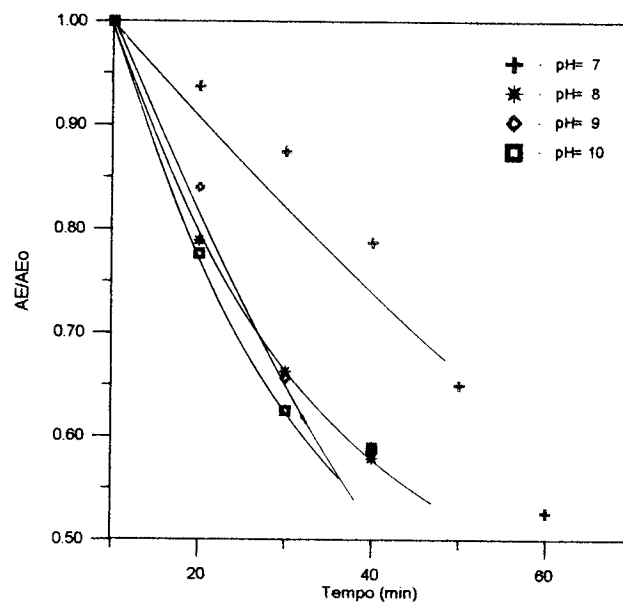


FIGURA 5. 20b: Variação da atividade emulsificante, a 40°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

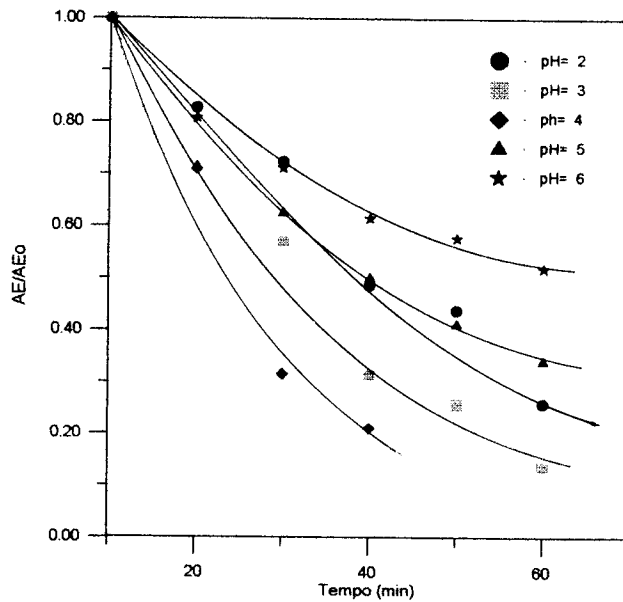


FIGURA 5.21a: Variação da atividade emulsificante, a 50°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

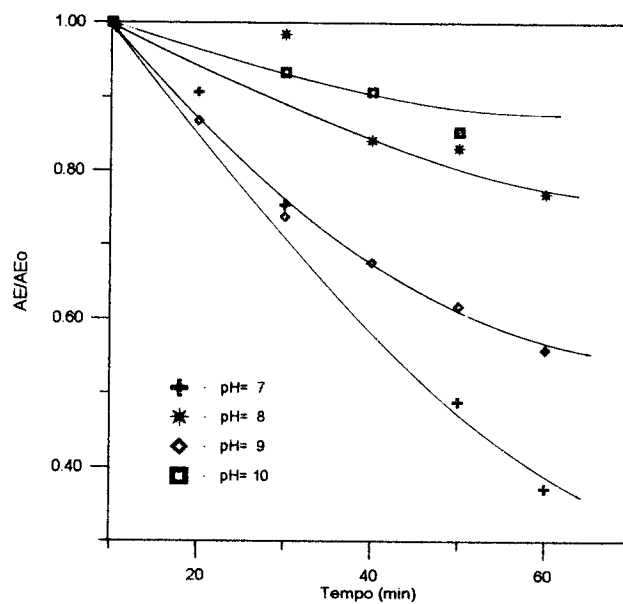


FIGURA 5.21b: Variação da atividade emulsificante, a 50°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

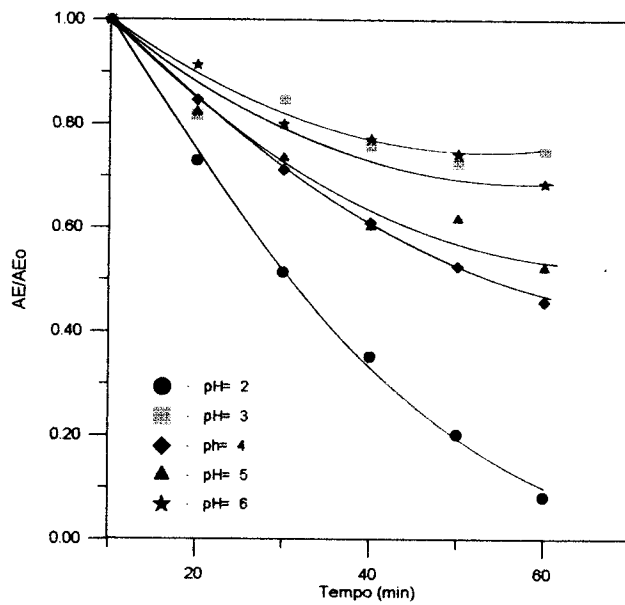


FIGURA 5.22a: Variação da atividade emulsificante, a 60°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

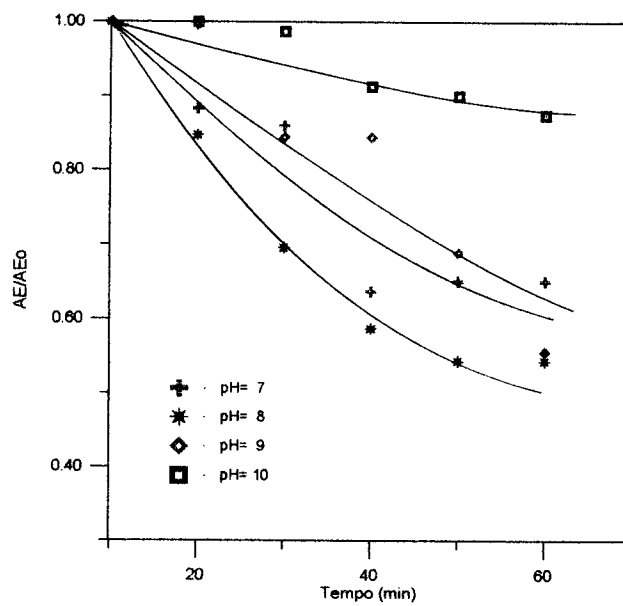


FIGURA 5.22b: Variação da atividade emulsificante, a 60°C, da fase aquosa da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

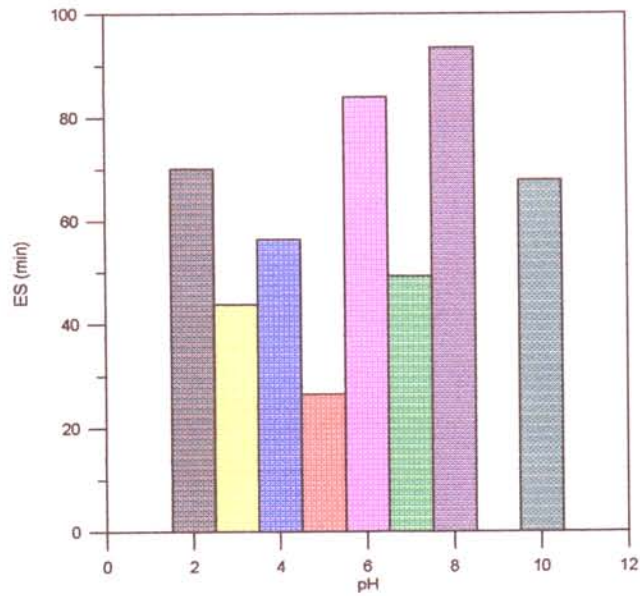


FIGURA 5.23: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel comercial estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, a 30°C.

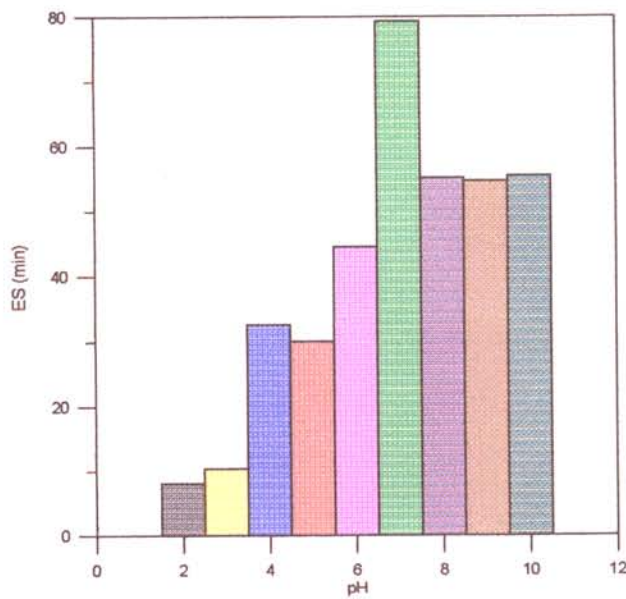


FIGURA 5.24: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel comercial estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, a 40°C.

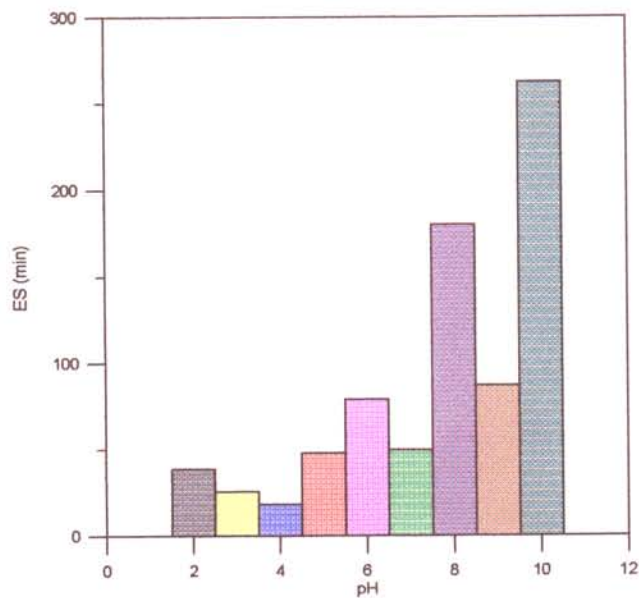


FIGURA 5.25: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel comercial estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, a 50°C.

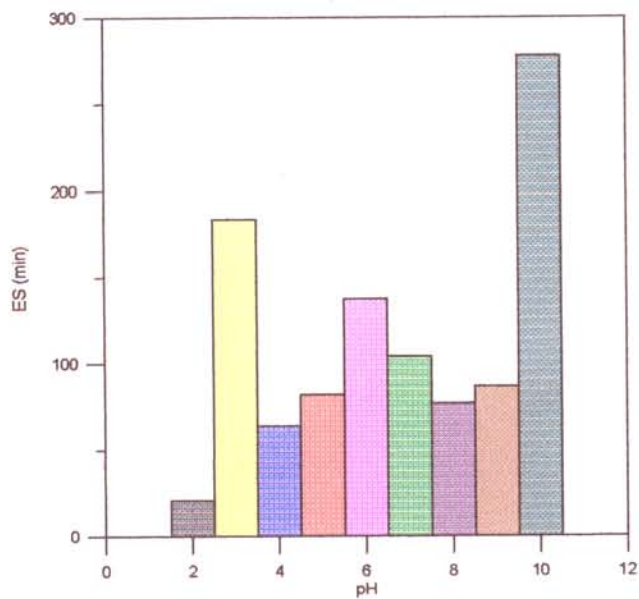


FIGURA 5.26: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel comercial estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, a 60°C.

5.2.2- COMPARAÇÃO DA ESTABILIDADE EMULSIFICANTE DE FASE AQUOSA DE CULTURA DE *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913

5.2.2.1- COMPARAÇÃO COM OUTROS EMULSIFICANTES

As condições de pH 6 e temperatura de 50°C e pH 7 e temperatura de 60°C, conforme resultados apresentados nas Figuras 5.27 a 5.34, Figuras B-15 e B-16 do Apêndice B e Tabelas A-27 a A-30 do Apêndice A, foram utilizados para efeito de comparação com outros emulsificantes comerciais (alginato, caseína e pectina a 0,75% (p/v) e tween 80 a 0,75% (v/v) na emulsão de óleo-diesel em água (item 4.5).

Todos os emulsificantes, nas condições de pH e temperatura acima, apresentaram atividades maiores quando comparados com a atividade obtida da fase aquosa de fermentação sem correção de pH à temperatura ambiente em 10 min (0,35; Tabelas A-27 e A-29). A fase aquosa apresentou a maior variação de atividade emulsificante relativa durante 60 min, seguida da caseína (Figuras 5.27 e 5.28).

O k_D foi determinado pelo coeficiente angular da reta do gráfico $\log AE/AE_0 \times \text{tempo}$, mostrados nas Figuras B-15 e B-16 do Apêndice B. A estabilidade emulsificante sofreu um decréscimo quando passou-se de pH 6 e 50°C para pH 7 e 60°C, porém a estabilidade da emulsão com pectina e tween 80 aumentaram (176,18 e 108,49 min respectivamente). Os maiores valores foram encontrados para alginato (181,50 min) a pH 6 e 50°C, o que pode ser verificado nas Figuras 5.29 e 5.30 (Tabelas A-27 e A-29).

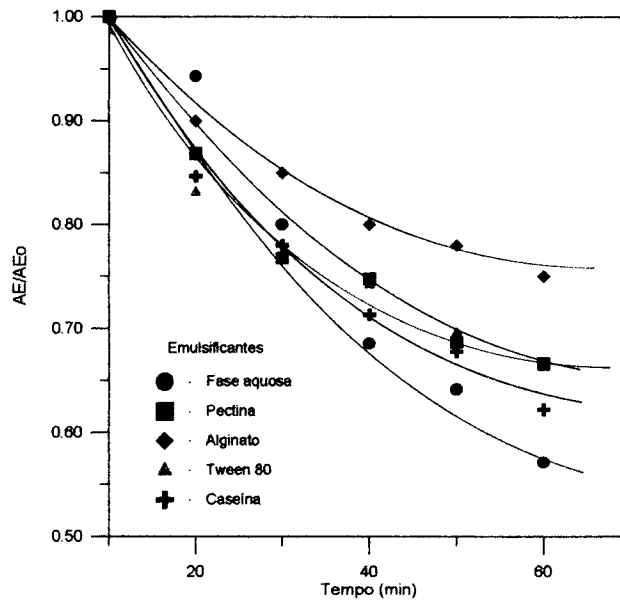


FIGURA 5.27: Variação da atividade emulsificante, em pH 6 e 50°C, da emulsão de óleo-diesel em água estabilizada por emulsificantes.

