

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

TESE DE DOUTORADO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**“Produção, Purificação e Caracterização de biosurfactantes
produzidos por linhagens de *Bacillus subtilis*”**

**Tese apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos
Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do Título de Doutor
em Ciências de Alimentos**

**Cristine Fior Clemente dos Santos
Engenheira de Alimentos
Mestre em Ciências de Alimentos**

**Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore
Orientadora**

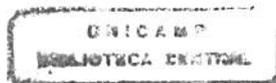
PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Cristine Fior Clemente dos Santos, aprovada pela Comissão Julgadora em 19 de abril de 2001.

Campinas, 19 de abril de 2001


Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
Presidente da Banca

UNICAMP
2001



852411008

UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	T/ UNICAMP		
	Sa59p		
V.	Ex.		
TOMBO BC/	45246		
PROC.	16-392102		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREC@	R\$ 11,00		
DATA	11/07/02		
N.º CPD			

CM00158108-0

Sa59p Santos, Cristine Fior Clemente dos
Produção, purificação e caracterização de biosurfactante
produzido por linhagens de *Bacillus subtilis* / Cristine Fior
Clemente dos Santos. – Campinas, SP: [s.n.], 2001.

Orientador: Glaucia Maria Pastore
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Fermentação. 2.Bacillus subtilis. 3.Tensão superficial.
I.Pastore, Glaucia Maria. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



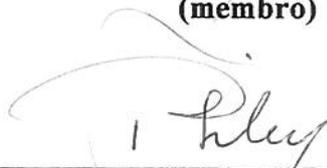
Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore
(orientadora)



Profa. Dra. Ângela Maria de Moraes
(membro)



Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte
(membro)



Profa. Dr. Roberto Da Silva
(membro)

Profa. Dr. José Luiz Pereira
(membro)



Profa. Dr. Yong K. Park
(membro)

Profa. Dr. César Costapinto Santana
(membro)

Campinas, de de 2001.

*À Deus
Dedico.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais Luiz e Mariza, pelo amor, força, carinho e compreensão

À minha avó Antonieta, por todo amor e confiança

À minha prima, Maria Carolina dos Santos pela ajuda e apoio quando mais precisei

À minha querida orientadora e amiga Profa Glaucia Maria Pastore pelos ensinamentos, confiança e apoio durante todos estes anos

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore pela orientação e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho,

Aos membros da banca examinadora, Prof. José Luiz Pereira, Profa. Ângela Maria Moraes, Prof. Yong K. Park, Prof. Roberto Da Silva, Pesquisadora Marta Cristina Teixeira Duarte e Professor César Costa Pinto Santana, pela dedicada atenção e valioso auxílio na elaboração final deste trabalho,

Aos Professores Yong K. Park e Hélia Harumi Sato pelo auxílio de dedicação e pesquisa,

Ao Professor César Costa Pinto Santana, por ter permitido que eu usasse seu laboratório sem o qual não seria possível a realização deste,

Aos Pesquisadores Alexandre e Marta, do Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agropecuárias (CPQBA) da Unicamp, Divisão de Microbiologia, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho,

Ao meu grande amigo e técnico Francisco Carraro pela amizade e pela ajuda pela realização de parte essencial deste trabalho,

À Fapesp, pelo financiamento da pesquisa e apoio técnico e financeiro,

À Maria das Dores de Oliveira pela amizade e dedicação,

Aos funcionários da Biblioteca, Creusa, Marli, Cláudia, Geraldo, José e Toninho (*in memorium*), pela colaboração e amizade,

À Cosme da Secretaria de Pós-graduação pela atenção e amizade,

À Gaby Tiemi Suzuki, pela ajuda e amizade

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica de Alimentos, Lucimara, Cristina, Marcia, Massaharu, Severino, Luciana, Fabiana, Rogê, Roseli, Ivan, Heinz e todos que em algum momento me prestaram ajuda

À minha grande amiga e técnica, Beatriz, por toda amizade, carinho e suporte emocional

E a todos aqueles que em algum momento me prestaram ajuda, gostaria de coração, de dizer: Muito Obrigada

PERSEVERANÇA

*Durante minha caminhada
me mandaram desistir
mas eu como sou danada
fingi nada ouvir.
Durante caminhada
me disseram
que eu não chegaria...
ao fim da estrada,
e eu quase me ofendi...
E foi quando tropecei,
e então machucada
descobri...
que e nada era mais importante
a não ser que eu,
apenas eu,
acreditasse em mim.*

Cristine Fior Clemente dos Santos

SUMÁRIO

Biosurfactantes* são compostos produzidos por microrganismos os quais possuem em sua molécula uma parte hidrofílica (solúvel em água, e uma parte hidrofóbica (solúveis em soluções oleosas). Devido a tal propriedade, os biosurfactantes podem ser utilizados como emulsificantes, para recuperação de óleo, minerais e contaminantes de solo e como removedor de tais materias de equipamentos durante o processo industrial.

Neste trabalho foi estudado a produção de um biosurfactante lipoproteico, conhecido como surfactina por três linhagens de microrganismos. Estes microrganismos estudados foram pré-isolado como produtores de biosurfactante em trabalhos anteriores, e foram identificados nesta dissertação como sendo *Bacillus subtilis*. Foram estudadas então, as melhores condições para produção deste biosurfactante em agitador rotativo, e estudou-se sua produção em fermentadores de bancada e piloto. Além disso, foram estudadas algumas propriedades como capacidade emulsificante, e estabilidade em diversos pHs, concentrações de NaCl e diferentes temperaturas, e antimicrobiana, para o biosurfactante produzido por cada uma das linhagens estudadas. Finalmente, também foi realizado um prévio estudo da estrutura dos biosurfactantes produzidos, através de análises químicas e estruturais .

* Biosurfactante = tradução do inglês Biosurfactant (tradução utilizada pela comunidade científica, ou “Biossurfatante”, tradução etiológica da palavra na gramática portuguesa

SUMMARY

Biosurfactants*, produced by microorganisms, are compounds that have in their moiety a hydrophilic portion (water-soluble) and a hydrophobic portion (oil-soluble). Biosurfactants can be used as emulsifiers for oil, minerals, and contaminant recovery, and to remove these kinds of materials from equipment in industrial production.

The production of lipoproteic biosurfactants produced by three strains of microorganisms was studied. We refer to the product as surfactin. The three strains considered in this work, isolated in previous studies, were identified in this research as *B. subtilis*. The best conditions for biosurfactant production in shake flasks and in lab and pilot fermenters were studied. For the biosurfactant produced by each strain, physical and chemical properties, emulsification capacity, stability at different pH values, NaCl content, different temperatures, and some antimicrobial properties were examined. Finally, a previous study of the biosurfactant's structure was investigated using chemical and structural analysis.

*Biosurfactants = Biosurfactante (tradução para o português utilizada pela comunidade científica), ou "Biossurfatante", tradução etiológica da palavra na gramática portuguesa

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	2
2.1 Características, propriedades e vantagens dos biosurfactantes	2
2.2 Tipos de biosurfactantes e Microrganismos produtores	3
2.3 Isolamento de linhagens produtoras de biosurfactantes	8
2.4 Produção de biosurfactantes: rotas metabólicas e fatores que influenciam a produção	9
2.5 Composição do meio de cultivo para a produção de biosurfactantes	10
2.5.1 Efeito da fonte de carbono na produção de biosurfactante	10
2.5.2 Efeito da fonte de nitrogênio e minerais na produção de biosurfactante	13
2.6 Recuperação e purificação dos biosurfactantes	14
2.7 Caracterização estrutural dos biosurfactantes	15
2.8 Surfactina: biosurfactante produzido por linhagens de <i>B. subtilis</i>	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 Materiais	19
3.1.1 Microrganismos	19
3.1.2 Meios de cultura	19
3.1.3 Equipamentos	19
3.1.4 Reagentes	20
3.2 Métodos	21
3.2.1 Identificação do Microrganismo produtor	21
3.2.1.2 Características Morfológicas	21
3.2.1.3 Características Microscópicas das Culturas	22
3.2.1.4 Características Fisiológicas	22
3.2.1.4.1 Determinação da temperatura ótima de crescimento	22
3.2.1.4.2 Requerimento de oxigênio	22
3.2.1.4.3 Teste de Osmotolerância : requerimento de cloreto de sódio	23
3.2.1.5 Características Bioquímicas	24
3.2.1.5.1 Hidrólise do Amido	24
3.2.1.5.2 Hidrólise da Caseína	24
3.2.1.5.3 Hidrólise da Gelatina	25
3.2.1.5.4 Produção de Catalase	25
3.2.1.5.5 Produção de Citocromo Oxidase	26
3.2.1.5.6 Redução de Nitrato a Nitrito	26
3.2.1.5.7 Teste de ONPG (O-nitrofenil B-D-galactosídeo)	27
3.2.1.5.8 Desaminação da Fenilalanina	27
3.2.1.5.9 Degradação da Tirosina	28
3.2.1.5.10 Prova do Indol	28
3.2.1.5.11 Utilização do Citrato	28

3.2.1.5.12 Prova de Voges-Proskauer	29
3.2.1.5.13 Teste de Descarboxilase	30
3.2.1.5.14 Prova da Urease	30
3.2.1.5.15 Produção de ácidos a partir de carboidratos	30
3.2.2 Estudo do Processo Fermentativo	31
3.2.2.1. Estudo do processo fermentativo para a obtenção de biosurfactante em agitador rotativo – Composição do meio basal	31
3.2.2.2. Determinação da Massa Celular e Massa de Extrato Bruto por gravimetria	32
3.2.2.3. Precipitação Ácida do Biosurfactante produzido	32
3.2.2.4. Determinação da Tensão Superficial	32
3.2.2.5. Determinação da Tensão Interfacial	33
3.2.2.6 Influência da Temperatura de Incubação na Produção de Biosurfactante	34
3.2.2.7 Influência do pH na Produção de Biosurfactante	34
3.2.2.8 Influência da Concentração de NaCl na Produção de Biosurfactante	35
3.2.2.9 Influência de uma fonte de nitrogênio (orgânica ou inorgânica) na produção de biosurfactante	35
3.2.2.10 Influência de minerais na produção de biosurfactantes	36
3.2.2.11 Influência da fonte de carbono na produção de biosurfactantes	36
3.2.2.12. Influência da fonte de nitrogênio composta na produção de biosurfactantes	37
3.2.2.13 Determinação da melhor relação C/N para produção de Biosurfactantes	37
3.2.2.14. Influência da adição de petróleo e de hidrocarbonetos com diferentes tamanhos de cadeia na produção de biosurfactantes	37
3.2.2.16 Utilização de resíduos industriais de processamento de alimentos como fonte de carbono para produção de biosurfactante	39
3.2.16.1 Resíduos industriais provenientes do abate de bovino e suínos : resíduos constituídos de 70% de gordura bovina e 30% de gordura suína.	39
3.2.17 Comparação entre a produção de biosurfactante produzido em meio basal e manipueira	40
3.3 Atividade Emulsificante dos Biosurfactantes produzidos	41
3.4 Concentração e Purificação do Extrato Bruto de Biosurfactante	42
3.4.1 Concentração do biosurfactante produzido e pré-purificação através do processo de ultrafiltração com membranas	42
3.4.2 Avaliação da eficiência da ultrafiltração	42
3.5 Determinação de glicose pelo método da glicose oxidase em meio basal e manipueira ao longo do processo fermentativo para cada uma das linhagens estudadas.	43
3.6 Produção de biosurfactante em fermentador	44

3.6.1	Produção de biosurfactante em fermentador de bancada	44
3.6.1.1	Preparação do pré-inóculo para produção de biosurfactante em fermentador de bancada	44
3.6.1.2	Produção descontínua de biosurfactante em fermentador de bancada	45
3.6.1.3	Determinação do KLa (coeficiente de transferência de oxigênio) para cada uma das linhagens estudadas em fermentador de bancada	45
3.6.1.4	Coleta do biosurfactante produzido em meio basal em fermentador de bancada pelo fracionamento da espuma coletada	46
3.6.2	Produção de biosurfactante em fermentador piloto	46
3.6.2.1	Preparo do pré-inóculo	46
3.6.2.2	Produção Descontínua de biosurfactante em Fermentador piloto	47
3.6.2.3	Determinação do KLa (coeficiente de transferência de oxigênio) para cada uma das linhagens estudadas em fermentador piloto	48
3.6.2.4	Coleta do biosurfactante produzido em meio basal em fermentador piloto pelo fracionamento da espuma coletada	48
3.6.2.5	Modelo de planta piloto para a produção descontínua de biosurfactante em Fermentador piloto	49
3.7	Determinação das propriedades tensoativas dos biosurfactantes produzidos pelas três linhagens produtoras em meio basal e manipueira	49
3.7.1	Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)	49
3.7.2	Determinação da Concentração Micelar Diluída (CMD)	50
3.8	Determinação do teor de proteína do biosurfactante concentrado por ultrafiltração	50
3.8.1	Determinação proteica pelo método de Lowry dos biosurfactantes concentrados através da ultrafiltração	50
3.9	Análise dos aminoácidos presentes no biosurfactante produzidos em meio basal e manipueira	51
3.9.1	Hidrólise da proteína em aminoácidos livres	51
3.9.2	Análise da composição dos aminoácidos nas amostras de biosurfactante após hidrólise da parte proteica em aminoácidos livres	51
3.10	Purificação dos biosurfactantes produzidos através do fracionamento da espuma	52
3.11	Quantificação dos biosurfactantes produzidos utilizando HPLC	53
3.12.	Determinação do peso molecular dos biosurfactantes produzidos utilizando Espectrometria de massa de Bombardeamento rápido (FAB)	53
3.13	Influência da surfactina na produção de α -amilase produzidas por linhagens do gênero <i>Bacillus</i>	54
3.13.1	Manutenção da linhagem	54
3.13.2	Produção de α -amilases	54
3.13.3	Influência da adição da surfactina e surfactante sintéticos como indutores na produção de α -amilase em diferentes tempos de fermentação	55

3.13.4	Influência da adição da surfactina e surfactante sintéticos como indutores na produção de α -amilase em diferentes concentrações	55
3.13.5	Determinação da atividade da α -amilase pelo método DNS*	55
3.14	Estabilidade do biosurfactante produzido em diversas condições de pH, temperatura e concentrações de NaCl	56
3.14.1	Estabilidade térmica	56
3.14.1.1	Determinação da estabilidade do biosurfactante bruto em diferentes temperaturas em diversos tempos de tratamento	56
3.14.1.2	Estabilidade dos biosurfactantes produzidos à autoclavagem seguida de refrigeração	57
3.14.2	Estabilidade e atividade do Biosurfactante em diferentes pHs	57
3.14.3	Estabilidade do biosurfactante em soluções com diversas concentrações de NaCl.	57
3.15.	Atividade microbiológica dos biosurfactantes e antibióticos produzidos pelas linhagens estudadas	58
3.15.1	Preparação dos extratos com propriedades antimicrobiana	58
3.15.1.1	Preparação do extrato de surfactina	58
3.15.1.2	Preparação do extrato de antibiótico produzido simultaneamente a surfactina	59
3.15.1.3	Preparação das culturas de microorganismos para os testes de atividade antimicrobiana	59
3.15.1.4	Detecção da atividade antibiótica	60
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
4.1	Identificação do Microorganismo produtor de Biosurfactante	61
4.1.1	Característica Morfológicas	61
4.1.1.1	Morfologia Macroscópica das colônias	61
4.1.1.2	Características Microscópicas da Cultura	63
4.1.2	Características Fisiológicas	67
4.1.2.1	Determinação da Temperatura ótima de Crescimento:	67
4.1.2.2	Requerimento de Oxigênio:	68
4.1.2.3	Teste de Osmotolerância	69
4.1.3	Características Bioquímicas	70
4.1.4	Produção de ácidos a partir de carboidratos - kit API 50CHB	74
4.2	Estudo do Processo Fermentativo	81
4.2.1	Efeito do biosurfactante produzido pelas linhagen de <i>B. subtilis</i> sobre a tensão superficial do meio	81
4.2.1.1.	Influência da Temperatura na produção de biosurfactante	82
4.2.1.2	Influência do pH na produção de biosurfactante	84
4.2.1.3.	Influência da concentração de NaCl na produção de biosurfactante	86
4.2.1.4	Influência da fonte de nitrogênio simples na produção de biosurfactante	88
4.2.1.5	Influência de combinações de fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas na produção de biosurfactante	90

4.2.1.6	Influência da suplementação do meio basal com elementos traços (sais minerais) na produção de biosurfactantes em meio basal	93
4.2.1.7	Influência da fonte de carbono na produção de biosurfactante	96
4.2.1.8	Influência da relação C/N na produção de biosurfactante	98
4.2.1.9	Estudo da adição de hidrocarbonetos e compostos insolúveis ao meio de cultura com ação indutora na produção de biosurfactantes	100
4.2.1.10	Influência do Tempo de Fermentação na Produção de Biosurfactante	103
4.2.1.11	Utilização de resíduos industriais de processamento de alimentos como fonte de carbono para produção de biosurfactante	106
4.2.1.11.1	Resíduos industriais provenientes do abate de bovino e suínos : resíduos constituídos de 70% de gordura bovina e 30% de gordura suína.	106
4.2.1.11.2	Resíduo proveniente do processamento de farinha de mandioca (manipueira)	107
4.2.1.11.2.1	Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em manipueira	110
4.2.1.11.2.1.1	Comparação entre a produção de biosurfactante pelas linhagens produtoras em meio basal sintético e em manipueira	110
4.2.1.11.2.1.2	Curva de crescimento das linhagens produtoras de biosurfactante cultivadas em manipueira	112
4.2.1.11.2.1.3	Consumo de glicose durante o crescimento celular da linhagens produtoras de biosurfactante em meio basal e manipueira, em agitador rotativo	116
4.2.1.12	Propriedades tensoativas do meio de cultura basal fermentado em agitador rotativo após remoção das células	118
4.3	Teste de emulsificação	120
4.4	Pré-purificação do biosurfactante produzido utilizando o processo de ultrafiltração	123
4.4.1	Pré-purificação do biosurfactante produzido em meio basal	123
4.4.2	Pré-purificação do biosurfactante produzido em manipueira	126
4.4.3	Análise do teor de proteína presente no retido e no permeado (YM30) em meio basal e manipueira	128
4.5	Determinação da tensão interfacial do meio basal e manipueira contra hexadecano	129
4.6	Produção de biosurfactante em meio basal utilizando fermentadores: de bancada e piloto	131
4.6.1	Produção de biosurfactante utilizando fermentador de bancada	131
4.6.1.1	Efeito do tempo de incubação na produção de biosurfactante em meio basal utilizando fermentador de bancada	131
4.6.1.2	Propriedades tensoativas do meio de cultura basal fermentado em fermentador de bancada	133

4.6.1.3 Propriedades do biosurfactante produzido pelas linhagens de <i>B.subtilis</i> em fermentador de bancada	136
4.6.1.4 Cálculo do coeficiente de transferência de oxigênio (KLa), durante a fermentação pelas linhagens de <i>B.subtilis</i> produtoras de biosurfactante em meio basal utilizando fermentador piloto	138
4.6.2 Produção de surfactina em Fermentador Piloto	141
4.6.2.1 Efeito do tempo de incubação na produção de biosurfactante em meio basal utilizando fermentador piloto	141
4.6.2.2 Consumo e transferência de oxigênio pelas linhagens de <i>B. subtilis</i> produtoras de surfactina durante ensaio em fermentador piloto	145
4.6.2.4 Aumento de escala para a produção de surfactina	148
4.7 Determinação da concentração micelar crítica dos biosurfactantes produzidos em meio basal em diferentes processos fermentativos	150
4.8 Análise quantitativa da surfactina produzida por HPLC	155
4.9 Análise da estrutura dos biosurfactantes produzidos por FAB-MS	166
4.10 Influência da Surfactina na Produção de α -Amilase por Linhagens de <i>Bacillus</i>	170
4.10.1 Produção de α -amilases por linhagens do gênero <i>Bacillus</i>	170
4.11 Análise de aminoácidos do biosurfactante bruto produzido pelas linhagens de <i>B. subtilis</i> produtoras de biosurfactante	174
4.12 Estabilidade do biosurfactante bruto produzidos pelas linhagens estudadas	180
4.12.1. TERMOESTABILIDADE	180
4.12.2 Estabilidade da propriedades tensoativas dos biosurfactantes diluídos em tampões de diferentes pHs.	182
4.12.3 Influência de diferentes concentrações de NaCl nas propriedades tensoativas dos biosurfactantes pelas linhagens de <i>B.subtilis</i> estudadas	184
4.12.4 Condições de inativação da capacidade tensoativa dos biosurfactantes produzidos - Autoclavagem do meio de cultura contendo biosurfactante	186
4.13 Atividade microbiológica dos biosurfactantes e antibióticos produzidos pelas linhagens estudadas	187
4.13.1 Atividade Anti-microbiana da Surfactina	187
4.13.2 Antibiótico produzido pelas linhagens de <i>B. subtilis</i>	192

5. CONCLUSAO	198
6. SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS	202
7.BIBLIOGRAFIA	203

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Biosurfactantes e ramos industriais de aplicação	3
TABELA 2: Principais tipos biosurfactantes produzidos e organismos produtores	6
TABELA 3: Propriedades dos principais surfactantes estudados	7
TABELA 4: Características Morfológicas das colônias	61
TABELA 5: Características Microscópicas das colônias	64
TABELA 6: Temperatura de crescimento	68
TABELA 7: Requerimento de oxigênio	69
TABELA 8: Teste de Osmotolerância: requerimento de NaCl	70
TABELA 9: Características Bioquímicas	71
TABELA 10: Produção de ácidos a partir de carboidratos – kit API 50CHB	75
TABELA 11: Determinação da espécie para as linhagens do gênero <i>Bacillus</i> , LB 262, LB-1993-A, LB-1993-B	80
TABELA 12: Produção de biosurfactante	81
TABELA 13: Produção de biosurfactante pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262 em função da fonte de nitrogênio	91
TABELA 14: Produção de biosurfactante pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A em função da fonte de nitrogênio	92
TABELA 15: Produção de biosurfactante pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B em função da fonte de nitrogênio	93
TABELA 16: Produção de biosurfactantes pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262 em função da suplementação do meio com elementos traços	95
TABELA 17: Produção de biosurfactantes pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A em função da suplementação do meio com elementos traços	95
TABELA 18: Produção de biosurfactantes pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B em função da suplementação do meio com elementos traços	95
TABELA 19: Influência da fonte de carbono na produção de biosurfactante pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	97
TABELA 20: Influência da fonte de carbono na produção de biosurfactante pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	97
TABELA 21: Influência da fonte de carbono na produção de biosurfactante pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	98
TABELA 22: Cálculo de % nitrogênio a ser adicionado ao meio basal para diferentes valores de C/N, fixando a fonte de carbono em 3%	99
TABELA 23: Influência da relação C/N na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	99
TABELA 24: Influência da relação C/N na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	100
TABELA 25: Influência da relação C/N na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	100
TABELA 26: Influência da adição de hidrocarbonetos e compostos insolúveis na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	102
TABELA 27: Influência da adição de hidrocarbonetos e compostos insolúveis na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	102