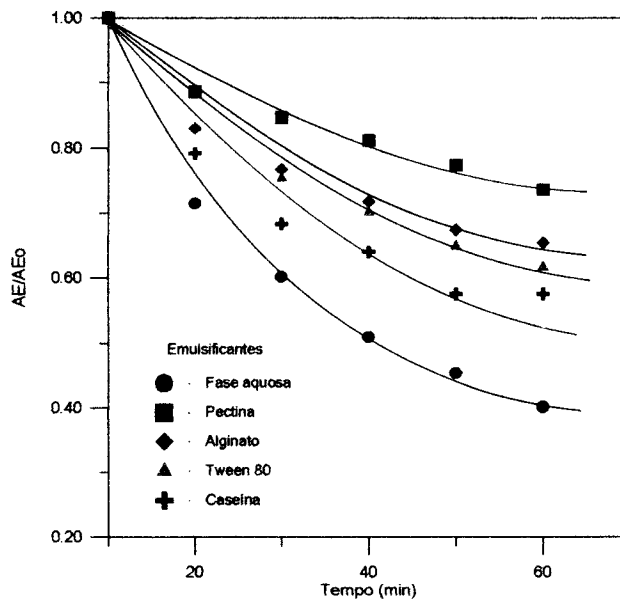


FIGURA 5.28: Variação da atividade emulsificante, em pH 7 e 60°C, da emulsão de óleo-diesel em água estabilizada por emulsificantes.

CIRIGLIANO & CARMAN (1995) encontraram valores altos de atividade emulsificante para caragenina (1,75 U) e Tween 80 (1,60 U); já a melhor estabilidade foi encontrada para tween 80, com k_d igual a $-2,1 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (476,19 min).

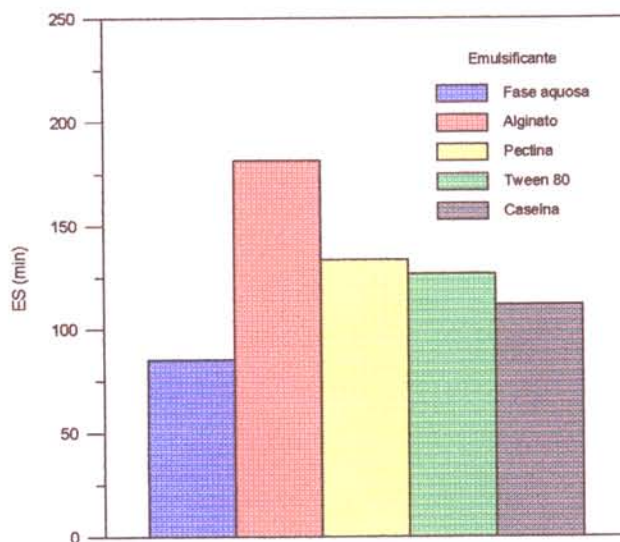


FIGURA 5.29: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel comercial estabilizada por emulsificantes em pH 6 e a 50°C.

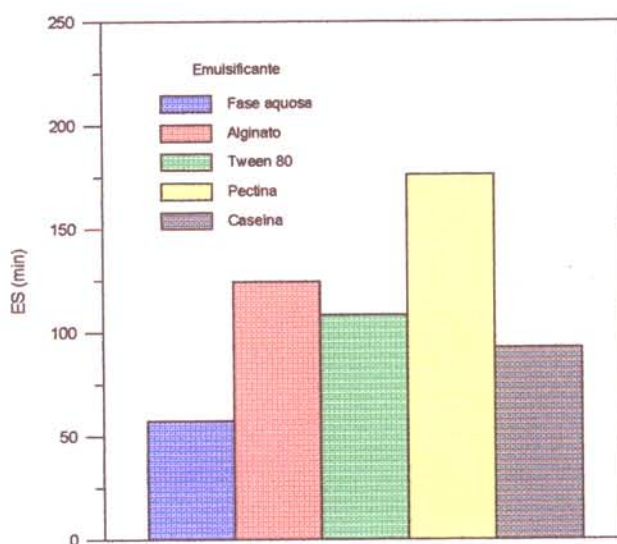


FIGURA 5.30: Estabilidade de emulsão de óleo -diesel comercial estabilizada por emulsificantes em pH 7 e a 60°C.

5.2.2.2- COMPARAÇÃO DE DIFERENTES EMULSÕES EM ÁGUA, ESTABILIZADA POR FASE AQUOSA DE CULTURAS DE *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913

A estabilidade emulsificante de vários óleos, benzeno e querosene em água estabilizadas por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, foram determinadas conforme item 4.4 (equação 4.3), substituindo o óleo-diesel por óleos vegetais (óleo de milho, girassol, soja, dendê e canola), benzeno e querosene, cujos resultados estão mostrados nas Figuras 31a a 34 (Figuras B-17a a B-18b do Apêndice B e Tabelas A-31 a A-34 do Apêndice A).

A atividade emulsificante de óleos vegetais em fase aquosa foi maior que a atividade emulsificante obtida com óleo-diesel (0,35 U) sem correção de pH e à temperatura ambiente. A excessão é feita para óleo de canola a pH 6 e 50°C (Figuras 31a e 32b). O k_D foi estimado utilizando-se as Figuras B-17a a A-18b do Apêndice B.

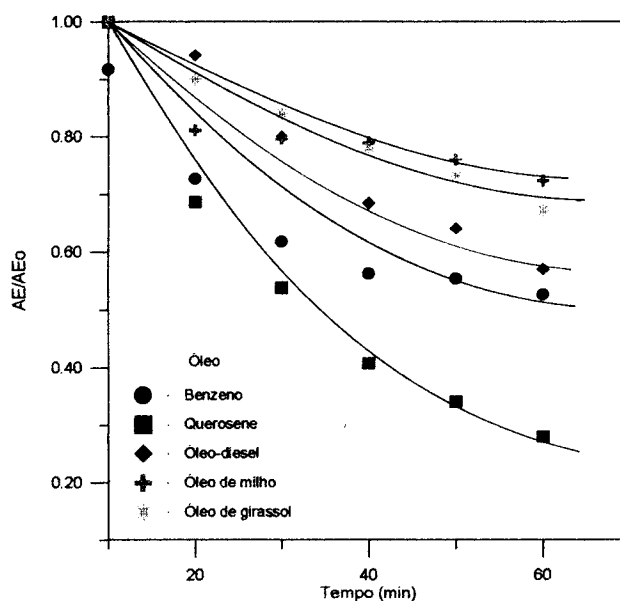


FIGURA 5.31a: Variação da atividade emulsificante, em pH 6 e 50°C, das emulsões de óleos, benzeno e querosene em água estabilizada pela fase aquosa da fermentação de culturas de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

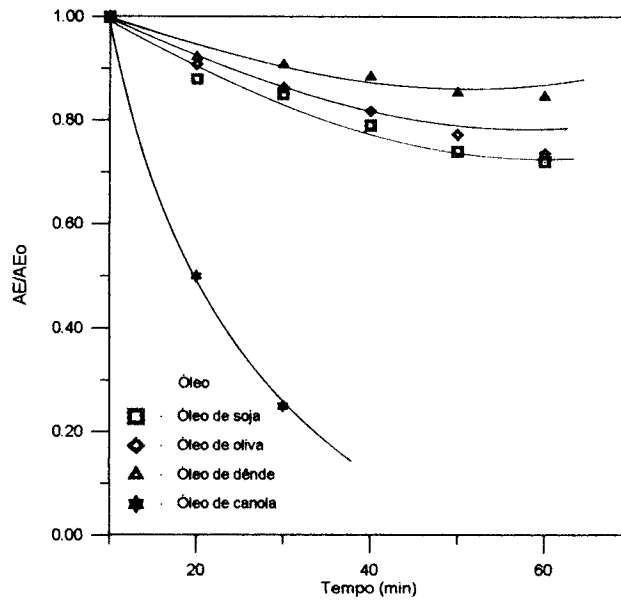


FIGURA 5.31b: Variação da atividade emulsificante, em pH 6 e 50°C, das emulsões de óleos, benzeno e querosene em água estabilizada pela fase aquosa da fermentação de culturas de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913..

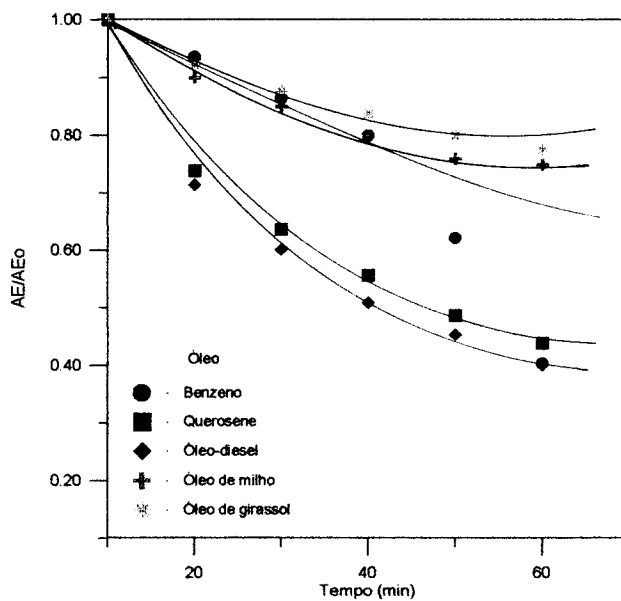


FIGURA 5.32a: Variação da atividade emulsificante, em pH 7 e 60°C, das emulsões de óleos, benzeno e querosene em água estabilizada pela fase aquosa da fermentação de culturas de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

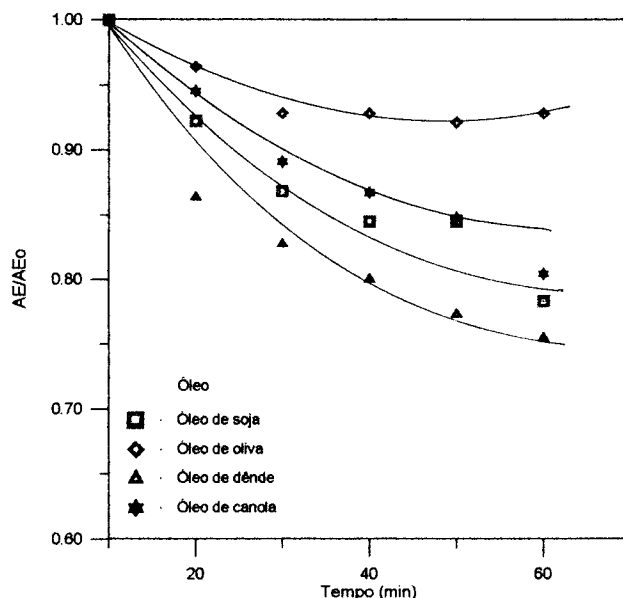


FIGURA 5.32b: Variação da atividade emulsificante, em pH 7 e 60°C, das emulsões de óleos, benzeno e querosene em água estabilizada pela fase aquosa da fermentação de culturas de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

A estabilidade das emulsões de óleos vegetais em água foram maiores que as emulsões que utilizaram hidrocarbonetos-água, exceto quando se utilizou óleo de canola (pH 7 e 60°C). Os melhores valores da estabilidade foram encontrados no pH 7 e 60°C para óleo de oliva (690,44 min). CIRIGLIANO & CARMAN (1985), encontraram o melhor valor de estabilidade para óleo de semente de algodão e óleo de milho, com k_d igual a $-2,6 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, que corresponde a estabilidade de 384,62 min. Dos hidrocarbonetos, o querosene apresentou uma estabilidade de 63,59 min a pH 7 e 60°C. No pH 6 e 50°C, o melhor valor para óleo vegetal foi de 319,66 min para óleo de dendê, porém a coloração avermelhada desta emulsão influenciou na determinação da atividade emulsificante. Nos hidrocarbonetos o maior valor foi para benzeno (95,12 min, pH 6,0 e 50°C). A influência do pH e temperatura pode ser vista na Figuras 5.33 e 5.34.

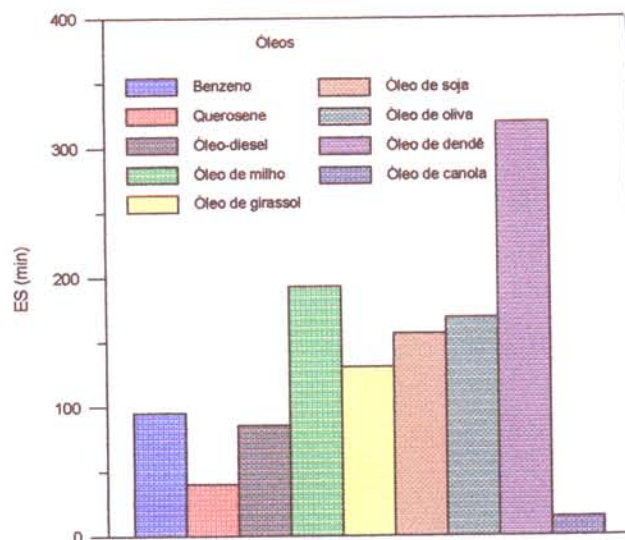


FIGURA 5.33: Estabilidade de emulsões de óleos, benzeno e querosene em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, a pH 6 e 50°C.

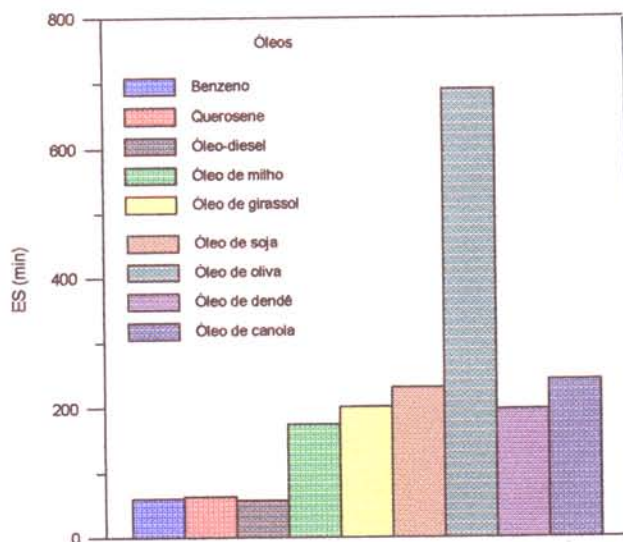


FIGURA 5.34: Estabilidade de emulsões de óleos, benzeno e querosene em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, a pH 7 e 60°C.

5.3- ISOLAMENTO

Para isolamento de bioemulsificante foram feitas fermentações em fermentador de bancada com agitação de 400 rpm, aeração de 1,5 vvm, percentagem de óleo-diesel de 7% (v/v), concentração de NH_4Cl de 2,5 g/l e temperatura de 32°C. O isolamento foi feito conforme item 4.6.

Antes de iniciar os experimentos, realizou-se ensaios preliminares para determinar o tempo de fermentação necessário para produzir o maior valor de atividade emulsificante (Figura 5.35 e Tabela A-35 do Apêndice A). Para testar a resistência do bioemulsificante a alta temperatura, incubou-se a 90°C um determinado volume de fase aquosa e fase extraída, como mostra a Figura 5.36 e Tabela A-36.