TABELA 28: Influência da adição de hidrocarbonetos e compostos insolúveis na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	103
TABELA 29: Utilização de resíduos industriais gordurosos na produção de biosurfactante pelas linhagens de <i>B. subtilis</i> LB-262, LB-1993A e LB-1993B	107
TABELA 30: Composição da manipueira utilizada como fonte de carbono para a produção de biosurfactante	109
TABELA 31: Utilização da manipueira como fonte de carbono para a produção de biosurfactante pela linhagem LB-262	109
TABELA 32: Utilização da manipueira como fonte de carbono para a produção de biosurfactante pela linhagem LB-1993A	109
TABELA 33: Utilização da manipueira como fonte de carbono para a produção de biosurfactante pela linhagem LB-1993B	110
TABELA 34: Influência do tempo de incubação na produção de biosurfactante em manipueira para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	114
TABELA 35: Influência do tempo de incubação na produção de biosurfactante em manipueira para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	115
TABELA 36: Influência do tempo de incubação na produção de biosurfactante em manipueira para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	115
TABELA 37: Emulsificação de compostos insolúveis com leitura de absorbância a 540nm	121
TABELA 38: Concentração do biosurfactante produzido pelas linhagens de <i>B. subtilis</i> LB-262, LB-1993A e LB-1993B, utilizando ultrafiltração com a membrana PM10	125
TABELA 39: Concentração do biosurfactante produzido pelas linhagens de <i>B. subtilis</i> LB-262, LB-1993A e LB-1993B, utilizando ultrafiltração com a membrana YM30	125
TABELA 40: Concentração do biosurfactante produzido pelas linhagens de <i>B. subtilis</i> LB-262, LB-1993A e LB-1993B, utilizando ultrafiltração com a membrana XM50	126
TABELA 41: Ultrafiltração do biosurfactante produzido em manipueira pela linhagens LB-262, LB-1993A e LB-1993B – membrana PM10	127
TABELA 42: Ultrafiltração do biosurfactante produzido em manipueira pela linhagens LB-262, LB-1993A e LB-1993B – membrana YM30	127
TABELA 43: Teor de proteína do retido e do permeado do meio basal fermentado pelas linhagens de <i>B. subtilis</i> LB-262, LB-1993A e LB-1993B – Membrana YM30	128
TABELA 44: Teor de proteína do retido e do permeado da manipueira fermentado pelas linhagens de <i>B. subtilis</i> LB-262, LB-1993A e LB-1993B – Membrana YM30	129
TABELA 45: Tensão interfacial do sistema hexadecano contra os meios basal e manipueira para as linhagens de <i>B. subtilis</i> produtoras de biosurfactante	130
TABELA 46: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em fermentador de bancada pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	132
TABELA 47: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em fermentador de bancada pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	132

TABELA 48: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em fermentador de bancada pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	132
TABELA 49: Propriedades do biosurfactante produzido pelas linhagens de <i>Bacillus subtilis</i> em fermentador de bancada através da coleta da espuma produzida	138
TABELA 50: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em meio basal utilizando fermentador piloto pela linhagem LB-262	142
TABELA 51: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em meio basal utilizando fermentador piloto pela linhagem LB-1993A	142
TABELA 52: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em meio basal utilizando fermentador piloto pela linhagem LB-1993B	142
TABELA 53: Formação de espuma e expulsão da surfactina na forma de espuma produzida pelas linhagens de <i>B. subtilis</i> em fermentador piloto	148
TABELA 54: Concentração micelar crítica do biosurfactante produzido em meio basal por <i>B. subtilis</i> LB-262	153
TABELA 55: Concentração micelar crítica do biosurfactante produzido em meio basal por <i>B. subtilis</i> LB-1993A	153
TABELA 56: Concentração micelar crítica do biosurfactante produzido em meio basal por <i>B. subtilis</i> LB-1993B	154
TABELA 57: Concentração Micelar Crítica (CMC) de biosurfactante com manipueira pelas linhagens de <i>B. subtilis</i> LB-262, LB-1993A, e LB-1993B	154
TABELA 58: Cálculo da concentração micelar crítica da surfactina produzida em meio basal (diferentes processos de produção) e em manipueira (agitador rotativo)	155
TABELA 59: Tempo de retenção dos picos constituintes da surfactina produzida pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	157
TABELA 60: Tempo de retenção dos picos constituintes da surfactina produzida pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	158
TABELA 61: Tempo de retenção dos picos constituintes da surfactina produzida pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	158
TABELA 62: % de cada pico constituinte da surfactina produzida pela linhagem de <i>Bacillus subtilis</i> LB-262	158
TABELA 63: % de cada pico constituinte da surfactina produzida pela linhagem de <i>Bacillus subtilis</i> LB-1993A	159
TABELA 64: % de cada pico constituinte da surfactina produzida pela linhagem de <i>Bacillus subtilis</i> LB-1993B	159
TABELA 65: Quantidade de surfactina produzida em meio basal pelas linhagens estudadas em diferentes processos de fermentativos	166
TABELA 66: Composição em aminoácidos presentes no extrato bruto de biosurfactante produzidos em meio basal e manipueira após fermentação (mg aa/mg proteína)	175
TABELA 67: Estabilidade do biosurfactante bruto em tampão fosfato pH 6,0 produzido pelas linhagens estudadas após tratamento térmico em banho de 50°C	181
TABELA 68: Estabilidade do biosurfactante bruto em tampão fosfato pH 6,0 produzido pelas linhagens estudadas após tratamento térmico em banho de 70°C	181

TABELA 69: Estabilidade do biosurfactante bruto em tampão fosfato pH 6,0 produzido pelas linhagens estudadas após tratamento térmico em banho de 90°C	182
TABELA 70: Propriedades tensoativas dos biosurfactantes produzidos pela linhagem LB-262 diluídos em tampões de diferentes pHs	183
TABELA 71: Propriedades tensoativas dos biosurfactantes produzidos pela linhagem LB-1993A diluídos em tampões de diferentes pHs	183
TABELA 72: Propriedades tensoativas dos biosurfactantes produzidos pela linhagem LB-1993B diluídos em tampões de diferentes pHs	184
TABELA 73: Influência de diferentes concentrações de NaCl nas propriedades tensoativas dos biosurfactantes produzidos pelas linhagens de <i>Bacillus subtilis</i> LB 262	185
TABELA 74: Influência de diferentes concentrações de NaCl nas propriedades tensoativas dos biosurfactantes produzidos pelas linhagens de <i>Bacillus subtilis</i> LB 1993A	185
TABELA 75: Influência de diferentes concentrações de NaCl nas propriedades tensoativas dos biosurfactantes produzidos pelas linhagens de <i>Bacillus subtilis</i> LB 1993B	185
TABELA 76: Condições de inativação da capacidade tensoativa dos biosurfactantes produzidos – Autoclavagem do meio de cultura contendo biosurfactante	186

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Morfologia das colônias da linhagem LB-162 após 48h de incubação, a 30°C em ágar nutriente	62
FIGURA 2: Morfologia das colônias da linhagem LB-1993A após 48h de incubação, a 30°C em ágar nutriente	62
FIGURA 3: Morfologia das colônias da linhagem LB-1993B após 48h de incubação, a 30°C em ágar nutriente	63
FIGURA 4: Características Microscópicas da linhagem LB-262 (aumento de 1000x), através da coloração de Gram, após 48h de incubação , a 30°C em ágar nutriente	64
FIGURA 5: Características Microscópicas da linhagem LB-1993A (aumento de 1000x), através da coloração de Gram, após 48h de incubação , a 30°C em ágar nutriente	65
FIGURA 6: Características Microscópicas da linhagem LB-1993B (aumento de 1000x), através da coloração de Gram, após 48h de incubação , a 30°C em ágar nutriente	65
FIGURA 7: Esporos da Linhagem LB-262, através da coloração com verde de malaquita, após 7 dias de incubação, a 30°C em ágar nutriente	66
FIGURA 8: Esporos da Linhagem LB-1993A, através da coloração com verde de malaquita, após 7 dias de incubação, a 30°C em ágar nutriente	66
FIGURA 9: Esporos da Linhagem LB-1993B, através da coloração com verde de malaquita, após 7 dias de incubação, a 30°C em ágar nutriente	67
FIGURA 10: Linhagem LB-262 após 72h de incubação, a 30°C em placas de ágar amido, onde a zonas claras ao redor das colônias indica que houve hidrólise do amido	72
FIGURA 11: Linhagem LB-1993A após 72h de incubação, a 30°C em placas de ágar amido, onde a zonas claras ao redor das colônias indica que houve hidrólise do amido	72
FIGURA 12: Linhagem LB-1993B após 72h de incubação, a 30°C em placas de ágar amido, onde a zonas claras ao redor das colônias indica que houve hidrólise do amido	73
FIGURA 13: Linhagem LB-262, LB 1993A e 1993B, após 72h de incubação , a 30°C em placas de ágar leite, onde a zonas claras ao redor das colônias indica que houve hidrólise do caseína	73
FIGURA 14: Produção de ácidos a partir de carboidratos (Kit de Identificação API 50CHB) pela linhagem do gênero <i>Bacillus</i> – Linhagem LB-262	76
FIGURA 15: Produção de ácidos a partir de carboidratos (Kit de Identificação API 50CHB) pela linhagem do gênero <i>Bacillus</i> – Linhagem LB-1993A	77
FIGURA 16: Produção de ácidos a partir de carboidratos (Kit de Identificação API 50CHB) pela linhagem do gênero <i>Bacillus</i> – Linhagem LB-1993B	78

FIGURA 17: Kit de Identificação API 20E, complementar para o gênero <i>Bacillus</i> Linhagem LB-262	79
FIGURA 18: Kit de Identificação API 20E, complementar para o gênero <i>Bacillus</i> Linhagem LB-1993A	79
FIGURA 19: Kit de Identificação API 20E, complementar para o gênero <i>Bacillus</i> Linhagem LB-1993B	79
FIGURA 20: Influência da Temperatura na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	83
FIGURA 21: Influência da Temperatura na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	83
FIGURA 22: Influência da Temperatura na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	83
FIGURA 23: Influência do pH na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	85
FIGURA 24: Influência do pH na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	85
FIGURA 25: Influência do pH na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	85
FIGURA 26: Influência da %NaCl na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	87
FIGURA 27: Influência da %NaCl na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	87
FIGURA 28: Influência da %NaCl na produção de biosurfactante para a linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	87
FIGURA 29: Influência da fonte de nitrogênio na produção de biosurfactante para a linhagem LB-262	89
FIGURA 30: Influência da fonte de nitrogênio na produção de biosurfactante para a linhagem LB-1993A	89
FIGURA 31: Influência da fonte de nitrogênio na produção de biosurfactante para a linhagem LB-1993B	89
FIGURA 32: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante para a linhagem <i>B. subtilis</i> LB-262	104
FIGURA 33: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante para a linhagem <i>B. subtilis</i> LB-1993A	104
FIGURA 34: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante para a linhagem <i>B. subtilis</i> LB-1993B	104
FIGURA 35: Crescimento celular em função do tempo de fermentação na produção de biosurfactante pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	105
FIGURA 36: Crescimento celular em função do tempo de fermentação na produção de biosurfactante pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	105
FIGURA 37: Crescimento celular em função do tempo de fermentação na produção de biosurfactante pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	105
FIGURA 38: Produção de biosurfactante em meio basal e em manipueira pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	111

FIGURA 39: Produção de biosurfactante em meio basal e em manipueira pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	111
FIGURA 40: Produção de biosurfactante em meio basal e em manipueira pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	111
FIGURA 41: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em manipueira pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262, em relação ao crescimento durante 120h	113
FIGURA 42: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em manipueira pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A, em relação ao crescimento durante 120h	113
FIGURA 43: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em manipueira pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B, em relação ao crescimento durante 120h	114
FIGURA 44: Consumo de glicose em meio basal e manipueira pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	117
FIGURA 45: Consumo de glicose em meio basal e manipueira pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	117
FIGURA 46: Consumo de glicose em meio basal e manipueira pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	117
FIGURA 47: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal fermentado em agitador rotativo pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	119
FIGURA 48: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal fermentado em agitador rotativo pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	119
FIGURA 49: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal fermentado em agitador rotativo pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	119
FIGURA 50: Emulsificação de compostos insolúveis com leitura de absorbância a 540nm	121
FIGURA 51: Teste de emulsificação de compostos insolúveis com biosurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> LB-262	122
FIGURA 52: Teste de emulsificação de compostos insolúveis com biosurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> LB-1993A	122
FIGURA 53: Teste de emulsificação de compostos insolúveis com biosurfactante produzido por <i>B. subtilis</i> LB-1993B	122
FIGURA 54: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262 – Ensaio em fermentador de bancada	134
FIGURA 55: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A – Ensaio em fermentador de bancada	134
FIGURA 56: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B – Ensaio em fermentador de bancada	135
FIGURA 57: Fermentador de bancada New Brunswick BIOFLO III com 2,5L de capacidade, utilizado na produção de surfactina (coleta da espuma produzida)	135
FIGURA 58: Espuma obtida durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> LB-262 em fermentador de bancada Bioflo III com 2,5L de capacidade	136
FIGURA 59: Propriedades do biosurfactante produzido pelas linhagens de <i>Bacillus subtilis</i> em fermentador de bancada através da coleta de espuma produzida	138

FIGURA 60: Consumo de oxigênio da linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262 durante a produção de biosurfactante em fermentador de bancada	140
FIGURA 61: Consumo de oxigênio da linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A durante a produção de biosurfactante em fermentador de bancada	140
FIGURA 62: Consumo de oxigênio da linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B durante a produção de biosurfactante em fermentador de bancada	140
FIGURA 63: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262 – Ensaio fermentador piloto	143
FIGURA 64: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A – Ensaio fermentador piloto	143
FIGURA 65: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B – Ensaio fermentador piloto	143
FIGURA 66: Fermentador piloto New Brunswick Scientific Bioflo 8000 MP80 com 80L de capacidade utilizado na produção de surfactina pelo método da coleta de espuma	144
FIGURA 67: Consumo e transferência de oxigênio pela linhagem LB-262	146
FIGURA 68: Consumo e transferência de oxigênio pela linhagem LB-1993A	146
FIGURA 69: Consumo e transferência de oxigênio pela linhagem LB-1993B	146
FIGURA 70: Linha completa da produção de surfactina em escala piloto pelo método da coleta da espuma	150
FIGURA 71: Gráfico do cálculo da CMC, onde o ponto de cruzamento entre as duas linhas determina o valor da CMC, onde $CMC^{-1} = 1/CMC$	152
FIGURA 72: Cromatograma da análise por HPLC do meio de cultura antes do processo de fermentação	160
FIGURA 73: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina (Sigma) utilizada como padrão na concentração de 0,025mg/ml	160
FIGURA 74: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina (Sigma) utilizada como padrão na concentração de 0,25mg/ml	161
FIGURA 75: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina (Sigma) utilizada como padrão na concentração de 2,5mg/ml	161
FIGURA 76: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina produzida em frascos agitados pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	162
FIGURA 77: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina produzida em fermentador de bancada de 2L pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	162
FIGURA 78: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina produzida em fermentador piloto de 80L pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262	163
FIGURA 79: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina produzida em frascos agitados pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	163
FIGURA 80: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina produzida em fermentador de bancada de 2L pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	164
FIGURA 81: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina produzida em fermentador piloto de 80L pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A	164
FIGURA 82: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina produzida em frascos agitados pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	165

FIGURA 83: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina produzida em fermentador de bancada de 2L pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	165
FIGURA 84: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina produzida em fermentador piloto de 80L pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B	166
FIGURA 85: Espectro de massa da surfactina padrão (m/z=1035,8)	168
FIGURA 86: Espectro de massa da surfactina purificada produzida pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262 (m/z = 1037)	169
FIGURA 87: Espectro de massa da surfactina purificada produzida pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993A (m/z = 1031)	169
FIGURA 88: Espectro de massa da surfactina purificada produzida pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-1993B (m/z = 1037)	170
FIGURA 89: Curva padrão da maltose em relação a absorvância a 540nm para o cálculo da atividade enzimática	173
FIGURA 90: Influência da adição de surfactante biológico (surfactina produzida pelas linhagens LB-262, LB-1993A, e LB 1993B) e sintético (Tween 20 e Tween 80) na concentração de 0,033% em diferentes tempos de fermentação, 0 e 24h	173
FIGURA 91: Influência da adição de surfactante biológico (surfactina produzida pelas linhagens LB-262, LB-1993A, e LB 1993B) e sintético (Tween 20 e Tween 80) em ao meio de cultura em diferentes concentrações 0,033%, 0,33% e 0,66%	174
FIGURA 92: Aminograma do biosurfactante produzido em meio basal por <i>B. subtilis</i> LB-262	176
FIGURA 93: Aminograma do biosurfactante produzido em meio basal por <i>B. subtilis</i> LB-1993A	177
FIGURA 94: Aminograma do biosurfactante produzido em meio basal por <i>B. subtilis</i> LB-1993B	177
FIGURA 95: Aminograma do biosurfactante produzido em manipueira por <i>B. subtilis</i> LB-262	178
FIGURA 96: Aminograma do biosurfactante produzido em manipueira por <i>B. subtilis</i> LB-1993A	178
FIGURA 97: Aminograma do biosurfactante produzido em manipueira por <i>B. subtilis</i> LB-1993B	179
FIGURA 98: Atividade anti-microbiana da surfactina contra a linhagem uma <i>C. albicans</i> (pequena inibição apenas com o padrão de surfactina sigma nas concentrações testadas e pelos extratos da linhagem LB-262)	189
FIGURA 99: Atividade anti-microbiana da surfactina contra <i>R. equi</i> (pequena inibição apenas com o padrão de surfactina sigma nas concentrações testadas e pelos extratos da linhagem LB-262)	190
FIGURA 100: Atividade anti-microbiana da surfactina contra <i>S. aureus</i> (inibição total nas concentrações testadas, tanto para os extratos como para o padrão nas diversas concentrações testadas)	190
FIGURA 101: Atividade anti-microbiana da surfactina contra <i>P. aeruginosa</i> (inibição apenas com o padrão de surfactina sigma nas concentrações testadas e pelos extratos da linhagem LB-262)	191
FIGURA 102: Atividade anti-microbiana da surfactina contra <i>S. Choratesius</i> (inibição total nas concentrações testadas, tanto para os extratos como para o	

padrão nas diversas concentrações testadas	191
FIGURA 103: Atividade anti-microbiana da surfactina contra <i>E. coli</i> (inibição apenas com o padrão de surfactina sigma nas concentrações testadas e pelos extratos da linhagem LB-262 e LB-1993A)	192
FIGURA 104: Antibiograma obtido para o antibiótico produzido pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262, LB-1993A e LB1993B, contra uma linhagem de <i>C. albicans</i>	194
FIGURA 105: Antibiograma obtido para o antibiótico produzido pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262, LB-1993A e LB1993B, contra uma linhagem de <i>E. coli</i>	194
FIGURA 106: Antibiograma obtido para o antibiótico produzido pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262, LB-1993A e LB1993B, contra uma linhagem de <i>R. Equi</i>	194
FIGURA 107: Antibiograma obtido para o antibiótico produzido pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262, LB-1993A e LB1993B, contra uma linhagem de <i>P. aeruginosa</i>	195
FIGURA 108: Antibiograma obtido para o antibiótico produzido pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262, LB-1993A e LB1993B, contra uma linhagem de <i>S. choratecius</i>	196
FIGURA 109: Antibiograma obtido para o antibiótico produzido pela linhagem de <i>B. subtilis</i> LB-262, LB-1993A e LB1993B, contra uma linhagem de <i>S. Aureus</i>	197

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes são compostos que possuem em sua molécula uma parte hidrofílica e uma parte hidrofóbica, geralmente constituída por hidrocarbonetos. Os surfactantes devido à sua composição estrutural, tem a propriedade de reduzir a tensão superficial da água e de soluções de diversas composições (ROSEN, 1971; FIECHTER, 1992; BANAT *et alii*, 1995; ROSENBERG & RON, 1999).

Surfactante sintéticos são comumente produzidos usando uma diferente variedade de compostos químicos orgânicos, dependendo do tipo e estrutura do surfactante desejado. O interesse comercial pelos surfactantes se deve ao fato de sua ampla aplicação industrial, principalmente no que se diz respeito a indústrias de petróleo e farmacêuticas, além de empresas do ramo alimentício, o qual provocou um crescimento de 300% na indústria química americana quanto à demanda do uso deste tipos de compostos na última década (GREEK, 1990).