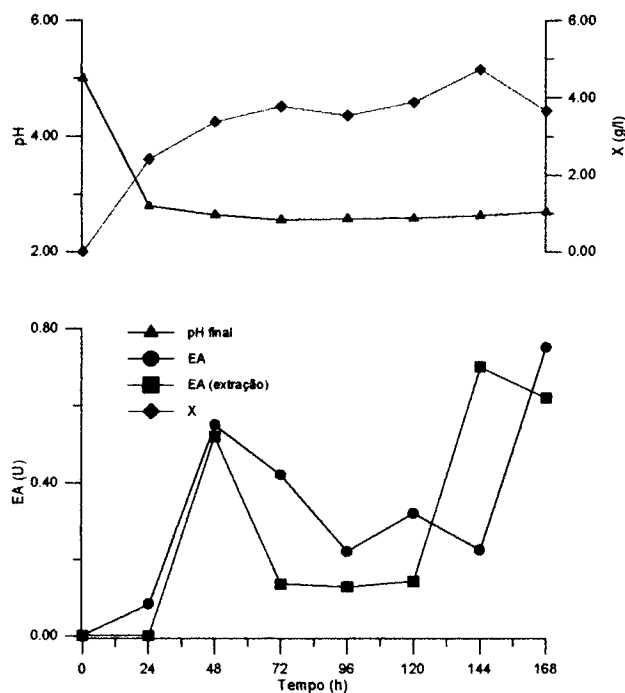


FIGURA 5.35: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 em fermentador de bancada a 32°C e 2,5 g/l de NH_4Cl .

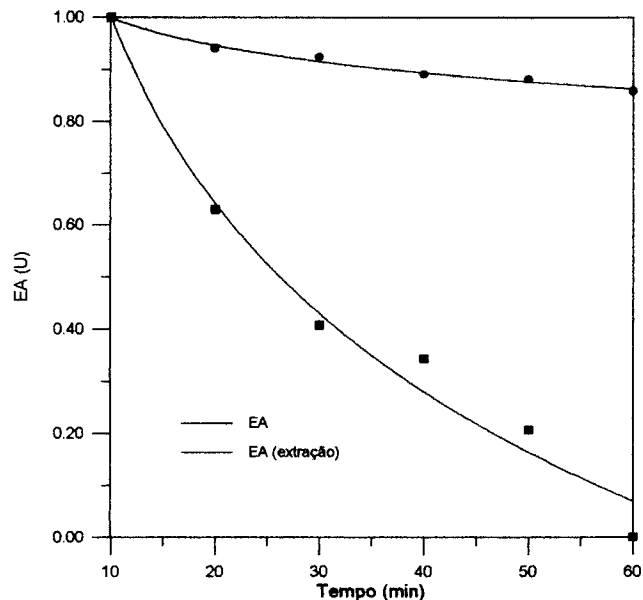


FIGURA 5.36: Acompanhamento da atividade de emulsão de óleo-diesel em água com o tempo de incubação na temperatura de 90°C, estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

No tempo de 48h, verificou-se uma máxima atividade emulsificante de 0,55 U seguida de 0,42 U a 72h (Figura 5.35). A fase aquosa mostrou-se estável durante 60 min de aquecimento a 90°C. Por esses resultados, passou-se a proceder a fermentação por 48 ou 72h, e a concentração das fases foi realizada em rota-vapor a 70°C.

A Tabela 5.3 e Tabelas A-37 a A-42, mostram os resultados das fermentações que foram utilizadas para o procedimento de precipitação e diálise. As fermentações apresentaram baixas atividades emulsificantes, sendo a maior, igual a 0,32 U. Já o grau de concentração variou em torno de 96%. Em fermentações por 48h, a atividade emulsificante extraída, manteve-se em 0,18 U, porém a 72h houve uma variação nas repetições, sendo o máximo valor igual a 0,71 U, e o mais baixo 0,02 U.

TABELA 5.3: Fermentação de óleo-diesel por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 em fermentador de bancada para precipitação e diálise do bioemulsificante.

Fermentação	Concentração(**) (%)	Tempo (h)	AE (U)	AE _(extração) (*) (U)	X (g/l)	pH
1	95,88	48	0,10	0,18	1,73	3,29
2	96,57	48	0	0,18	3,32	3,20
3	95,94	72	0,13	0,71	3,66	3,20
4	96,34	72	0,32	0,40	3,23	2,92
5	95,96	72	0,09	0,02	3,54	2,82
6	96,31	72	0,12	0,54	1,79	2,81

(*) extraída da massa celular seca com 400 ml de água destilada a 85°C. (**) redução de volume de fase aquosa e extraída em rota-vapor.

A Tabela 5.4 mostra o rendimento de bioemulsificante na precipitação com clorofórmio-metanol com e sem diálise. Em 48h de fermentação, sem diálise, obteve-se 7,34 g/l de precipitado com 0,55 U de atividade emulsificante, numa solução 0,75% p/v (Tabela A-39 do Apêndice A). Nos experimentos com 72h de fermentação, a maior concentração de precipitado valor de precipitado sem diálise foi 7,06 g/l, o que indica não haver diferença na concentração final de precipitado com o tempo de fermentação (Tabela 5.4). Já nos experimentos com diálise a maior concentração foi de 0,28 g/l. ROSEMBERG *et al.* (1979a) encontraram uma concentração de 0,04 g/l de precipitado, para a fermentação de hexadecano por *Arthrobacter* RAG-1, utilizando-se o procedimento de precipitação com heptano; já com precipitação por sulfato de amônia obtiveram 0,21 g/l de precipitado em fermentações de etanol pelo mesmo microrganismo.

TABELA 5.4: Precipitado obtido de fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 em fermentador de bancada com e sem diálise.

Fermentação	Tempo de fermentação (h)	Concentração (g/l)
1	48	NR
2*	48	5,23
3*	72	7,34
4**	72	0,19
5**	72	0,28
6*	72	7,06

NR: Concentração não realizada, (*) procedimento sem diálise, (**) procedimento com diálise,

A maior concentração de carboidrato e proteína para o precipitado foi de 188,84 mg/l e 467,35 g/l respectivamente. Estes valores estão bem acima dos obtidos por CIRIGLIANO & CARMAN (1985) que encontraram 39,3 mg/l de proteína e 122,7mg/l de carboidrato para precipitado de fermentação de n-hexadecano por *Candida lipolytica*. As fases aquosas dialisadas, foram utilizadas para a limpeza da membrana de ultrafiltração utilizada para concentração de leite, porém, nenhuma propriedade de desobstrução dos poros da membrana foi detectado, devido provavelmente à obstrução ser provocada por proteínas contida no leite e não por gorduras como se pensava. Os resultados de tal procedimento de aplicação são mostrados nas Tabelas D-1 a D-8 do Apêndice D.

6- CONCLUSÃO

A concentração de NH_4Cl influencia a fermentação de óleo-diesel por *sacchromyces lipolytica* CCT 0913, sendo a concentração ótima igual a 2,5g/l dentre as estudadas.

Porcentagem de 3% (v/v) de óleo-diesel na fermentação produziu as maiores atividades emulsificantes, enquanto que com 15% (v/v) houve a maior produção de biomassa.

Na faixa de temperatura de 32 a 34°C ocorreu a melhor atividade emulsificante, ou seja, produção do bioemulsificante, porém a 26°C verificou-se a maior produção de massa celular seca.

A adição de 14,3% de substrato após 96h não contribuiu para o aumento da atividade emulsificante, contudo aumentou a concentração de massa celular seca.

A temperatura e o pH influenciaram a estabilidade emulsificante. Maiores valores de estabilidade da emulsão foram obtidos com óleos vegetais comparados com hidrocarbonetos, sendo o maior valor obtido para óleo de oliva a pH 7 e 60°C. Comparando-se alguns emulsificantes com a fase aquosa da fermentação notou-se que a estabilidade da fase aquosa era a menor.

A maior quantidade de precipitado foi obtido para o procedimento sem diálise (7,34 g/l) com 0,55 U de atividade, 188,84 mg/l e 467,35 mg/l de carboidrato e proteína respectivamente. A fase aquosa dialisada apresentou 2930,72 mg/l e 2272,24 mg/l de carboidrato e proteína respectivamente e 0,28 g/l de precipitado.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ATLAS,R.M.. Microorganisms and Petroleum Pollutants. Bioscience,28 (6): 387-391,1978.

BLANCH,H.W. & EINSELE,A.. The kinetics of yeast growth on pure hydrocarbon. Biotechnol. Bioeng., 15: 861-877, 1973.

BÜLLER,M. & SCHINDLER,J.S.. Aliphatic hydrocarbons. in: KIESLICH,K.. Biotransformations. Florida: Deersfield, 1984. v.6a, c9, p. 329-385.

CIRIGLIANO,M.C. & CARMAN,G.M.. Isolation of a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Appl. Environ. Microbiol., 48 (40): 747-750, 1984.

CIRIGLIANO,M.C. & CARMAN,G.M.. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. Environ. Microbiol. 50 (4): 846-850, 1985.

COLWELL,R.R. & WALKER,J.D.. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environmental. CRC. Crit. Rev. Microbiol., 5 (4): 423-445, 1977.

CONN & STUMPF. Introdução à bioquímica, São Paulo, Edgard Blücher, 1980.

- COONEY, J.J. & BRODERICK, L.S.. Emulsification of hydrocarbons by bacteria from freshwater ecosystems. Develop. in indus. microbiology **23**: 425-234, 1981.
- COOPER, D.G., CAMERON, D.R. & NEUFELD, R.J.. The mannoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is an effective bioemulsifier. Appl. Environ. Microbiol., **54** (6): 1420-1425, 1988.
- COOPER, D.G. & GOLDENBERG, B.G.. Surface-active agents from two *bacillus* species. Appl. Environ. Microbiol., **53** (2): 224-229, 1987.
- DESAI, J.D., PALEJWALA, S.. Production of an extracellular emulsifier by a gram negative bacterium. Biotechnol. Lett., **11** (2): 115-118, 1989.
- FOGHT, J.M., GUTNICK, D.L., WESTLAKE, D.W.S.. Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. Appl. Environ. Microbiol., **55** (10): 36-42, 1989.
- FIECHTER, A.. Biosurfactants: moving towards industrial application. Trends in Food Scien. & Technol **31**: 283-293, 1992.
- GOMA, G., PAREILLEUX, A., DURAND, G.. Specific hydrocarbon solubilization during growth *Candida lipolytica*. J. Ferment. Technol., **51** (8): 616-618, 1973.

- GOMA,G., PAREILLEUX,A., DURAND,G.. Aspects physico-chimiques de l'assimilation des hydrocarbures par *Candida lipolytica*. Agr. Biol. Chem., 38 (7): 1273-1280, 1974.
- GUTIERREZ,J.R. & ERICKSON,L.E.. Hydrocarbon uptake in hydrocarbon fermentations. Biotechnol. Bioeng., 19: 1331-1349, 1977.
- GUTIERREZ,J.R. & ERICKSON,L.E.. Continuous culture of *Candida lipolytica* on n-hexadecano. Biotechnol. Bioeng., 20: 1833-1848, 1978.
- GUTNICK,D. & PINES,O.. Role for emulsan in growth of *Acinetobacter calcoaceticus* strain. Appl. Environm. Microbiol., 51 (3): 661-663, 1986.
- HOMMEL,R., STÜWER,O., STUBER,W., HAFERBURG,D., KLEBER,H.P. Production of water-soluble surface-active exolipids by *Torulopsis apicola*. Appl. Microbiol Biotechol. 26: 199-205, 1987.
- HOROWITZ,S., GILBERT,J.N., GRIFFIN,W.M.. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. J. of Indust. Microbiology 6: 243-248, 1990.
- JONHSON,V., SINGH,M., SAINI,V.S., ADHIKARI,D.K., SISTA,V., YADAV,N.K.. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. Biotechnol. Lett., 14 (6): 487-490, 1992.

- JUWARKAR, A., BABU, P.S., VAIDYA, A.N., BAL, A.S., KAPUR, R. & KHANNA, P.. Kinetics of biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. Biotechnol. Lett., 18 (3): 263-268, 1996.
- KÄPPELI, O. & FIECHTER, A.. Component from the cell surface of the hydrocarbon-utilizing yeast *Candida tropicalis* with possible relation to hydrocarbon transport. J. Bacteriol., 131 (3): 917-921, 1977.
- KÄPPELI, O., SANTOS, L.G., FIECHTER, A.. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant in continuous culture with glucose as carbon source. Appl. and Environ. Microbiology 48 (2); 301-301, 1984.
- KINSELLA, J.E. & PEARCE, K.N.. Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. J. Agric. Food Chem. 20 (3): 716-723, 1978.
- KINSELLA, J.E., WANISKA, R.D., SHETTY, J.K.. Protein-stabilized emulsions: effects of modification on the emulsifying activity of bovine serum albumin in a model system. J. Agric. Food Chem. 29: 826-831, 1981.
- KITAMOTO, D., TABUCHI, T., HANEISHI, K. NAKAHARA, T.. Production of Mannosylerythritol lipids by *Candida antartica* from vegetable oils. Pll. Biol. Chem. 54 (1): 37-40, 1990.

- KUDO,S.. Biosurfactants as food additives. World Conference on Biotechnology for the Fats and Oils Industry: 195- 201, 1988.
- LEE, T.H., CHUNG,S.H., SIN, Y.M. & PARK, J.Y.. Synthesis of biodegradable emulsifier using lipase in anhydrous pyridine. Biotechnol. Lett., 18 (6): 689-694, 1996.
- MOO-YONG,M., SHIMIZU,T., WITHWORTH,D.A.. Hydrocarbon fermentations using *Candida lipolytica*. Basic growth parameters for batch and continuous culture conditions. Biotechnol. Bioeng., 13: 741-760, 1971.
- MOO-YONG,M., SHIMIZU,T.. Hydrocarbon fermentations using *Candida lipolytica*. II. A model for cell growth kinetics. Biotechnol. Bioeng., 13: 761-778, 1971.
- MORGAN,P. & WATKINSON,R.J.. Physiology of aliphatic hydrocarbon-degrading microorganisms. Biodegradation 1: 79-92,1990.
- MORRIS,D.L.. Quantitative determination of carbohydrates with dreywood's anthrone reagent. Science 107 (5): 254-255, 1948.
- PAREILLEUX, A.. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: Formation of a biosurfactant; effects on respiratory activity and growth. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 8: 91-101, 1979.

- PROKOP,A., ERICKSON,L.E., PAREDES-LOPES,O.. Growth models of cultures with two liquids phases. V. Substrate dissolved in dispersed phase-experimental observations. Biotechnol. Bioeng., 13: 241-256, 1971.
- PROKOP,A. & ERICKSON,L.E.. Growth models of cultures with two liquids phases. VII. Substrate dissolved in dispersed phase; effect of dispersed phase volume and temperature. Biotechnol. Bioeng., 14: 571-586, 1972.
- ROSENBERG,E., ZUCKERBERG,A., RUBINOVITZ,C., GUTNICK,D.L.. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG1: Isolation and emulsifying properties. Appl. Environm. Microbiol., 37 (3): 402-408, 1979a.
- ROSENBERG,E., PERRY,A., GIBSON,D.T., GUTNICK,D.L.. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG1: Specificity of hydrocarbon substrate. Appl. Environm. Microbiol., 37 (3): 409-413, 1979b.
- ROSENBERG,E., ZUCKERBERG,A., DIVER,A., PEERI,Z., GUTNICK,D.L.. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG1: Chemical and physical properties. Appl. Environm. Microbiol., 37 (3): 414-420, 1979c.
- SAMPAIO,R.M.. Estudo de produção de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por fermentação de óleo-diesel comercial. Tese de Mestrado. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Campinas, 1995.

- SÁNCHEZ, A.J., MURIEL, J.M., BRUQUE, J.M. & OLÍAS, M.J.. Production of biosurfactants by *Cladosporium resinae*. Biotechnol. Lett., 18 (3): 235-240, 1996.
- SAR, N. & ROSEMBERG, E.. Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strain. Curr. Microbiol., 9 (6): 309-314, 1983.
- SHILO, M., FATTOM, A., HAGALIL, M.. Dispersing liquid hydrocarbon into a second liquid. Patent n° 4826624, 1989.
- SINGH, M., DESAI, J.D.. Hydrocarbon emulsifying activity of bacterial strains: Potential of *Arthrobacter paraffineus*. Curr. Science, 57 (23): 1307-1308, 1988
- SINGH, M., SAINI, V.S., ADHIKARI, D.K., DESAI, J.D., SISTA, V.R.. Production of bioemulsifier by a SCP-producing strain of *Candida tropicalis* during hydrocarbon fermentation. Biotechnol. Lett., 12 (10): 743-746, 1990.
- VAN DYKE, M., LEE, H., TREVORS, J.T.. Applications of microbial surfactants. Biotech. Adv. 9: 241-252, 1991.
- VAN LOOSDRECHT, M.C.M., GEERDINK, M.J., LUYBEN, K.Ch.A.M.. Biodegradability of diesel oil. Biodegradation 7: 73-81, 1996.

VELANKAR,S.K., BARNET,S.M., HOUSTON,C.W., THOMPSON,A.R..
Microbial growth on hydrocarbons-some experimental results.
Biotechnol. Bioeng., 17 (2): 241-251, 1975.

WAGNER,F.. Strategies for biosurfactant production. World Conference
on Biotechnology for the Fats and Oils Industry: 189-194, 1988.

WALKER,J.D., AUSTIN,H.F., COLWELL,R.R.. Utilization of mixed
hydrocarbon substrate by petroleum-degrading microorganisms. J.
Gen. Appl. Microbiol., 21 (1): 27-39, 1975.

YOSHIDA,F. & YAMANE,T.. Continuous hydrocarbon fermentation with
colloidal emulsion feed. A kinetic model for two-liquids phases culture.
Biotechnol. Bioeng., 16: 635-657, 1974.

ZAJIC,J.E. & GERSON,D.F.. Microbial biosurfactants. Process
Biochemistry (7): 20-23, 1979.

ZAJIC,J.E., COOPER,D.G., LONGAY,R.. Surface activity of
Mycobacterium and *Pseudomonas*. J. Ferment. Technol.39 (2): 97-
101, 1981.

ZOBELL,C.E.. Action of microorganisms on hydrocarbons. Bacteriol. Rev.,
10: 1-49,1946.

APÉNDICE A

TABELA A-1: Efeito da concentração de NH_4Cl na fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 em 24h.

Conc. de NH_4Cl (g/l)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
1,0	3,19	0,108	0,360	0,280	1,50
2,5	3,13	0,070	0,370	0,258	1,38
5,0	3,07	0,035	0,220	0,310	1,67
7,5	3,05	0,059	0,180	0,350	1,90
10,0	3,09	0,057	0,190	0,279	1,50

TABELA A-2: Efeito da concentração de NH_4Cl na fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 em 48h.

Conc. de NH_4Cl (g/l)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
1,0	3,04	0,020	0,086	0,450	2,47
2,5	3,06	0	0,150	0,420	2,30
5,0	3,02	0,010	0,090	0,460	2,52
7,5	2,98	0	0,167	0,340	1,84
10,0	3,05	0,180	0,070	0,390	2,13

TABELA A-3: Efeito da concentração de NH_4Cl na fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 em 72h.

Conc. de NH_4Cl (g/l)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
1,0	2,86	0,600	0,160	0,460	2,52
2,5	2,82	0,630	0,060	0,430	2,35
5,0	2,86	0,302	0,098	0,450	2,47
7,5	2,86	0,422	0	0,400	2,18
10,0	2,84	0,369	0,170	0,490	2,69

TABELA A-4: Efeito da concentração de NH_4Cl na fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 em 96h.

Conc. de NH_4Cl (g/l)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
1,0	2,92	0,450	0,160	0,490	2,69
2,5	2,86	0,518	0,040	0,410	2,24
5,0	2,89	0,390	0,010	0,500	2,75
7,5	2,89	0,420	0	0,480	2,64
10,0	2,90	0,800	0,085	0,440	2,41

TABELA A-5: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial fermentado por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 em 24h com 5g/l de NH_4Cl .

% óleo-diesel (v/v)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
3	3,12	0,100	0,331	0,295	1,59
5	3,12	0	0,350	0,290	1,56
7	3,07	0,156	0,400	0,240	1,28
10	3,04	0,150	0,350	0,349	1,89
15	2,92	0,149	0,200	0,520	2,86

TABELA A-6: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial fermentado por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 em 48h com 5g/l de NH_4Cl .

% óleo-diesel (v/v)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
3	2,89	0,140	0,320	0,380	2,07
5	2,87	0,012	0,320	0,370	2,01
7	3,03	0	0,160	0,330	1,79
10	3,01	0	0,170	0,430	2,35
15	2,87	0	0,200	0,580	3,20

TABELA A-7: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial fermentado por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 em 72h com 5g/l de NH₄Cl.

%óleo-diesel (v/v)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
3	2,96	0,460	0,460	0,390	2,13
5	2,90	0,425	0,280	0,500	2,75
7	2,87	0,550	0,040	0,510	2,81
10	2,76	0,280	0,020	0,620	3,43
15	2,72	0	0,010	0,630	3,49

TABELA A-8: Efeito da percentagem de óleo-diesel comercial fermentado por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 em 96h com 5g/l de NH₄Cl.

%óleo-diesel (v/v)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
3	3,16	0,750	0,590	0,380	2,07
5	2,92	0,600	0,380	0,470	2,58
7	2,78	0,710	0,060	0,440	2,41
10	2,68	0,400	0,061	0,510	2,81
15	2,66	0	0,049	0,460	2,52

TABELA A-9: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 26°C com 2,5 g/l de NH₄Cl.

Tempo (h)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
0	5	0	0	0	0
24	3,13	0,025	0,141	0,321	1,74
48	2,69	0	0,148	0,391	2,13
72	2,56	0	0,010	0,630	3,49
96	2,56	0,115	0,135	0,640	3,54
120	2,40	0,211	0,090	0,650	3,60
144	2,10	0,230	0,500	0,590	3,26
168	2,60	0,600	0	0,520	2,86

TABELA A-10: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 28°C com 2,5 g/l de NH₄Cl.

Tempo (h)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
0	5	0	0	0	0
24	3,36	0,110	0,203	0,470	2,58
48	2,78	0,020	0,040	0,500	2,75
72	2,63	0,660	0,080	0,600	3,14
96	2,76	0,190	0,185	0,620	3,43
120	2,69	0,770	0,240	0,590	3,26
144	2,74	0,540	1,100	0,630	3,49
168	2,75	0,440	0,065	0,610	3,37

TABELA A-11: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 30°C com 2,5 g/l de NH₄Cl.

Tempo (h)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
0	5	0	0	0	0
24	3,20	0,260	0,030	0,530	2,92
48	2,73	0	1,100	0,445	2,44
72	2,66	0	0,010	0,470	2,58
96	2,63	0	0,135	0,530	2,92
120	2,65	0	0,143	0,470	2,58
144	2,71	0,085	0,062	0,451	2,47
168	2,81	0	0,870	0,400	2,18

TABELA A-12: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 32°C com 2,5 g/l de NH₄Cl.

Tempo (h)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
0	5	0	0	0	0
24	3,37	0,250	1,350	0,316	1,71
48	3,11	0,020	0,327	0,335	1,82
72	2,78	0,115	0,170	0,345	1,87
96	2,79	0,100	0,150	0,430	2,35
120	2,84	0,280	0,172	0,360	1,96
144	2,97	0,516	0,105	0,360	1,96
168	2,93	0,730	0,095	0,340	1,84

TABELA A-13: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 34°C com 2,5 g/l de NH₄Cl.

Tempo (h)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
0	5	0	0	0	0
24	3,28	0,580	0,640	0,283	1,52
48	3,00	0,520	1,100	0,260	1,39
72	2,87	0,890	0,230	0,310	1,67
96	2,85	0,800	0,239	0,340	1,84
120	3,01	0,880	0,430	0,280	1,50
144	3,03	0,720	0,770	0,280	1,50
168	3,13	0,800	0,280	0,247	1,32

TABELA A-14: Efeito da adição de substrato (14,3% v/v) na fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 26°C com 2,5 g/l de NH₄Cl.

Tempo (h)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
0	5	0	0	0	0
24	3,06	0	0,110	0,380	2,07
48	2,61	0	0,200	0,480	2,64
72	2,50	0,275	0,030	0,660	3,66
96 *	2,50	0,112	0,005	0,640	3,54
120	2,59	0,050	0,130	0,760	4,22
144	2,12	0,180	0,042	0,850	4,73
168	2,07	0,048	0	0,900	5,02

* Adição de substrato

TABELA A-15: Efeito da adição de substrato (14,3% v/v) na fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 28°C com 2,5 g/l de NH₄Cl.

Tempo (h)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
0	5	0	0	0	0
24	3,32	0	0,160	0,200	1,05
48	2,86	0	0	0,520	2,86
72	2,67	0,380	0,105	0,580	3,20
96 *	2,76	0,320	0,560	0,540	3,54
120	2,85	0	0	0,580	3,20
144	2,69	0,050	0	0,760	4,22
168	2,42	0,225	0,010	0,830	4,62

* Adição de substrato

TABELA A-16: Efeito da adição de substrato (14,3% v/v) na fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 30°C com 2,5 g/l de NH₄Cl.

Tempo (h)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
0	5	0	0	0	0
24	3,15	0,125	0,030	0,415	2,27
48	2,70	0	0,059	0,420	2,30
72	2,64	0	0,180	0,500	2,75
96 *	2,63	0,010	0,171	0,630	3,49
120	2,50	0,090	0,110	0,570	3,15
144	2,39	0,125	0,520	0,610	3,37
168	2,37	0,420	0,640	0,650	3,60

* Adição de substrato

TABELA A-17: Efeito da adição de substrato (14,3% v/v) na fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 32°C com 2,5 g/l de NH₄Cl.

Tempo (h)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
0	5	0	0	0	0
24	3,33	0,427	1,450	0,480	2,64
48	3,11	0	0,930	0,380	2,07
72	2,72	0,015	0,089	0,460	2,52
96 *	2,70	0,020	0,288	0,560	3,09
120	2,74	0,201	0,330	0,450	2,47
144	2,78	0,090	0,140	0,480	2,64
168	2,69	0,041	0	0,460	2,52

* Adição de substrato

TABELA A-18: Efeito da adição de substrato (14,3% v/v) na fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 34°C com 2,5 g/l de NH₄Cl.

Tempo (h)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
0	5	0	0	0	0
24	3,30	0,22	1,000	0,190	0,99
48	2,95	0,89	0,880	0,400	2,18
72	2,80	0,750	0,600	0,400	2,18
96 *	2,81	0,890	0,028	0,330	1,79
120	2,89	0,200	0,320	0,240	1,28
144	2,83	0,280	0,900	0,360	1,96
168	2,92	0,082	0,450	0,430	2,35

* Adição de substrato

TABELA A-19: Variação da atividade emulsificante de fase aquosa de cultura de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 30°C.

pH	Atividade emulsificante (U)					
	10	20	30	40	50	60
2	0,580	0,500	0,440	0,370	0,320	0,289
3	0,500	0,389	0,290	0,240	0,190	0,162
4	0,580	0,490	0,402	0,330	0,269	0,250
5	0,389	0,258	0,160	0,070	0,080	0,060
6	0,620	0,520	0,460	0,400	0,242	0,340
7	0,420	0,315	0,275	0,210	0,180	0,150
8	0,440	0,370	0,335	0,300	0,270	0,257
9	0,604	0,590	0,580	0,580	0,578	0,570
10	0,304	0,250	0,210	0,165	0,158	0,150

TABELA A-20: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel em água por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 30°C.

pH	k_d	r	$ES=-1/k_d$
2	-0,0142718	0,996287	70,06824647
3	-0,0227828	0,992136	43,88698224
4	-0,0177265	0,988584	56,41271543
5	-0,0375597	0,994010	26,62428081
6	-0,0119054	0,975926	83,99549784
7	-0,0202760	0,990752	49,31939239
8	-0,0100697	0,976066	93,48065885
9	-0,0009999	0,868636	1000,069005
10	-0,0147135	0,940734	67,96479424

TABELA A-21: Variação da atividade emulsificante de fase aquosa de cultura de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 40°C.

pH	Atividade emulsificante (U)					
	10	20	30	40	50	60
2	0,360	0,235	0,050	0,010	0	0
3	0,340	0,220	0,050	SL	0	0
4	0,700	0,540	0,400	0,280	0,200	0,160
5	0,480	0,315	0,260	0,180	0,120	0
6	0,580	0,510	0,422	0,320	0,240	0,200
7	0,800	0,750	0,700	0,630	0,520	0,421
8	0,380	0,300	0,252	0,220	0,300	0,298
9	0,500	0,420	0,328	0,295	0,365	0,420
10	0,560	0,435	0,350	0,330	0,460	0,450

TABELA A-22: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel em água por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 40°C.

pH	k_d	r	ES=-1/ k_d
2	-0,1229810	0,949057	8,130940669
3	-0,0958462	0,909666	10,43338181
4	-0,0306170	0,996344	32,66159323
5	-0,0333220	0,988572	30,01020347
6	-0,0224616	0,986378	44,52042597
7	-0,0126114	0,937468	79,29333777
8	-0,0181398	0,984696	55,12739942
9	-0,0183014	0,979767	54,64062859
10	-0,0180395	0,941304	55,43390892

TABELA A-23: Variação da atividade emulsificante de fase aquosa de cultura de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 50°C.