Chamamos de biosurfactantes compostos que possuem as mesma propriedades dos surfactantes sintéticos, no entanto são produzidos por microrganismos durante o processo de fermentação (BANAT *et alii*, 1995). O interesse pelos surfactantes biológicos, se deve pelo fato destes serem menos tóxicos, biodegradáveis, estáveis a diferentes temperaturas, pH e salinidade, e em muitos casos são mais efetivos que os surfactante sintéticos (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características, propriedades e vantagens dos biosurfactantes

Os biosurfactantes diferem dos surfactantes químicos por serem biodegradáveis, menos tóxicos, mais efetivos com menores quantidades (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998) e muitas vezes possuem propriedades biológicas e de bioremediação, como a recuperação de metais de águas e solos contaminados (MULLIGAN *et alii*, 1999), propriedades estas muitas vezes não presentes nos surfactantes sintéticos quimicamente (KOSARIC *et alii*, 1990). Dentre inúmeras propriedades dos biosurfactantes, podemos citar (ROSEN, 1971; KOSARIC *et alii*, 1990):

- capacidade de abaixar a tensão superficial da água de 72mN/m para valores entre 25-30mN/m,
- capacidade de abaixar a tensão interfacial em sistemas contra compostos insolúveis para valores em torno de 1mN/m,
- formação de emulsões estáveis utilizando baixas concentrações de produto
- formação de micelas em solução

Devido a tais propriedades, os biosurfactantes tem aplicações no mais diversos ramos industriais conforme podemos observar na tabela 1:

TABELA 1: Biosurfactantes e ramos industriais de aplicação

Função do Biosurfactante	Ramo Industrial
Emulsificantes e dispersantes	Indústria de Cosméticos, alimentícia, tintas e aditivos para produtos oleosos
Solubilizantes e formadores de microemulsões	Indústria de papel e farmacêutica
Agentes permeabilizadores	Indústria farmacêutica, têxtil e química
Detergentes	Produtos para agricultura e Indústria química
Formadores de espuma	Indústria química e cosméticos
Sequestrantes de metais	Tratamento de resíduos, Bioremediação

Fonte: BANAT *et alii*, 2000

2.2 Tipos de biosurfactantes e Microrganismos produtores

Os biosurfactantes podem ser produzidos por diferentes tipos de microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras, com diferentes estruturas e características, dependendo de sua composição. Os tipos mais comuns de biosurfactantes produzidos são: glicolipídeos, fosfolipídeos e ácidos graxos, lipopeptídeos e lipoproteínas, surfactante poliméricos e outros tipos particulares como os surfactantes intracelulares constituídos pela inteira célula do microrganismo. (KOSARIC *et alii*, 1990)

1) Glicolipídeos

Existem diferentes tipos de glicolipídeos produzidos pelos microrganismos. Os glicolipídeos são os biosurfactantes mais comumente produzidos e estudados

nos dias de hoje. Sua estrutura é constituída por carboidratos, como a trealose, ramnose, celobiose e a soforose, em combinação com ácidos alifáticos ou ácidos alifáticos hidroxílicos. Os três tipos mais comuns de glicolípídeos biosurfactantes estudados são os trehalose lipídeos, geralmente produzidos por linhagens de *Rhodococcus erythropolis* (RISTAU & WAGNER, 1983), ramnolípídeos geralmente produzidos por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (SIM *et alii*, 1997) e os soforoselípídeos comumente produzido por levedura do tipo *Candida bombicola* (DAVILA *et alii*, 1994; ZHOU & KOSARIC, 1995; DANIEL *et alii*, 1998) e *Torulopsis bombicola* (ITO & INOUE, 1982; ASMER *et alii*, 1988;).

1) Fosfolípídeos e ácidos graxos

Nesta classe de biosurfactante, sua produção se deve a uma classe de bactérias e leveduras capazes de degradarem hidrocarbonetos e assim convertê-los em fosfolípídeos e ácidos graxos (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984). Estes surfactantes são capazes de formar microemulsões quando alcanos estão presentes em água. Quanto aos microrganismos produtores desta classe de biosurfactantes, linhagens de *Thiobacillus thiooxidans* (BEEBA & UMBREIT, 1971) e *Acinetobacter spp* (MAKULA *et alii*, 1975) são as que mais se destacam.

2) Lipopeptídeos e Lipoproteínas

Lipopeptídeos são amplamente conhecidos por suas atividades antibióticas e biológicas, no entanto linhagens de *Bacillus subtilis* (Arima *et alii*, 1968) e *Bacillus licheniformis* (HOROWITZ *et alii*, 1990; HOROWITZ *et alii*, 1991; JENNY *et alii*, 1991; YAKIMOV *et alii*, 1995) são capazes de produzirem lipopeptídeos com potentes propriedades tensoativas e cujo composto são conhecidos como surfactina e lichesina.

A surfactina é tida como um dos mais eficientes biosurfactantes conhecidos, com grande atividade de superfície. Além da capacidade de inibir a formação de coágulos de fibrina e a lise dos eritrócitos e de diversos esferoplastos e protoplastos bacterianos, funciona ainda como um potente inibidor da adenosina cíclica 3'-5'-monofosfato fosfodiesterase. Sua produção pelo *B. subtilis* se inicia já na fase logarítmica (de crescimento) após o repique da cultura, e continua durante todo o ciclo celular (VATER, 1987; VATER, 1989).

4) Biosurfactantes poliméricos

Biosurfactante poliméricos são constituídos por compostos de alto peso molecular sendo que os que mais se destacam dentro desta classe em particular são o emulsan, produzido por linhagens de *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (ROSENBERG, 1979), liposan produzido por linhagens de *Candida lipolytica* (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984; CIRIGLIANO & CARMAN, 1985), e outros polissacarídeos proteicos, também produzidos por linhagens de *A. calcoaceticus* RAG-1 (ROSENBERG, 1979).

5) Biosurfactante particulares

Estes tipos particulares de biosurfactante são caracterizados pela formação de vesículas por certas linhagens de *Acinetobacter sp.*, as quais são formadas quando hidrocarbonetos estão presentes no meio de cultura. Essas vesículas são capazes de em contato com hidrocarbonetos, produzirem microemulsões no meio de cultura. Estudos mostraram serem estas vesículas constituídas por proteínas, fosfolipídeos e polissacarídeos, muitas vezes com a mesma composição das membrana que envolvem o microrganismo produtor (MAKULA *et alii*, 1975).

TABELA 2: Principais tipos de biosurfactantes produzidos e microrganismos produtores

Tipo de biosurfactante	Microrganismo produtor	Referência
Glicolídeos		
Soforoselídeos	<i>Torulopsis bombicola</i>	ITO & INOUE (1982)
	<i>Candida apicola</i>	HOMMEL <i>et alii</i> (1993)
	<i>Candida bombicola</i>	ZHOU & KOSARIC (1995) DESHPANDE & DANIEL (1995)
Trehalose-micolato	<i>Arthrobacter paraffineus</i>	DUVNJAK <i>et alii</i> (1982)
Ramnoselídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	SANTOS <i>et alii</i> (1984) SIM <i>et alii</i> (1997)
Lipoproteínas e Lipopeptídeos		
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	ARIMA <i>et alii</i> (1968)
Lichesina	<i>Bacillus licheniformis</i>	JENNY <i>et alii</i> (1991)
Fosfolídeos e ácidos graxos		
Fosfolídeos e ácidos graxos	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	BEEBA & UMBREIT (1971)
	<i>Corynebacterium lepus</i>	COOPER <i>et alii</i> (1979)
Surfactantes poliméricos		
lipoheteropolissacarídeos	<i>Arthrobacter calcoacetius</i> RAG-1	ROSENBERG <i>et alii</i> (1979)
Polissacarídeos proteico	<i>Candida lypolítica</i>	PAREILLEUX <i>et alii</i> (1979)

TABELA 3: Propriedades dos principais biosurfactantes estudados

Biosurfactante	Tensão superficial (mN/m)	Tensão interfacial (mN/m)	Concentração Micelar crítica (CMC)
Celobioselipídeos	30	1,0	20,00
Ramnoselipídeos	40	1,5	50,00
Soforoselipídeos	37	1,5	82,00
Trealose - dimicolato	30	18,0	0,70
Trealose-6-micolato	30	15,0	165,00
Ácido graxo hidroxílico	30	15,0	200,00
Surfactina	27	1,8	25,00
Lichesina	27	2,0	25,00
Acido corimicólico	30	2,0	150,00
Proteína-lipídeo-carboidrato	35	15,00	1900,00
Surfactantes sintéticos			
Span 20	32	5,0	10,00
SDS	30	0,01	2.500,00
Sulfonatos de petróleo	30	0,001	Não determinado

Fonte: BANAT *et alii* (2000)

2.3 Isolamento de linhagens produtoras de biosurfactantes

O abaixamento da tensão superficial do meio de cultura fermentado consiste de um dos métodos mais efetivos para o isolamento de linhagens produtoras de biosurfactante (MULLIGAN *et alii*, 1984; CARRILO *et alii*, 1996; SANTOS & PASTORE, 1997, HABA *et alii*, 2000). No entanto devido ao grande número de linhagens que podem ser encontradas num processo de seleção, uma pré-seleção pode ser feita inoculando-se as linhagens em placas de ágar-sangue, onde a capacidade hemolítica de certos microrganismos é usado como critério para um prévio isolamento de bactérias produtoras de biosurfactantes (MULLIGAN *et alii*, 1984; CARRILO *et alii*, 1996). Em um estudo realizado, foram isoladas 492 linhagens de microrganismos, de diferentes origens, as quais tiveram a atividade hemolítica determinada, onde apenas 37 apresentaram capacidade hemolítica positiva. A seguir, as 37 linhagens que apresentaram atividade hemolítica positiva e mais 49 não-hemolíticas tiveram sua capacidade tensoativa estudada. Somente cinco das linhagens testadas, todas com capacidade hemolítica positiva, apresentaram produção de biosurfactante, indicando uma possível ligação entre a capacidade hemolítica da linhagem com a produção de biosurfactantes (CARRILO *et alii*, 1996). Haba *et alii* (2000), isolaram linhagens de microrganismos capazes de crescer em resíduos gordurosos descartados por indústrias de alimentos. Neste estudo, 9 linhagens de *Pseudomonas* e duas de *Bacillus*, foram capazes de abaixar a tensão superficial do meio de cultura de 57mN/m para 34-36mN e 32-34mN/m respectivamente. A seguir uma linhagem de *Pseudomonas*, identificada como *Pseudomonas aeruginosa* 47T2, foi escolhida para estudo das melhores condições de produção de biosurfactante.

2.4 Produção de biosurfactantes: rotas metabólicas e fatores que influenciam a produção

A rota metabólica utilizada na produção de biosurfactantes varia de acordo com o tipo de biosurfactante produzido e pelo microrganismo produtor, onde biosurfactantes de estruturas semelhantes podem ser produzidos por rotas metabólicas diversas dependendo do microrganismo produtor. Como citamos anteriormente, os biosurfactantes possuem em sua estrutura uma parte hidrofílica, com afinidade com a água e uma parte hidrofóbica, geralmente constituída por compostos insolúveis como hidrocarbonetos.