pH	Atividade emulsificante (U)					
	10	20	30	40	50	60
2	0,290	0,240	0,210	0,141	0,127	0,075
3	0,350	0,100	0,200	0,110	0,090	0,048
4	0,190	0,135	0,060	0,040	0	0
5	0,560	0,400	0,350	0,280	0,230	0,190
6	0,520	0,420	0,370	0,320	0,300	0,270
7	0,430	0,390	0,324	0,300	0,210	0,160
8	0,650	0,560	0,640	0,547	0,540	0,500
9	0,340	0,295	0,251	0,230	0,210	0,190
10	0,750	0,750	0,700	0,680	0,640	0,660

TABELA A-24: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel em água por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 50°C.

pH	k_d	r	$ES=-1/k_d$
2	-0,0259133	0,954348	38,59022201
3	-0,0390838	0,974513	25,58604844
4	-0,0548536	0,974565	18,23034404
5	-0,0208225	0,988586	48,02497299
6	-0,0126618	0,968588	78,97771249
7	-0,0201579	0,983863	49,60834214
8	-0,0055526	0,871362	180,0954966
9	-0,0114760	0,984423	87,13837574
10	-0,00381481	0,978353	262,1362532

TABELA A-25: Variação da atividade emulsificante de fase aquosa de cultura de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 60°C.

pH	Atividade emulsificante (U)					
	10	20	30	40	50	60
2	0,370	0,270	0,190	0,130	0,075	0,030
3	0,660	0,540	0,560	0,500	0,480	0,495
4	0,590	0,500	0,420	0,360	0,310	0,270
5	0,680	0,560	0,500	0,410	0,420	0,355
6	0,700	0,640	0,560	0,540	0,520	0,480
7	0,430	0,380	0,370	0,274	0,280	0,280
8	0,460	0,390	0,320	0,270	0,250	0,250
9	0,450	0,448	0,380	0,380	0,310	0,250
10	0,700	0,800	0,790	0,730	0,720	0,700

TABELA A-26: Estabilidade de emulsão de óleo-diesel em água por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 60°C.

pH	k_d	r	$ES=-1/k_d$
2	-0,04795380	0,953229	20,85340474
3	-0,00544311	0,755528	183,7184992
4	-0,0157050	0,998345	63,67398918
5	-0,0123182	0,948301	81,80691981
6	-0,00727359	0,956559	137,4836910
7	-0,00960428	0,842401	104,1202464
8	-0,013008	0,925881	76,87576876
9	-0,0115531	0,903338	86,55685487
10	-0,00359845	0,928946	277,8974281

TABELA A-27: Variação da atividade emulsificante de cultura de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 para alguns emulsificantes comerciais comparado com a fase aquosa na temperatura de 50°C e pH 6.

Emulsificante	Atividade emulsificante (U)					
	10	20	30	40	50	60
Alginato	1,000	0,900	0,850	0,800	0,780	0,750
Caseína	0,450	0,381	0,351	0,321	0,305	0,280
Fase aquosa	0,700	0,660	0,560	0,480	0,449	0,400
Pectina	0,990	0,860	0,760	0,740	0,680	0,660
Tween 80	0,890	0,740	0,682	0,660	0,620	0,590

TABELA A-28: Estabilidade de emulsão óleo-diesel em água na temperatura de 50°C e pH 6.

Emulsificantes	k_d	r	$ES=-1/k_d$
Alginato	-0,00550954	0,949353	181,5033560
Caseína	-0,00894028	0,967118	111,8533200
Fase aquosa	-0,0117368	0,983699	85,20209938
Pectina	-0,00788146	0,935625	126,8800451
Tween 80	-0,00748308	0,909500	133,6348135

TABELA A-29: Variação da atividade emulsificante de cultura de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 para alguns emulsificantes comerciais comparado com a fase aquosa na temperatura de 60°C e pH 7.

Emulsificante	Atividade emulsificante (U)					
	10	20	30	40	50	60
Alginato	0,460	0,382	0,353	0,330	0,310	0,301
Caseína	0,139	0,110	0,095	0,089	0,080	0,080
Fase aquosa	0,399	0,285	0,240	0,203	0,181	0,160
Pectina	0,530	0,470	0,449	0,430	0,410	0,390
Tween 80	0,770	0,640	0,580	0,540	0,500	0,475

TABELA A-30: Estabilidade de emulsão óleo-diesel em água na temperatura de 60°C e pH 7.

Emulsificantes	k_d	r	$ES=-1/k_d$
Alginato	-0,00804143	0,919203	124,3559914
Caseína	-0,01080810	0,899222	92,52320019
Fase aquosa	-0,01742390	0,957496	57,39243223
Pectina	-0,00567604	0,957244	176,1791672
Tween 80	-0,00922149	0,949200	108,4423450

TABELA A-31: Variação da atividade emulsificante utilizando-se diferentes pares óleo-água de cultura de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 50°C e pH 6.

Óleo	Atividade emulsificante (U)					
	10	20	30	40	50	60
Canola	0,020	0,010	0,005	0	0	0
Dendê	1,300	1,200	1,180	1,150	1,110	1,110
Girassol	1,010	0,910	0,850	0,790	0,740	0,680
Milho	1,380	1,120	1,100	1,090	1,050	1,000
Oliva	1,100	1,000	0,950	0,900	0,850	0,810
Soja	1,000	0,880	0,850	0,790	0,740	0,720
Benzeno	1,010	0,800	0,680	0,620	0,610	0,580
Diesel	0,700	0,660	0,560	0,480	0,449	0,400
Querosene	0,770	0,640	0,580	0,540	0,500	0,475

TABELA A-32: Estabilidade emulsificante dos pares óleo-água de 50°C e pH 6, estabilizadas por fase aquosa de cultura de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

Óleos	k_d	r	$ES=-1/k_d$
Canola	-0,06931470	0,960906	14,42695417
Dendê	-0,00312831	0,916843	319,6614146
Girassol	-0,00763329	0,995127	131,0051105
Milho	-0,00518047	0,762237	193,0326785
Oliva	-0,00591937	0,986545	168,9368970
Soja	-0,00638725	0,960936	156,5619007
Benzeno	-0,01051210	0,871007	95,1284710
Diesel	-0,01173680	0,983699	85,2020994
Querosene	-0,02494230	0,984013	40,0925336

TABELA A-33: Variação da atividade emulsificante utilizando-se diferentes pares óleo-água de cultura de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 60°C e pH 7.

Óleo	Atividade emulsificante (U)					
	10	20	30	40	50	60
Canola	0,460	0,435	0,410	0,399	0,390	0,370
Dendê	1,100	0,950	0,910	0,880	0,850	0,830
Girassol	1,300	1,200	1,140	1,090	1,040	1,010
Milho	1,000	0,900	0,850	0,800	0,760	0,750
Oliva	1,400	1,350	1,300	1,300	1,290	1,290
Soja	1,290	1,190	1,120	1,090	1,090	1,010
Benzeno	1,400	1,310	1,210	1,120	0,870	0,565
Diesel	0,399	0,285	0,240	0,203	0,181	0,160
Querosene	0,440	0,325	0,280	0,245	0,214	0,193

TABELA A-34: Estabilidade emulsificante dos pares óleo-água de 60°C e pH 7, estabilizadas por fase aquosa de cultura de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

Óleos	k_d	r	$ES=-1/k_d$
Canola	-0,00412403	0,975286	242,4812623
Dendê	-0,00507257	0,869320	197,1387285
Girassol	-0,00496064	0,977834	201,5868920
Milho	-0,00573218	0,949941	174,4536982
Oliva	-0,00144836	0,710222	690,4360790
Soja	-0,00432554	0,922861	231,1850081
Benzeno	-0,01669190	0,849483	59,90929732
Diesel	-0,01742390	0,957496	57,39243223
Querosene	-0,01573570	0,962856	63,54976264

TABELA A-35: Fermentação de óleo-diesel comercial (7% v/v) por *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 em fermentador de bancada a 32°C e 2,5 g/l de NH_4Cl .

Tempo (h)	pH	AE (U)	AE _(extração) (U)	OD	X (g/l)
0	5	0	0	0	0
24	2,79	0,082	0	0,440	2,41
48	2,64	0,550	0,520	0,610	3,37
72	2,55	0,420	0,135	0,680	3,77
96 *	2,57	0,220	0,128	0,640	3,54
120	2,58	0,320	0,142	0,700	3,88
144	2,63	0,224	0,700	0,850	4,73
168	2,69	0,750	0,620	0,660	3,66

TABELA A-36: Efeito da temperatura de 90°C na estabilidade de emulsão de óleo-diesel da fase aquosa e fase extraída de cultura de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

Amostra	Atividade emulsificante (U)					
	10	20	30	40	50	60
Fase aquosa	0,303	0,285	0,280	0,270	0,267	0,260
Fase extraída	0,270	0,170	0,110	0,093	0,100	0

TABELA A-37: Resultados da 1ª fermentação para isolamento de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, em fermentador de bancada a 32°C.

Volume de fase aquosa = 3540 ml
 Volume de água retirada= 3202 ml
 Volume de concentrado = 146 ml
 Perda de concentrado= 192 ml
 % de concentração= 95,88%

Fase aquosa:

AE= 0,10 U
 AE_(extração)= 0,18 U
 OD= 0,32

X= 1,73 g/l
 pH final= 3,29
 Tempo de fermentação= 48h

Análise	Fase aquosa	Água extraída	Concentrado
Carboidrato(mg/l)	171,35	0	3144,31
Proteína (mg/l)	155,49	0	3959,66
EA	0,10	0	0,486

TABELA A-38: Resultados da 2ª fermentação para isolamento de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, em fermentador de bancada a 32°C.

Volume de fase aquosa = 3700 ml
 Volume de água retirada= 3505 ml
 Volume de concentrado = 127 ml
 Perda de concentrado= 68 ml
 % de concentração= 96,57 %

Fase aquosa:

AE= 0

AE_(extração)= 0,18 U

OD= 0,60

X= 3,32 g/l

pH final= 3,20

Tempo de fermentação= 48 h

Isolamento:

Massa de isolado = 15,2271 g

Volume de concentrado utilizado = 100 ml

Concentração de isolado = 5,23 g/l

Análise	Fase aquosa	Água extraída	Concentrado	Isolado (*)
Carboidrato (mg/l)	214,06	25,99	4201,08	95,20
Proteína (mg/l)	175,54	0	4447,88	310,55
EA	0	0	0,81	0,18

(*) em solução 0,75%

TABELA A-39: Resultados da 3ª fermentação para isolamento de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, em fermentador de bancada a 32°C.

Volume de fase aquosa = 2780 ml
 Volume de água retirada = 2644 ml
 Volume de concentrado = 113 ml
 Perda de concentrado = 23 ml
 % de concentração = 95,94 %

Fase aquosa:

AE = 0,13 U

X = 3,66 g/l

AE_(extração) = 0,71 U
 OD = 0,66

pH final = 3,20

Tempo de fermentação = 72 h

Isolamento:

Massa de isolado = 18,0570 g
 Volume de concentrado utilizado = 100 ml
 Concentração de isolado = 7,34 g/l

Análise	Fase aquosa	Água extraída	Concentrado	Isolado (*)
Carboidrato (mg/l)	327,27	0	4686,15	188,84
Proteína (mg/l)	220,75	0	5437,19	467,35
EA	0,13	0,08	1,15	0,55

(*) em solução 0,75%

TABELA A-40: Resultados da 4ª fermentação para isolamento de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, em fermentador de bancada a 32°C.

Volume de fase aquosa = 3440 ml
 Volume de água retirada= 3270 ml
 Volume de concentrado = 126 ml
 Perda de concentrado= 44 ml
 % de concentração= 96,34 %

Fase aquosa:

AE= 0,32 U

AE_(extração)= 0,40 U

OD= 0,60

X= 3,23 g/l

pH final= 2,92

Tempo de fermentação= 72 h

Isolamento com diálise:

Massa de isolado = 0,5178 g

Volume de concentrado utilizado = 100 ml

Concentração de isolado = 0,19 g/l

Análise	Fase aquosa	Água extraída	Concentrado	Dialisado
Carboidrato (mg/l)	275,81	26,24	6894,97	2174,17
Proteína (mg/l)	155,49	0	4665,26	1775,19
EA	0,32	0,15	0,924	0,75

TABELA A-41: Resultados da 5ª fermentação para isolamento de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, em fermentador de bancada a 32°C.

Volume de fase aquosa = 2920 ml
 Volume de água retirada = 2730 ml
 Volume de concentrado = 118 ml
 Perda de concentrado = 72 ml
 % de concentração = 95,96 %

Fase aquosa:

AE = 0,09 U

AE_(extração) = 0,02 U

OD = 0,64

X = 3,54 g/l

pH final = 2,82

Tempo de fermentação = 72 h

Isolamento com diálise:

Massa de isolado = 0,6831 g
 Volume de concentrado utilizado = 100 ml
 Concentração de isolado = 0,28 g/l

Análise	Fase aquosa	Água extraída	Concentrado	Isolado (*)
Carboidrato (mg/l)	368,44	7,42	6938,28	2930,72
Proteína (mg/l)	186,68	12,28	4812,52	2272,24
EA	0,09	0	0,84	0,96

(*) em solução 0,75%

TABELA A-42: Resultados da 6ª fermentação para isolamento de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913, em fermentador de bancada a 32°C.

Volume de fase aquosa = 3170 ml
 Volume de água retirada= 32980ml
 Volume de concentrado = 117 ml
 Perda de concentrado= 73 ml
 % de concentração= 96,31 %

Fase aquosa:

AE= 0,12 U

AE_(extração)= 0,54 U

OD= 0,33

X= 1,79 g/l

pH final= 2,81

Tempo de fermentação= 72 h

Isolamento:

Massa de isolado = 19,1317 g

Volume de concentrado utilizado = 100 ml

Concentração de isolado = 7,06 g/l

Análise	Fase aquosa	Água extraída	Concentrado	Isolado (*)
Carboidrato (mg/l)	260,38	0	8150,96	87,74
Proteína (mg/l)	236,79	0	4743,65	371,13
EA	0,12	0	0,96	1,41

(*) em solução 0,75%

APÉNDICE B

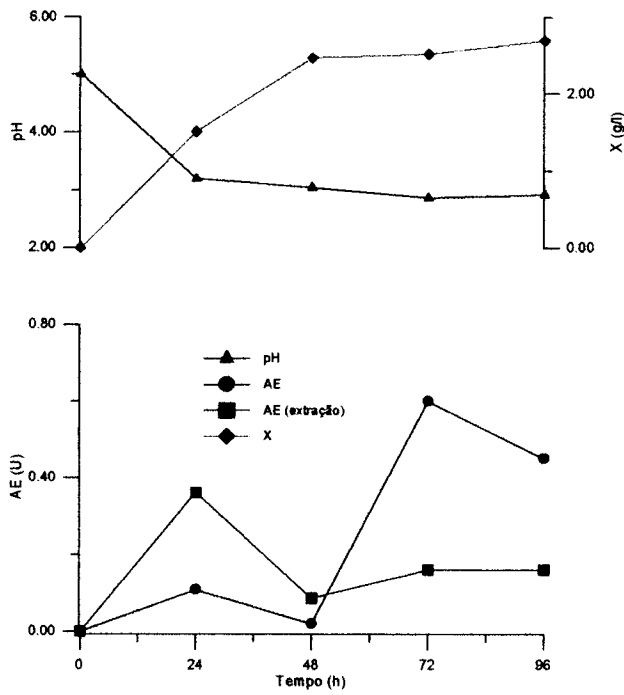


FIGURA B-1: Fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Sacharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da concentração de 1,0 g/l de NH₄Cl.

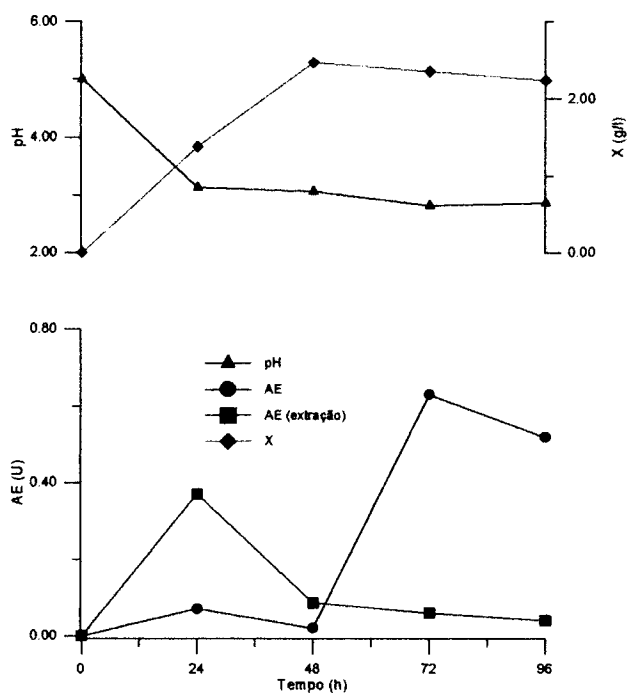


FIGURA B-2: Fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Sacharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da concentração de 2,5 g/l de NH₄Cl.

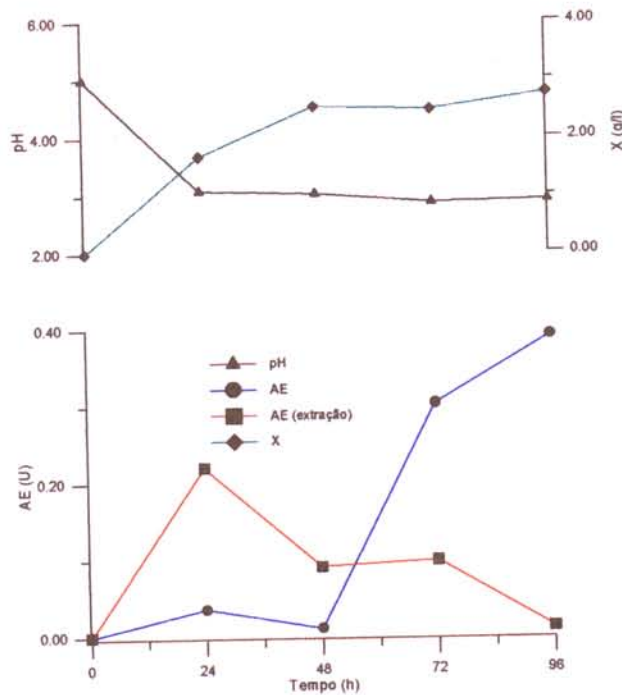


FIGURA B-3: Fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Sacharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da concentração de 5,0 g/l de NH_4Cl .

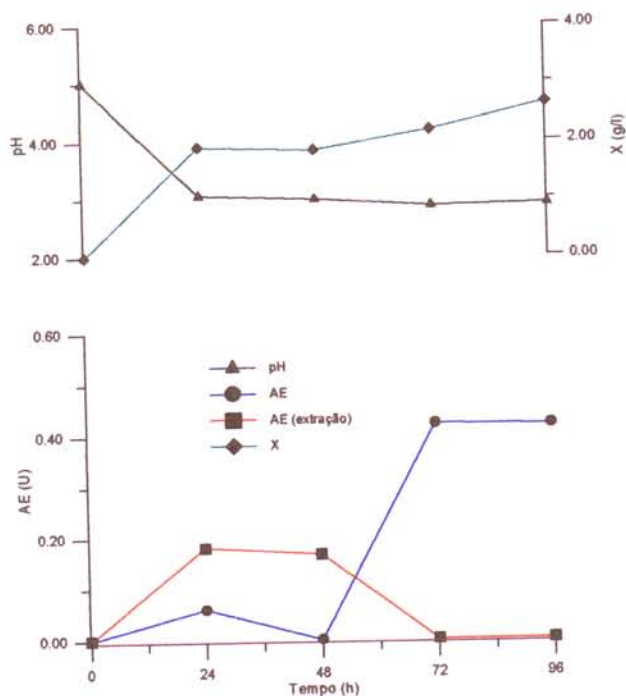


FIGURA B-4: Fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Sacharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da concentração de 7,5 g/l de NH_4Cl .

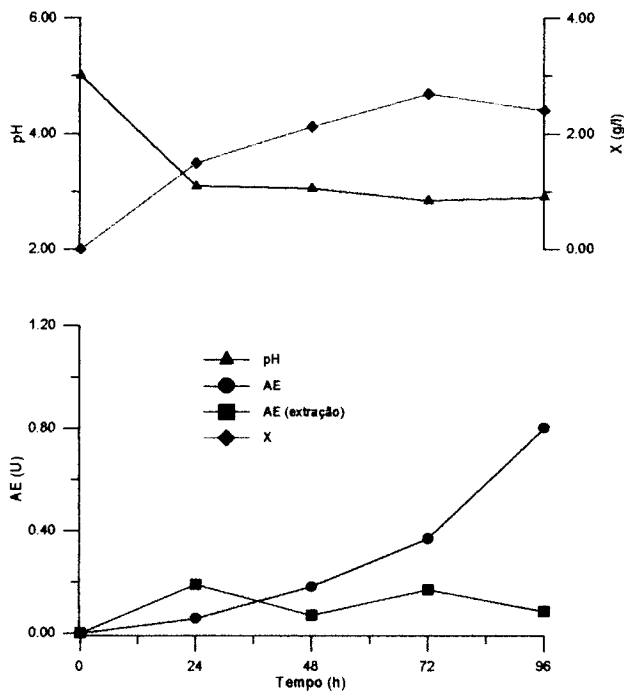


FIGURA B-5: Fermentação de óleo-diesel comercial (5% v/v) por *Sacharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da concentração de 10,0 g/l de NH₄Cl.

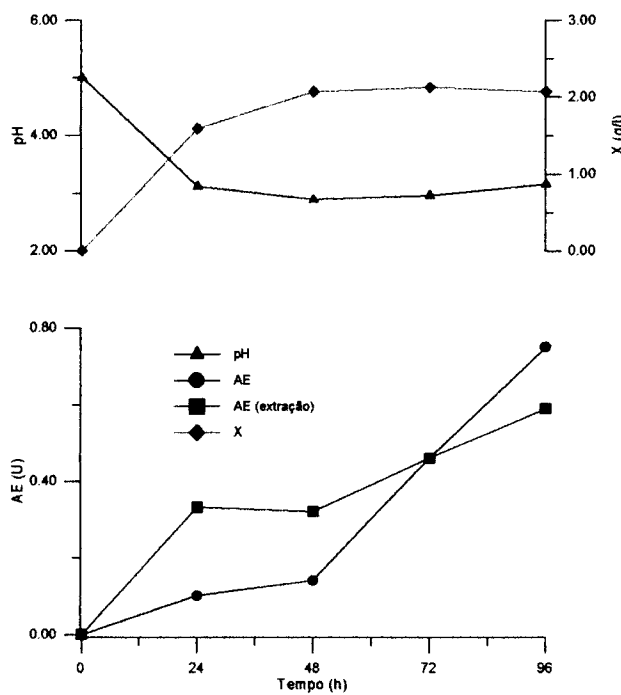


FIGURA B-6: Fermentação de óleo-diesel comercial por *Sacharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da percentagem de óleo-diesel de 3% com 2,5 g/l de NH₄Cl.

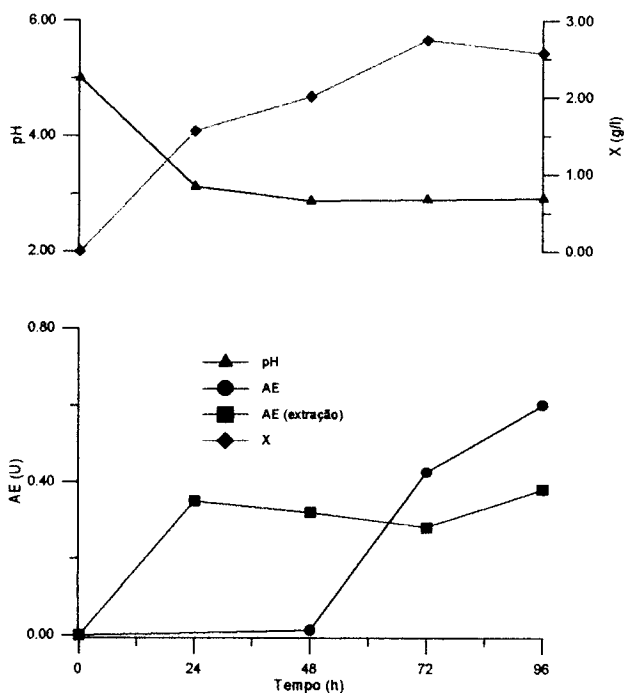


FIGURA B-7: Fermentação de óleo-diesel comercial por *Sacharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da percentagem de óleo-diesel de 5% com 2,5 g/l de NH_4Cl .

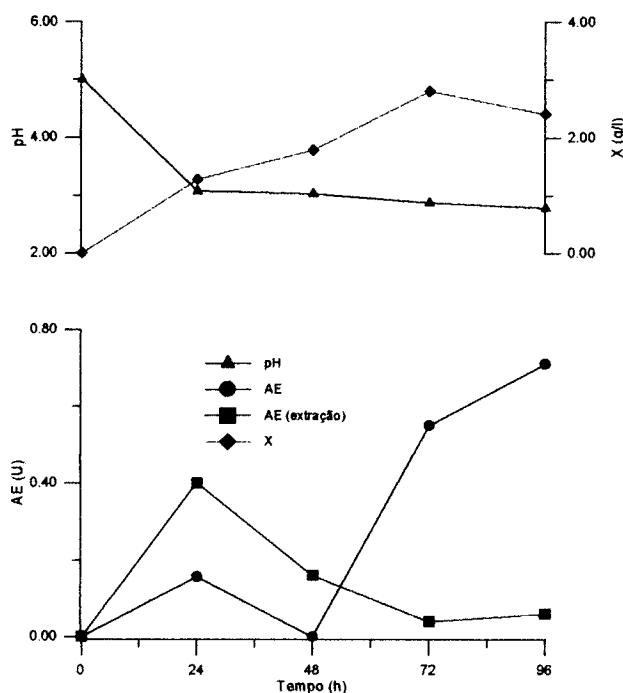


FIGURA B-8: Fermentação de óleo-diesel comercial por *Sacharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da percentagem de óleo-diesel de 7% com 2,5 g/l de NH_4Cl .

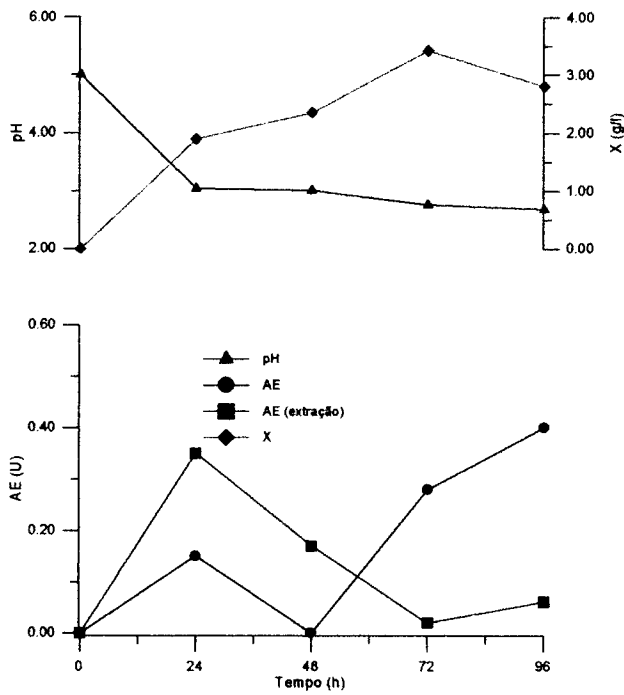


FIGURA B-9: Fermentação de óleo-diesel comercial por *Sacharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da percentagem de óleo-diesel de 10% com 2,5 g/l de NH_4Cl .

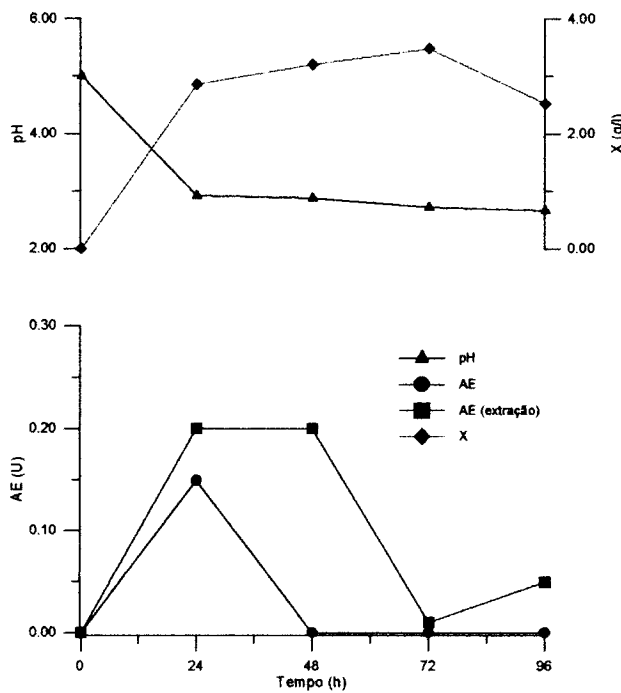


FIGURA B-10: Fermentação de óleo-diesel comercial por *Sacharomyces lipolytica* CCT 0913. Efeito da percentagem de óleo-diesel de 15% com 2,5 g/l de NH_4Cl .