A produção de biosurfactante através do processo de fermentação pode acontecer através de diversas rotas metabólicas onde a fonte de carbono simples presente no meio seria convertida a ácido graxos que faria parte da estrutura do biosurfactante, ou compostos insolúveis presentes no meio de cultura, como hidrocarbonetos, poderiam ser convertido a uma fonte de carbono simples que também fariam parte da estrutura do biosurfactante (HOMMEL & RATDLEGE, 1990). Geralmente a produção de biosurfactante exige a ação de um grupo de enzimas regulatórias, como o caso síntese da surfactina, cuja produção do biosurfactante é regulada por um complexo enzimático denominado de surfactina-síntetase (BESSON, 1992; BESSON, 1994; ULLRICH, 1991; VATER, 1991). Com a finalidade mais uma vez de desvendar o metabolismo da síntese da surfactina, estudou-se a influência da enzima isocitrato-desidrogenase na produção de biosurfactante por linhagens de *B.subtilis*, cuja enzima participa ativamente do metabolismo do ciclo de Krebs. Como parte do estudo, os autores selecionaram uma linhagem mutante de *B.subtilis* cuja atividade da enzima era suprimida em 30 vezes. A seguir, os autores observaram que a linhagem mutante foi capaz de produzir uma quantidade de biosurfactante três vezes maior que a linhagem de origem (ROUBIN & MULLIGAN, 1989).

Quanto ao metabolismo de glicolípídeos, Kitamoto et *alii* (1998), utilizaram inibidores do ciclo da β -oxidação com a finalidade de elucidar o mecanismo da síntese dos ácidos graxos durante o metabolismo da linhagem de *C.antarctica* durante a produção do glicolípídeo manosyléritritol. Os autores utilizaram para tanto o reagente 2-bromo-octanóico e concluíram que quanto maior a concentração do inibidor utilizado maior a influência na síntese da parte lipídica do biosurfactante produzido.

2.5 Composição do meio de cultivo para a produção de biosurfactantes

O meio de cultura para a produção de biosurfactantes varia muito dependendo do tipo de microrganismo produtor e do tipo de biosurfactante produzido. Como a maioria dos meios de cultura, é necessária a presença de uma fonte de nitrogênio e uma fonte de carbono para que seja possível o crescimento microbiano.

2.5.1 Efeito da fonte de carbono na produção de biosurfactante

O meio de cultura para a produção de biosurfactante poder ser constituído por apenas uma fonte de carbono simples ou complexa, e por uma fonte de nitrogênio orgânica ou inorgânica, porém em alguns casos, a adição de uma solução de traços de minerais promove uma maior produção de biosurfactantes (LIN et *alii*, 1998).

Linhagens de *B.subtilis* foram capazes de produzirem um potente surfactante quando cultivadas em meio de cultura contendo apenas fontes de carbono simples como glucose e sais minerais (COOPER et *alii*, 1981). O mesmo ocorreu quando uma linhagem de *Bacillus licheniformis* foi capaz de produzir um

potente surfactante quando inoculada em meio contendo sacarose e sais minerais.(JENNY *et alii*, 1991). Estudos também revelaram a possibilidade de se utilizar resíduos industriais como fonte de carbono para a produção de biosurfactante, como por exemplo a produção de surfactina por linhagens de *B. subtilis*, onde autores utilizaram melão de cana (MAKKAR & CAMEOTRA, 1997b), água do processamento de farinha de mandioca (SANTOS *et alii*, 1999), resíduos do processamento de batata (THOMPSON *et alii*, 2000), turfa hidrolisada (MULLIGAN & COOPER, 1985; SHEPPARD & MULLIGAN, 1987) e resíduo fermentado de soja (OHNO *et alii*, 1995).

Por outro lado, algumas linhagens de microrganismos foram sensivelmente estimuladas a produzirem biosurfactantes quando compostos insolúveis eram adicionados ao meio de cultura (MOO-YOUNG *et alii*, 1971; PAREILLEUX, 1979; COOPER *et alii*, 1979; COOPER & PADDOCK, 1984; HOMMEL *et alii*, 1987, ASMER *et alii*, 1988; WATKINSON & MORGAN, 1990; HOMMEL *et alii*, 1990; ZHANG & MILLER, 1995; PRUTHI & CAMEOTRA, 1997b). Uma linhagem de *Candida Lypolítica* ATCC 8661 foi estimulada a produzir biosurfactantes quando inoculada em meio contendo n-dodecano como fonte de carbono, em fermentação contínua (MOO-YOUNG *et alii*, 1971). Seguindo a mesma teoria, outra linhagem de *Candida Lypolítica*, se mostrou produtora de um polímero com propriedades emulsificantes quando inoculada em meio contendo n-tetradecano ou uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia linear (PAREILLEUX, 1979). Linhagens de leveduras, como a linhagem de *Endomycopsis lipolytica*, também foi capaz de produzir biosurfactante quando inoculada em meio de cultura contendo 2% de alcanos ou alcenos (ROY *et alii*, 1979). Além de estimular a produção de biosurfactantes, muitas vezes a adição de composto insolúveis ao meio de cultura faz com que a produção de biosurfactante que era intracelular passe a ser extracelular em meio contendo hidrocarbonetos.

Um exemplo disso foi o estudo da linhagem de *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558, que quando inoculada em meio de cultura contendo sais minerais e hidrocarbonetos com cadeias de C8 a C17 produziu biosurfactante extracelularmente, e quando cultivada que em meio de cultura contendo apenas fonte de carbono simples, o biosurfactante foi produzido intracelularmente. Para esta linhagem, os melhores resultados foram obtidos quando hexadecano foi adicionado ao meio de cultura. (DUVNJAK *et alii*, 1982). Resultados semelhantes foram obtidos com a linhagem de levedura *Torulopsis bombicola* quando hidrocarbonetos de 10 a 20 carbonos foram adicionados ao meio de cultura (ITO & INOUE, 1982; INOUE & ITO, 1982) e para uma linhagem de *Candida tropicalis* (SINGH *et alii*, 1990). Outro exemplo da produção de biosurfactantes utilizando hidrocarbonetos como fonte de carbono pode ser demonstrada no isolamento de uma linhagem de *Arthrobacter protophormiae*, cujo microrganismo foi capaz de produzir biosurfactante utilizando apenas hexadecano como fonte de carbono. (PRUTHI & CAMEOTRA, 1997b). Estudos também mostraram que um exopolissacarídeo viscoso era produzido por uma linhagem de *Sphingomonas paucimobilis* GS-1 quando inoculada em meios compostos como xileno, benzeno, 2-metilnaftaleno, hexadecano, hexano, querosene, óleo de parafina, óleo castor, de côco e de oliva, na concentração de 1mg/mL.(ASHTAPUTRE & SHAH, 1995).

Como podemos concluir portanto, além de hidrocarbonetos, a adição de óleos vegetais, como óleo de milho, canola e soja também funcionam como estimulantes de produção de biosurfactante para certas linhagens de microrganismos (COOPER & PADDOCK, 1984; DAVILA *et alii*, 1984; KITAMOTO *et alii*, 1990a; KITAMOTO *et alii*, 1990b; DANIEL *et alii*, 1998). Uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* UW-1, produtora de biosurfactante, foi cultivada em meio de cultura contendo glicose e 2% de óleos vegetais como óleo de canola, milho, oliva, soja, parafina, etanol e glicerol. No caso desta

linhagem, os melhores resultados foram obtidos quando parafina foi adicionada ao meio de cultura (SIM *et alii*, 1997).

2.5.2 Efeito da fonte de nitrogênio e minerais na produção de biosurfactante

A fonte de nitrogênio no meio de cultura exerce extrema importância na síntese de compostos tensoativos como os biosurfactantes. Entre as fontes de nitrogênio geralmente utilizadas em meios de cultura, temos as fontes inorgânicas como os sais de amônia, nitrato e uréia, e as fontes orgânicas, como o extrato de levedura e a peptona. Quanto aos estudos realizados quanto à produção de biosurfactante e o metabolismo de nitrogênio, estudos mostraram terem sido a amônia e a uréia as fontes de nitrogênio preferidas pela linhagem de *A. paraffineus* para a produção de biosurfactante (DESAI & DESAI, 1990). Já na produção de biosurfactante pela linhagem de *Corynebacteria sp.*, a suplementação de amônia e nitrato ao meio de cultura foram capazes de retardar a produção do biosurfactante (DUVNJAK, 1983).

Outro importante estudo foi realizado com a linhagem de *B. subtilis* ATCC 21332, no metabolismo de produção de surfactina. Neste estudo os autores observaram que a produção de surfactina em aerobiose induzia o consumo de amônia enquanto que a produção em condições anaeróbicas fazia com que o metabolismo do nitrato fosse estimulado (DAVIS *et alii*, 1999). Resultados semelhantes foram obtidos com uma linhagem de *B. licheniformis* onde a presença de NaNO_3 em condições anaeróbicas induziu o aumento de produção do biosurfactante. (JAVAHERI *et alii*, 1985).

Além da fonte de nitrogênio, estudos foram realizados para avaliar a influência da adição de íons como Fe^{+2} e Mn^{+} , e qual sua influência na produção de surfactina por linhagens de *B. subtilis*. Seguindo tal raciocínio, estudos observaram que a adição de tais íons influenciava diretamente no metabolismo do

nitrogênio.(SHEPPARD & COOPER, 1991). Baseando-se em tal objetivo, estudos foram realizados com uma linhagem de *B. subtilis* onde a adição de íons Fe^{+2} em concentrações de 1,7 μ M-4 μ M induziram não só o aumento da produção de surfactina como um aumento na biomassa. (WEI & CHU, 1998).

2.6 Recuperação e purificação dos biosurfactantes

A recuperação e purificação dos biosurfactantes após o período de fermentação consiste numa etapa bastante crítica e importante, uma vez que muitas vezes apenas 60% da quantidade de biosurfactante produzida consegue ser recuperada do meio de cultura (DESAI & BANAT, 1997). O processo de separação do biosurfactante dos outros componentes do meio, consiste primeiramente na separação das células do sobrenadante, no caso da produção extracelular, ou na hemólise das células, no caso da produção ter sido intracelular. A seguir procede-se a separação do biosurfactante dos outros componentes do meio de cultura, a qual pode ser feita através de métodos químicos, geralmente feita por extração com solventes (COOPER *et alii*, 1981; HOROWITZ *et alii*, 1990), ou por métodos físicos, como por exemplo através do processo de ultrafiltração (MATTEI & BERTRAND,1985; MULLIGAN & GIBBS, 1990; LIN *et alii*, 1998). Outro método muito utilizado na extração de biosurfactantes é a precipitação do biosurfactante produzido com ácidos, onde o precipitado é centrifugado e submetido a liofilização.(MULLIGAN & GIBBS, 1990). É importante ressaltar no entanto que cada etapa da extração do biosurfactante produzido depende de sua estrutura e propriedades onde muitos métodos efetivos para um tipo de biosurfactante se mostram ineficientes para outros. No caso da recuperação da surfactina, biosurfactante produzido extracelularmente por linhagens de *B. subtilis*, primeiro separa-se as células do sobrenadante. A seguir, pode-se utilizar uma precipitação ácida com HCl, seguida de extração com

solventes, como metanol ou diclorometano (ARIMA, 1968) ou pode-se usar o método de fracionamento da espuma (CARRERA *et alii*, 1993a) seguida de ultrafiltração utilizando membranas de diferentes pesos moleculares (MULLIGAN & GIBBS, 1990; LIN & JIANG, 1997). Além da surfactina, o método de ultrafiltração também pode ser utilizado na recuperação de ramnolipídeos produzidos por linhagens de *P.aeruginosa* (MULLIGAN & GIBBS, 1990) e de glicolipídeos, produzidos por linhagens de *Rhodococcus sp.* H13A (BRYANT, 1990).