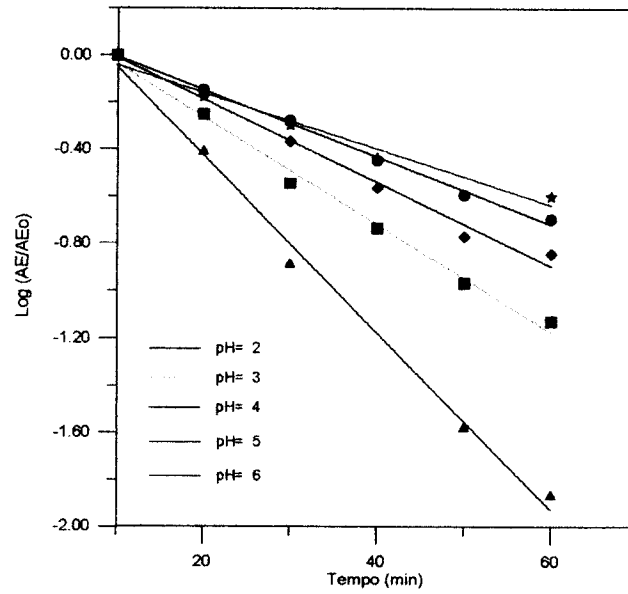


FIGURA B-11a: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 30°C.

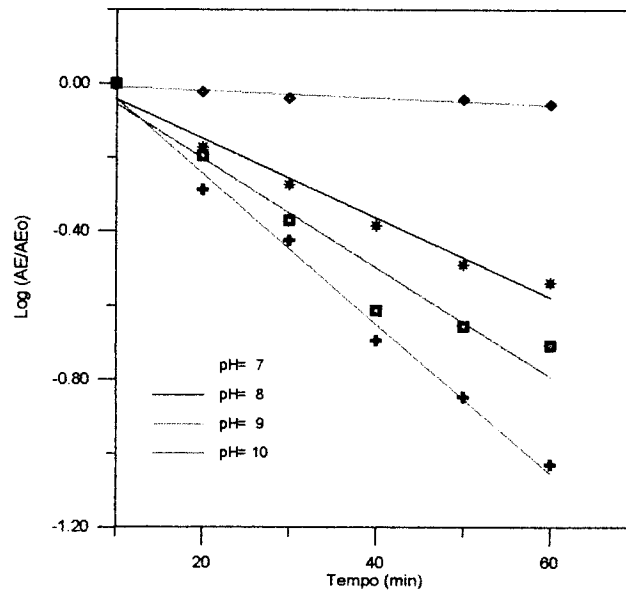


FIGURA B-11b: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 30°C.

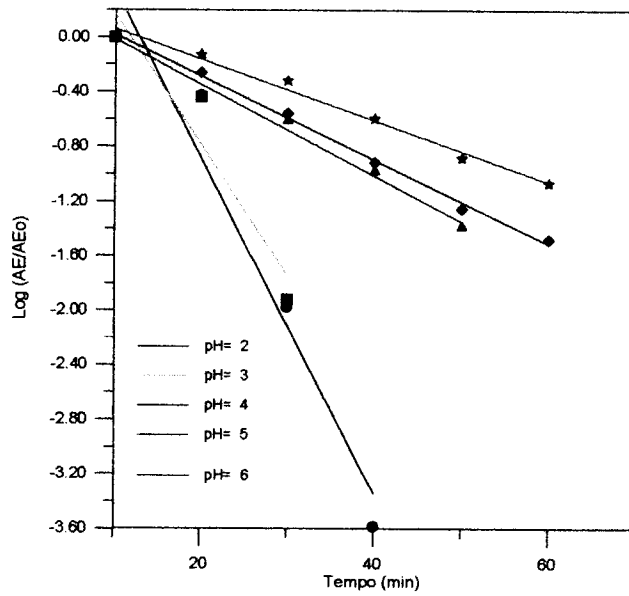


FIGURA B-12a: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 40°C.

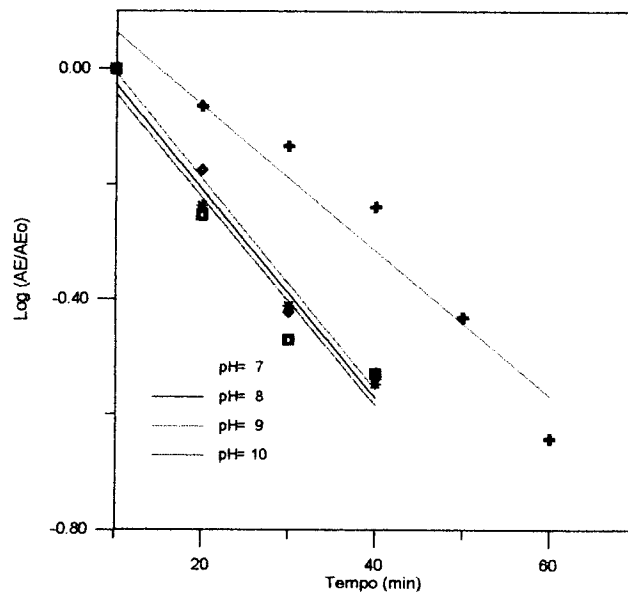


FIGURA B-12b: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 40°C.

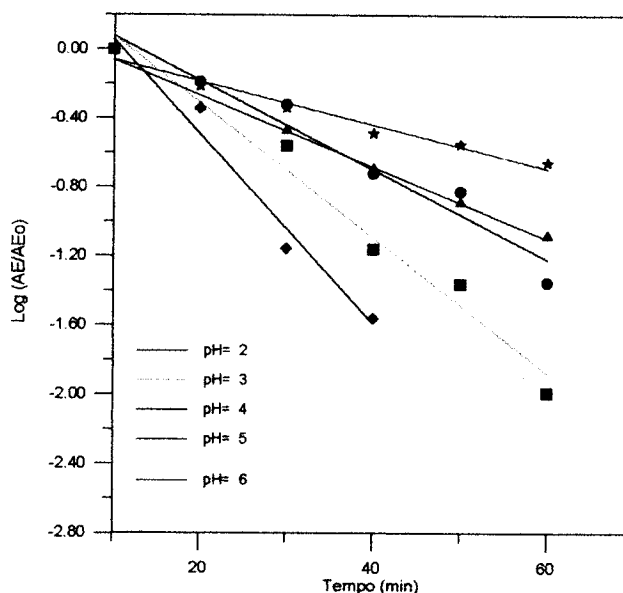


FIGURA B-13a: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 50°C.

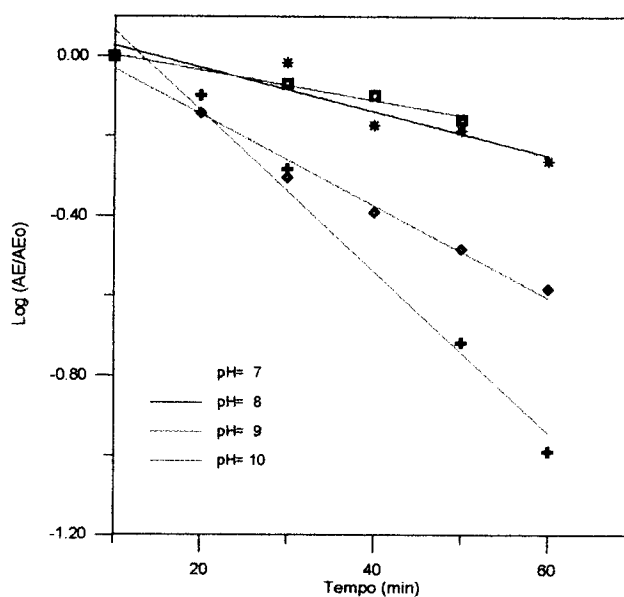


FIGURA B-13b: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 50°C.

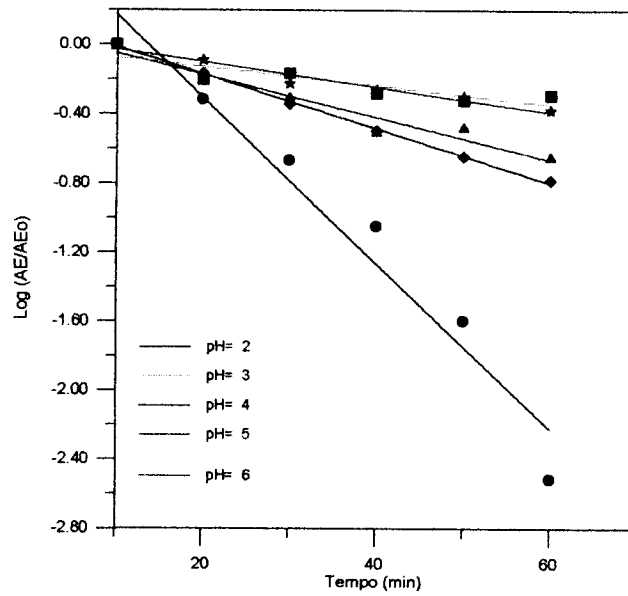


FIGURA B-14a: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 60°C.

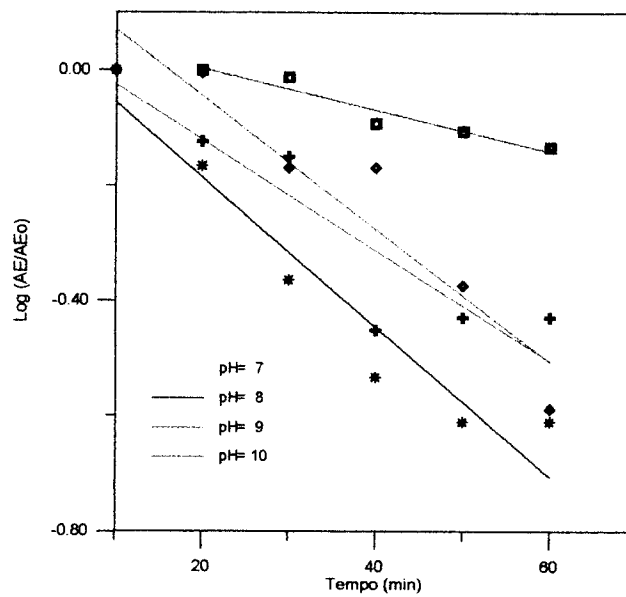


FIGURA B-14b: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a 60°C.

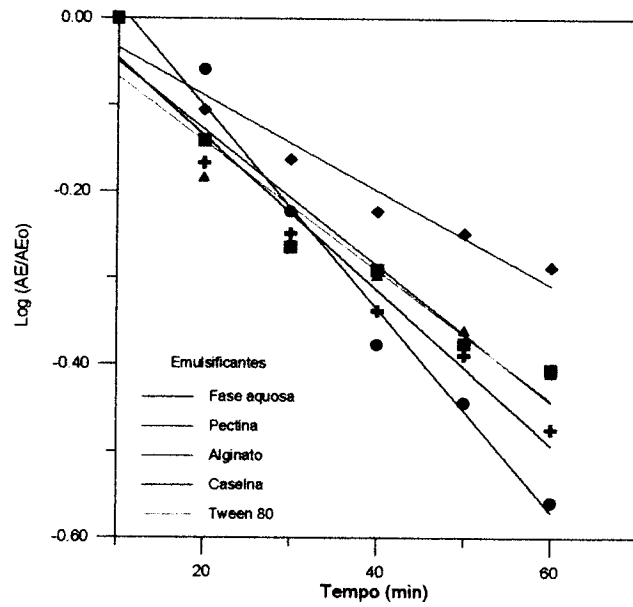


FIGURA B-15: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por emulsificantes a pH 6 e 50°C.

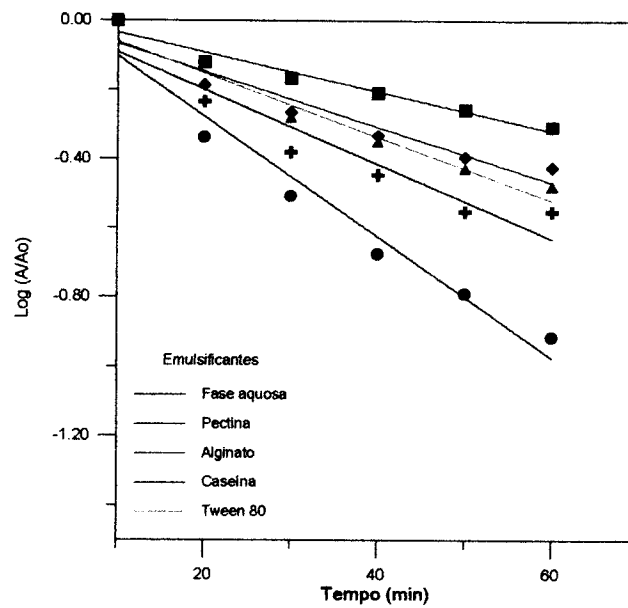


FIGURA B-16: Determinação da constante de decaimento da emulsão óleo-diesel em água estabilizada por emulsificantes a pH 7 e 60°C.

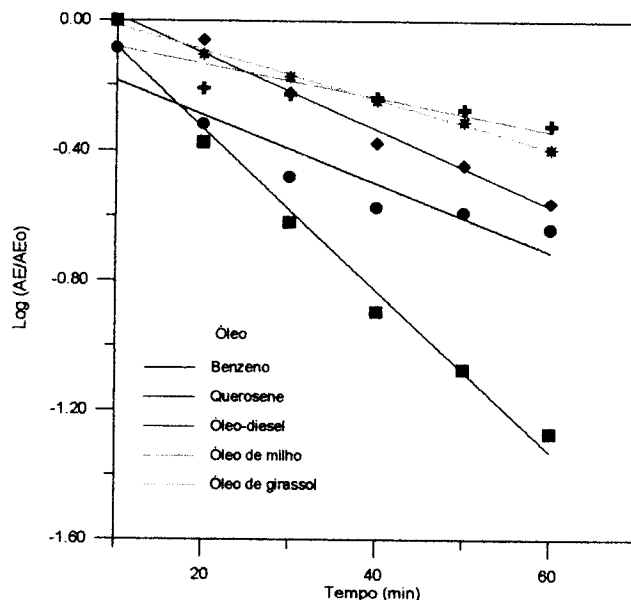


FIGURA B-17a: Determinação da constante de decaimento de emulsões óleo em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a pH 6 e 50°C.

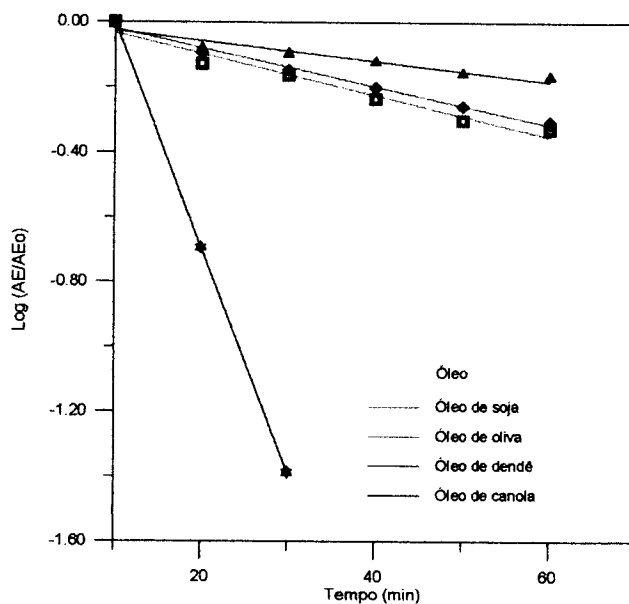


FIGURA B-17b: Determinação da constante de decaimento de emulsões óleo em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a pH 6 e 50°C.

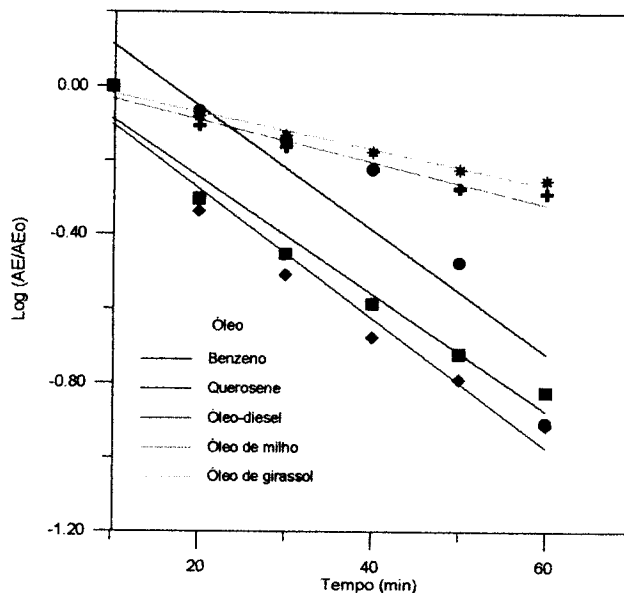


FIGURA B-18a: Determinação da constante de decaimento de emulsões óleo em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a pH 7 e 60°C.

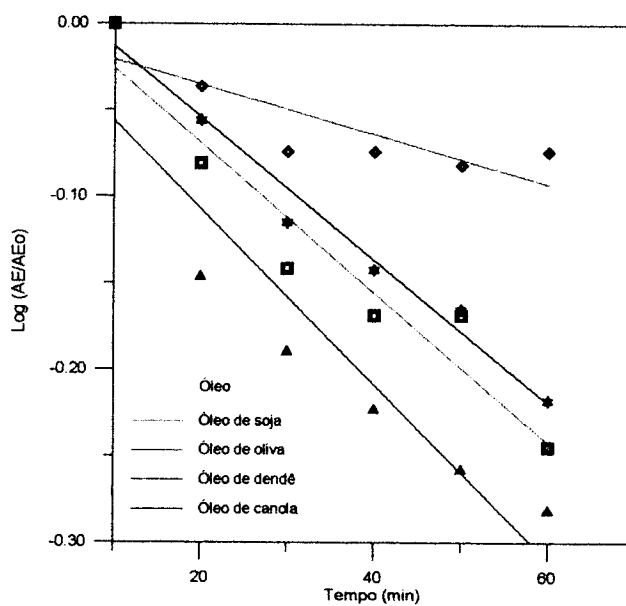


FIGURA B-18b: Determinação da constante de decaimento de emulsões óleo em água estabilizada por bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913 a pH 7 e 60°C.

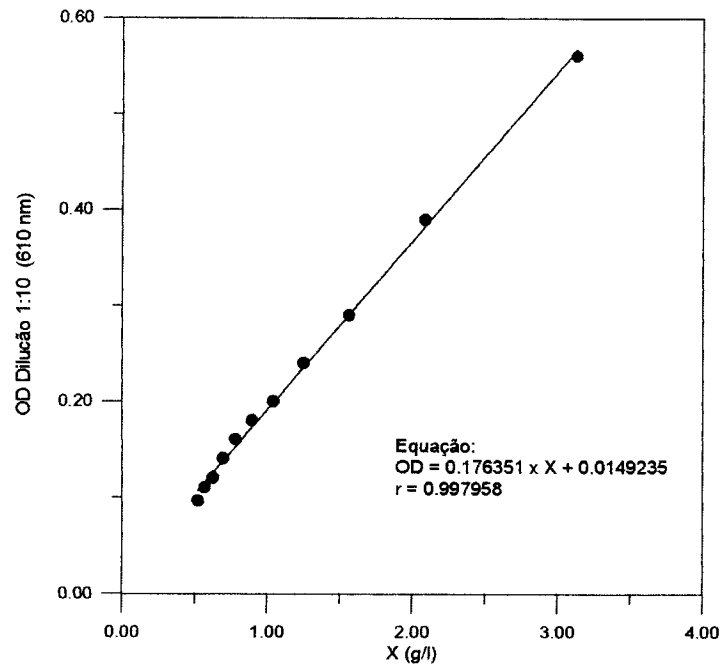


FIGURA B-19: Curva padrão de massa celular seca.

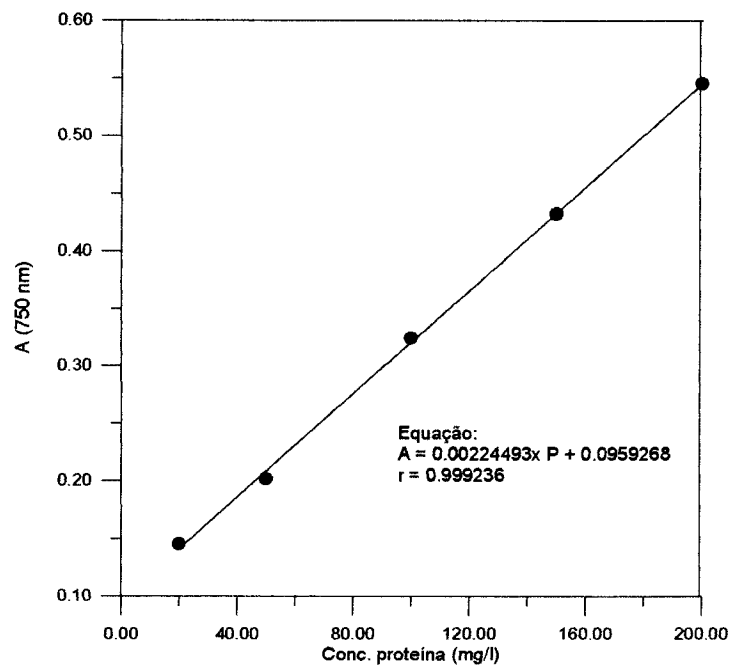


FIGURA B-20: Curva padrão de proteína.

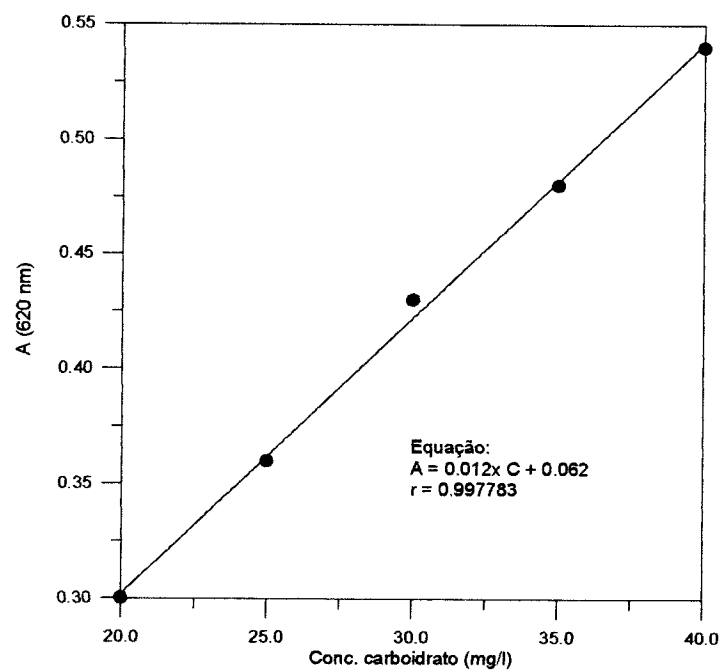


FIGURA B-21: Curva padrão de carboidrato.

APÉNDICE C

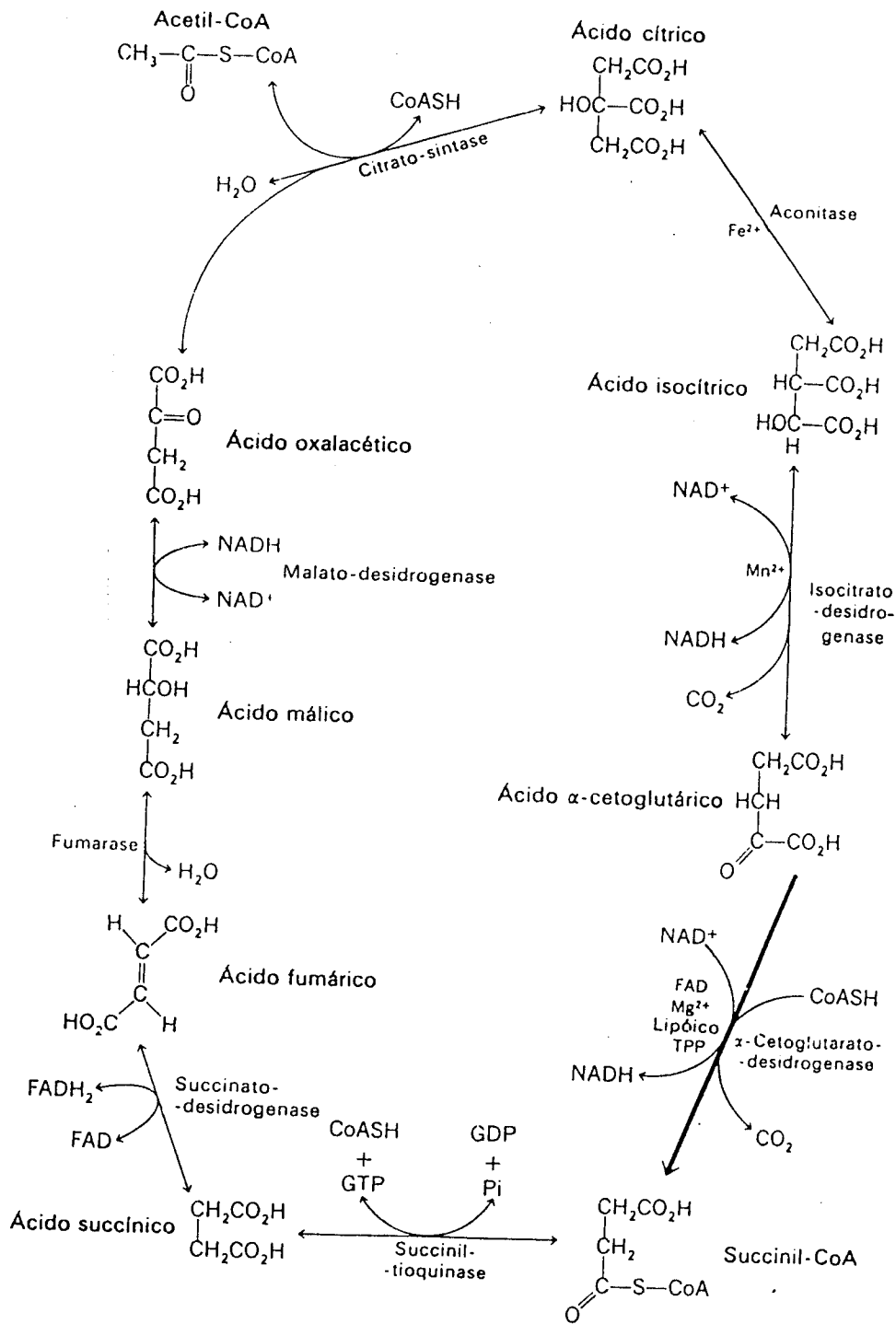


FIGURA C-1: Ciclo de Krebs. Fonte: CONN & STUMPF, 1980.

APÉNDICE D

As tabelas mostradas abaixo referem-se ao procedimento de limpeza de membrana de ultrafiltração utilizando-se fase aquosa de cultura de *Saccharomyces lipolytica* CCT 0913.

TABELA D- 1: Vazão da membrana limpa.

Amostra	Massa água (g)	Tempo (min)	Q (g/min)	
1	31,6595	1,0092	31,3709	\bar{Q} 31,5741± 0,0357
2	31,5300	1,0072	31,3046	
3	31,5741	1,0068	31,3608	
% de limpeza = 100%				
Q - vazão				

TABELA D-2: Vazão da membrana obstruída.

Amostra	Massa água (g)	Tempo (min)	Q (g/min)	
1	11,3022	5,0080	2,2568	\bar{Q} 2,3293± 0,0687
2	11,6980	5,0045	2,3375	
3	11,9808	5,0055	2,3935	
% de obstrução = 92,57%				
Q - vazão				

TABELA D-3: Determinação da percentagem de limpeza com NaOH 2N a 80°C por 30 min.

Amostra	Massa água (g)	Tempo (min)	Q (g/min)	
1	10,2254	1,0060	10,1644	\bar{Q} 10,4525± 0,2650
2	10,5627	1,0053	10,5070	
3	10,7694	1,0078	10,6860	
% de limpeza = 33,35%				
Q - vazão				

TABELA D-4: Determinação da percentagem de limpeza com HNO₃ 0,5% a 55°C por 30 min.

Amostra	Massa água (g)	Tempo (min)	Q (g/min)	
1	8,7364	1,0082	8,6653	\bar{Q} 8,6506± 0,0608
2	8,6379	1,0063	8,5838	
3	8,7708	1,0078	8,7029	
% de limpeza = 27,60%				
Q - vazão				

TABELA D-5: Determinação da percentagem de limpeza com NaClO 300ppm a 50°C por 30 min.

Amostra	Massa água (g)	Tempo (min)	Q (g/min)	
1	11,4559	1,0073	11,3729	\bar{Q} 11,5451± 0,1518
2	11,6749	1,0062	11,6030	
3	11,7201	1,0052	11,6595	
% de limpeza = 36,83%				
Q - vazão				

TABELA D-6: Determinação da percentagem de limpeza com procedimento usual.

Passo	Vazão (g/min)	Limpeza (%)
NaOH	10,4525	33,53
HNO ₃	8,6506	27,60
NaClO	11,5451	36,83

TABELA D-7: Vazão da membrana obstruída.

Amostra	Massa água (g)	Tempo (min)	Q (g/min)	
1	3,1323	1,0073	3,1096	\bar{Q} 3,0549± 0,0717
2	3,0958	1,0047	3,0813	
3	2,6621	1,0062	2,9737	
% de obstrução = 90,25%				
Q - vazão				

TABELA D-8: Determinação da percentagem de limpeza utilizando-se bioemulsificante.

Amostra	Massa água (g)	Tempo de coleta (min)	Q (g/min)
1	2,8459	0	2,8459
2	1,8353	10	1,8353
3	1,6817	20	1,6817
4	1,7132	30	1,7132
5	1,5169	40	1,5169
6	1,4823	50	1,4823
7	1,3603	60	1,3603

O bioemulsificante não apresentou propriedades de limpeza de membrana obstruída com leite