2.7 Caracterização estrutural dos biosurfactantes

A estrutura dos biosurfactantes está diretamente relacionada com suas propriedades tensoativas e muitas vezes biológicas, onde a substituição de um aminoácido pode afetar diretamente as propriedades do biosurfactante, revelando a extrema importância da caracterização da estrutura dos biosurfactantes em estudo (ROSEN, 1971). Um exemplo disso foi o estudo da estrutura da surfactina em comparação com outros peptídeos antibióticos, os quais são produzidos simultaneamente com a surfactina porém não possuem propriedades tensoativas. Os autores então observaram que a surfactina era constituída por ácidos graxos β -hidroxilicos, com cadeias de 14 a 15 carbonos, enquanto que os peptídeos antibióticos eram constituídos por ácidos graxos β -amínicos o que poderia segundo os autores, influenciar na propriedade tensoativa da surfactina (THIMON *et alii*, 1992, THORNAT *et alii*, 1998).

Quanto à determinação da estrutura química dos biosurfactantes, esta geralmente é elucidada através das técnicas como espectrometria de massa, ressonância magnética e análise utilizando infravermelho. Além destes métodos, a utilização de métodos de cromatografia, como cromatografia de camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa são utilizadas na

quantificação dos biosurfactante produzido e também são utilizadas como ferramenta para a elucidação de parte da composição dos biosurfactantes, como sua composição lipídica, proteica e de carboidratos. Estudos utilizaram a cromatografia em camada delgada com o sistema de solvente formado por clorofórmio-metanol-água (65:15:2), a fim de se elucidar a possível estrutura do glicolípido produzido por esta linhagem de *Torulopsis petrophilum*. Os componentes foram visualizados através da revelação do cromatograma com α -naftol (COOPER & PADDOCK 1983). Outro exemplo importante foi a caracterização de um novo glicolípido produzido por uma linhagem de *Cellulomonas cellulans*, onde a utilização da cromatografia e espectrometria foi essencial na elucidação da estrutura do biosurfactante produzido (ARINO *et alii*, 1998).

2.8 Surfactina: biosurfactante produzido por linhagens de *Bacillus subtilis*

Chamamos de surfactina um lipopeptídeo produzido por certas linhagens de *B. subtilis* quando cultivadas em meio de cultura contendo glucose e sais minerais. (COOPER *et alii*, 1981). A surfactina foi primeiro relatada em 1968, por Arima *et alii*, cujo nome a este composto foi atribuído a sua excepcional capacidade de reduzir a tensão superficial de soluções. A surfactina é composta por sete aminoácidos, Glu-Leu-D-Leu-Val-Asp-D-Leu-Leu, podendo haver variações na sequências dos aminoácidos. Quanto a sua parte lipídica, a surfactina é constituída por ácidos graxos β -hidroxílicos com cadeias que variam de 13 a 17 carbonos (ARIMA, 1968).

Apesar de sua descoberta ter sido feita ao mesmo tempo que outros biosurfactantes e lipopeptídeos antibióticos, o interesse pela produção da surfactina permanece até os dias de hoje devido a sua capacidade de abaixar a

tensão superficial da água de 72mNm para valores que podem chegar ate 25-27mN/m, em concentrações extremamente baixas, podendo chegar a 0,005% (PAREILLEUX *et alii*, 1979, PEYPOUX *et alii*, 1999).

Além das propriedades tensoativas, a surfactina possui grandes propriedades biológicas (KRACHT *et alii*, 1999), como ação antifúngica, antibacteriana (ARIMA, 1968; YAKIMOV *et alii*, 1985), indução no aumento de produção de enzimas por outros microrganismos (GOES & SHEPPARD, 1999), podendo ainda ser utilizada no tratamento da hipercolesterolemia e de certos tipos de tumores (TSUKAGOSHI *et alii*, 1970), além de grande aplicação em infecções vírais que envolvem a presença de *Mycoplasma* (VOLLENBROICH *et alii*, 1997). Quanto à sua produção, esta geralmente requer um meio de cultura contendo glicose e sais minerais (COOPER *et alii*, 1981), podendo no entanto ocorrer variações no meio de cultura, quanto à adição de soluções de minerais e diversas concentrações de NaCl (SANTOS & PASTORE, 1997).

Quanto a extração da surfactina do meio de cultura, esta pode ser realizada de várias maneiras, dependendo da produção ter sido realizada em agitador rotativo ou em fermentadores. Quando a produção é realizada em agitador rotativo, a extração da surfactina é feita por extração com solventes como metanol e diclorometano.(ARIMA, 1968, BECHARD *et alii*, 1998). Já quando esta é produzida em fermentadores, de bancada ou piloto, a injeção de ar para dentro do fermentador provoca a emulsificação da surfactina presente no meio de cultura, forçando sua expulsão do fermentador e conseqüente coleta na forma de espuma. A recuperação neste caso é mais rápida e se consegue uma surfactina com 97-99% de pureza.(CARRERA *et alii*, 1993a; CARRERA *et alii*, 1993b; SANTOS *et alii*,1999).

Outra metodologia bastante eficiente é a ultrafiltração, a qual concentra e purifica a surfactina produzida. (MULLIGAN & GIBBS, 1990). Quanto à quantificação da surfactina produzida no meio de cultura, esta é feita utilizando-se

cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). A fase móvel neste caso pode ser constituída por acetonitrila, água e metanol (LIN & JIANG, 1998) ou por ácido trifluoracético e acetonitrila (WEI & CHU, 1998), e cuja revelação do cromatograma mostra ser a surfactina purificada constituída por 5 picos. Quanto à caracterização estrutural, esta é feita utilizando espectrometria de massa utilizando o método denominado de FAB (Fast Atom Bombardment) e cujo peso molecular foi encontrado como sendo em torno de 1036, podendo haver pequenas variações no peso molecular dependendo da linhagem de *B.subtilis* produtora.(MULLIGAN & GIBBS, 1990; CARRERA *et alii*, 1993a).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Microrganismos

Os microrganismos foram isolados de amostras de solo, pré-selecionados (SANTOS & PASTORE, 1997) em estudos anteriores e identificados conforme metodologia a seguir.

3.1.2 Meios de cultura

- caldo nutriente DIFCO
- ágar nutriente DIFCO
- Glicose MERCK
- Manipueira coletada da fábrica de mandioca “Plaza”, situada no município de Santa Maria da Serra (SP)
- Extrato de levedura DIFCO
- Peptona DIFCO
- Extrato de malte MERCK

3.1.3 EQUIPAMENTOS

- Agitador rotativo Fermentation Designers Inc.
- Estufa Fanen III
- Autoclave PHOENIX
- Pontenciômetro Digimed TE - 902
- Tensiômetro Kruss Processor Tensiometer K12 V3.11(Kruss Gmbh Alemanha)
- Espectofotômetro Coleman, 295 E
- Centrífuga refrigerada Beckman, mod. J-21

Fermentador de Bancada New Brunswick BIOFLO III e Fermentador Pilot New Brunswick 8000 MP 80

-Ultrafiltrador tangencial Pelicon e Ultrafiltrador Amicon

- Cromatógrafo Gasoso Chrompack CP 9001

-HPLC Varian com integrador Varian 9050

-Analisador de Aminoácidos PCX 3100 POST column reaction, TSP

3.1.4 REAGENTES

- Sais como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 e NaCl MERCK

-Ninidrina e tampões específicos para análise de aminoácidos PICKERING

-Reagente de Folin-Cicalteau DINAMICA

-NaOH MERCK

-HCl 5N MERCK

-tartarato de sódio e potássio CHEMCO

-kit para análise de glicose utilizando o método da glicose oxidase CELM

-kit para identificação de microorganismos do gênero *Bacillus*, kit API-50CH ,
Biomérie

-kit para identificação de microorganismos do gênero *Enterococcus*, kit API-20E ,
Biomérie

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Identificação do Microrganismo produtor

3.2.1.1 Manutenção das linhagens produtoras de biosurfactante

As linhagens pré-selecionadas como produtoras de biosurfactante foram mantidas em meio de cultura contendo 1% de glicose, 0,3% de extrato de malte, 0,5% de peptona, 0,3% de extrato de levedura e 2% de agar.

3.2.1.2 Características Morfológicas

As características de cultivo de um organismo dizem respeito à sua aparência macroscópica em diferentes meios de cultura. Um dos critérios para identificação de uma espécie bacteriana é a avaliação dessas características morfológicas.

A morfologia das colônias e de crescimento de um modo geral, foram determinadas cultivando as linhagens produtoras em placas de ágar nutriente onde foram observados os seguintes aspectos:

- Tamanho das colônias:** pode ser caracterizado em seu diâmetro por milímetros (mm)
- Forma:** puntiforme, circular, filamentosa, rizóide e fusiforme
- Elevação:** plana, elevada, convexa, monticular, umbeliforme e umbelicada
- Margem:** inteira, ondulada, lobada, crenada, filamentosa e ondeada
- Superfície:** lisa, rugosa, mucóide, seca e pulverulenta
- Densidade:** opaca, translúcida, transparente e brilhante
- Cromogênese:** pigmentada ou não
- Cor:** amarela, preta, branca, vermelha, etc...

-Odor: presente ou ausente

-Consistência: butirosa, viscosa, quebradiça ou membranosa

3.2.1.3 Características Microscópicas das Culturas

As características microscópicas das células foram avaliadas seguindo os seguintes aspectos:

-Coloração de Gram: positivo ou negativo

-Forma das células vegetativas: bastonetes, cocos

-Presença ou ausência de esporos

-Forma dos esporos: ovais, cilíndricos

-Esporos entumescidos ou não

3.2.1.4 Características Fisiológicas

3.2.1.4.1 Determinação da temperatura ótima de crescimento

Em tubos de ensaio contendo caldo nutriente DIFCO, inoculou-se 0,1ml de uma suspensão de células com densidade +2 na escala de Mac Farland. Cada um dos tubos foram então incubados em diferentes temperaturas de crescimento, ou seja, 5°C, 20°C, 30°C, 37°C, 45°C, 55°C e 60°C, e foi observado o crescimento das linhagens nestas diferentes temperaturas, através da presença de turbidez nos tubos de ensaio.

3.2.1.4.2 Requerimento de oxigênio

As bactérias podem ser classificadas quanto ao requerimento de oxigênio em aeróbios estritos, microaerófilos, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos.

O método consiste na retirada do oxigênio dissolvido do meio e a vedação completa do tubo. O meio mais adequado para este teste é o meio de tioglicolato, o qual possui em sua composição um agente redutor, a rezazurina. Para tanto o meio é fervido até o desaparecimento do halo de cor vermelho-rosada. Após esfriamento do meio, o microrganismo é inoculado por picada e incubado em temperatura de crescimento, no caso, 30 °C. Quanto à avaliação dos resultados do teste de requerimento de oxigênio, são observadas as seguintes características:

- aeróbio restrito : crescimento somente na superfície do meio
- microaerófilo: crescimento na superfície e no meio do tubo até o centro da picada
- anaeróbio facultativo : crescimento celular por toda extensão da picada
- anaeróbio estrito : crescimento celular apenas no final da picada

3.2.1.4.3 Teste de Osmotolerância : requerimento de cloreto de sódio

O crescimento bacteriano varia de acordo com as diferentes concentrações de solução de cloreto de sódio do meio. A tolerância é testada através de um gradiente da solução. Segundo SNEATH (1984), em Bergey's Manual de Sistemática Bacteriológica, onde utilizou-se as seguintes concentrações de NaCl adicionadas ao meio de caldo nutriente: 0%, 2%, 5%, 7% e 10%.

Foi feita uma suspensão celular em 1mL de água destilada estéril com as linhagens a serem identificadas, e posteriormente, uma suspensão em 5mL de água destilada estéril na escala +2 de Mac Farland. A seguir inoculou-se 0,1mL do inóculo em cada um dos tubos contendo o meio com as diferentes concentrações de NaCl incubando-se à 30°C. Após 48h observou-se o crescimento das culturas com os tubos incubados e a influência das diferentes concentrações de NaCl .

3.2.1.5 Características Bioquímicas

3.2.1.5.1 Hidrólise do Amido

O amido pode ser hidrolizado por muitos microrganismos devido à ação de exoenzimas hidrolíticas denominadas amilases. A molécula de amido é clivada formando dissacarídeos como a maltose. A verificação da hidrólise do amido é feita com o reagente lugol, o qual desenvolve uma coloração azul na presença do amido.

Em placas de Petri contendo 5% de peptona, 3% de extrato de carne, 10% de amido solúvel e 1,5% de ágar devidamente esterilizadas, as linhagens a serem identificadas foram inoculadas por método de picada, em quatro diferentes lugares. Após 72h foi adicionado o reagente lugol, a fim de se observar a presença ou ausência de um halo transparente ao redor das colônias.

3.2.1.5.2 Hidrólise da Caseína

A caseína pode ser hidrolizada por proteases produzidas por alguns microrganismos. O método consiste em inocular o microrganismo por método de picada em placas de Petri contendo 5% de leite reconstituído. O leite reconstituído foi dissolvido em 50ml de água e esterilizado separadamente do ágar, também dissolvido em outros 50ml de água. Após a esterilização de ambos em Erlenmeyers separados, o leite estéril foi adicionado ao ágar, e então o meio foi distribuído em placas.

A hidrólise da caseína pode ser observada através da formação de um halo transparente ao redor das colônias.

3.2.1.5.3 Hidrólise da Gelatina

A gelatina é um complexo derivado do colágeno animal, a qual se geleifica em torno de 28 a 30°C. Alguns microrganismos são capazes de produzir enzimas proteolíticas denominadas gelatinases, as quais hidrolisam a gelatina, destruindo sua capacidade de formar gel. As bactérias que produzem gelatinases podem ser detectadas então através da liquefação do meio de cultura. Este teste foi realizado com o Kit API 20E, incubado a 30°C por 48h.

3.2.1.5.4 Produção de Catalase

A catalase é uma enzima que decompõe o peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. O peróxido de hidrogênio forma-se como um dos produtos finais do metabolismo oxidativo ou aeróbio dos carboidratos. Se deixado acumular, é letal para as células bacterianas.

Sua presença foi detectada através da adição de 3 a 5 gotas de H₂O₂ a 3% sobre uma lâmina contendo esfregaço de cada uma das culturas a serem identificadas, após crescimento por 24h em ágar nutriente. A formação imediata de bolhas quando se adiciona a H₂O₂ sobre a cultura, indica a produção da catalase, e portanto trata-se de um microrganismo catalase positiva.

3.2.1.5.5 Produção de Citocromo Oxidase

Citocromos são hemoproteínas que contêm ferro e funcionam como a última ligação da cadeia respiratória aeróbica transferindo 2 elétrons de hidrogênio para o oxigênio, ocasionando a formação de água.

O sistema citocromo-oxidase é encontrado em organismos aeróbios, microaerófilos e anaeróbios facultativos, onde a oxidase utiliza reagentes como a dicloridrato de p-fenilenodiamina que atuam como receptores artificiais de elétrons substituindo o oxigênio. Este reagente é incolor no estado reduzido, mas na presença de citocromo oxidase e oxigênio atmosférico se oxida formando o azul de indofenol.

Este teste foi realizado fazendo-se um esfregaço das culturas a serem identificadas em tiras de papel contendo o reagente dicloridrato de p-fenilenodiamina. A mudança de coloração, incolor da tira, para azul, após realizado o esfregaço da cultura teste, indica um teste positivo.

3.2.1.5.6 Redução de Nitrato a Nitrito

Este teste é realizado para determinar a habilidade de um organismo em reduzir o NO_3 a NO_2 ou gás N_2 . Estas reações ocorrem normalmente sob condições anaeróbicas, onde o organismos retira seu O_2 do NO_3 .

O teste foi realizado inoculando a cultura por método de picada em meio de cultura estéril contendo 2% de triptona, 0,2% de fosfato dissódico, 0,1% de glicose, 0,1% de NaNO_3 e 0,1% de ágar. Após 72h de crescimento foram adicionados 10 gotas dos reagentes α -naftilamina e ácido sulfanílico. O resultado

positivo se deve ao desenvolvimento, de um halo de coloração vermelha, após 1min da adição dos reagentes, devido à formação do ácido diazônico.

Caso o resultado seja negativo, verifica-se se o nitrato não foi convertido a outros compostos como o N_2 . Isto é detectado com a adição de zinco ao tubo anterior. Após 5-10min, o desenvolvimento de uma coloração rósea significa que o NO_3 foi convertido diretamente a N_2 , e não a NO_2 .

3.2.1.5.7 Teste de ONPG (O-nitrofenil B-D-galactosídeo)

O o-nitrofenil B-D-galactosídeo é estruturalmente semelhante à lactose, exceto que a glicose foi substituída pelo ortonitrofenil. Através da ação da enzima β -galactosidase, o ONPG é hidrolisado em dois resíduos, a galactose e o ortonitrofenol. O ONPG é um composto incolor, enquanto que o ortonitrofenol é um composto amarelo, o que evidencia visualmente a hidrólise.

Este teste foi realizado através do Kit API 20E, após incubação à 30°C por 48h.

3.2.1.5.8 Desaminação da Fenilalanina

A fenilalanina é um aminoácido que por desaminação forma um cetoácido, o ácido fenilpirúvico. Esta reação é típica dos grupos *Proteus* e *Providencia*, e também pode ocorrer com algumas espécies do gênero *Moraxela*, *Bacillus* e *Pseudomonas*. O teste foi realizado através do Kit API20E, e a detecção do ácido fenilpirúvico, se dá através da adição de 0,2mL de uma solução de cloreto férrico 2% sobre a superfície da cúpula contendo o meio com fenilalanina. O

desenvolvimento da cor amarela após a adição do cloreto férrico indica a presença do ácido fenilpirúvico.

3.2.1.5.9 Degradação da Tirosina

Em tubos inclinados contendo meio sólido composto de ágar nutriente, adicionado de uma solução de 2% de tirosina, inoculou-se por esgotamento as linhagens a serem identificadas. A seguir, as linhagens foram incubadas a 30°C por 48h. O resultado é considerado positivo quando o meio, que possui uma coloração opaca esbranquiçada, torna-se incolor, o que significa que houve a hidrólise do aminoácido.

3.2.1.5.10 Prova do Indol

O indol, um benzil pirrol, é um dos produtos da degradação do triptofano. As bactérias que possuem a enzima triptofanase são capazes de hidrolisar e desaminar este aminoácido. A prova do indol está baseada na formação da cor vermelha após a adição de 3 a 5 gotas do reagente de Kovac's (p-dimetilaminobenzaldeído).

Este teste foi realizado através do Kit API 20E, incubado por 48h a 30°C.

3.2.1.5.11 Utilização do Citrato

O citrato de sódio é um sal do ácido cítrico, o qual é um dos metabólitos do ciclo dos ácidos tricarboxílicos. Muitos organismos são capazes de utilizá-lo

como única fonte de carbono. Um organismo que utiliza o citrato utiliza também sais de amônia como única fonte de nitrogênio. A degradação alcaliniza o meio e o torna azul devido a adição do corante azul de bromotimol, sensível a pH alcalino.

Este teste foi realizado através do Kit API 20E e também inoculando as linhagens a serem identificadas em tubos inclinados contendo meio de cultura estéril composto por 0,02% de $MgSO_4$, 0,1% de NH_4PO_3 monobásico, 0,1% de K_2PO_4 dibásico, 0,2% de citrato de sódio, 0,5% de NaCl, 1,5% de ágar e 0,08g de azul de bromotimol, com pH ajustado para 7,0. As linhagens foram incubadas a 30°C por 48h, onde o desenvolvimento da coloração azul indica teste positivo.

3.2.1.5.12 Prova de Voges-Proskauer

O ácido pirúvico, principal composto formado pela degradação fermentativa da glicose, é metabolizado através de várias vias, de acordo com os sistemas enzimáticos que possuem as diferentes bactérias. Uma dessas vias produz a acetoína, que na presença do oxigênio atmosférico e KOH 40%, a acetoína é convertida em diacetila e o α -naftol atua como catalisador para revelar o complexo de cor vermelha. Este teste foi realizado através do Kit API 20E, incubado a 30°C por 48h. Após este período de incubação adicionou-se os reagentes α -naftol e KOH 40% e esperou-se 15min para a leitura do resultado da reação.

3.2.1.5.13 Teste de Descarboxilase

As descarboxilases são um grupo de enzimas substrato-específicas que atuam sobre a porção carboxila dos aminoácidos formando aminas de reação alcalina. Lisina, ornitina e arginina são os três aminoácidos habitualmente avaliados na identificação de bactérias. Estes testes foram realizados também com o Kit API 20E, incubado a 30°C por 48h. As cúpulas contendo os meios, após as culturas inoculadas, foram cobertas por óleo mineral com a finalidade de se criar condições anaeróbicas de fermentação. O aparecimento da coloração azul púrpura do caldo indica prova positiva.

3.2.1.5.14 Prova da Urease

A urease é uma enzima presente em muitas espécies de microrganismos capazes de hidrolisar a uréia. A amônia reage em solução para formar carbonato de amônio, resultando na alcalinização e aumento do pH do meio. Este teste foi realizado com o Kit API 20E, onde após inoculação das células no meio, o kit foi incubado a 30°C por 48h, cujo desenvolvimento da coloração vermelha representa a degradação da uréia.

3.2.1.5.15 Produção de ácidos a partir de carboidratos

Muitos microrganismos tem a capacidade de produzirem ácidos quando fermentam certos carboidratos em anaerobiose. Neste teste, as linhagens a serem identificadas foram inoculadas em um meio de cultura, meio CHB, constituídos por 0,2% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,05% de extrato de levedura, 0,1% de triptona, 0,018%

do reagente fenol em tampão fosfato pH 7,8. A seguir as linhagens foram inoculadas no Kit API-50CHB, o qual era constituído por 5 tiras, onde cada tira continha 10 cúpulas com diferentes açúcares (primeira tira continha 1 controle mais 9 açúcares), sendo testados um total de 49 açúcares. Neste teste a primeira cúpula é isenta de substrato, não havendo portanto mudança de coloração do meio inoculado. O resultado é considerado positivo quando a coloração do meio em relação ao controle muda de vermelho para amarelo nas cúpulas contendo os diferentes carboidratos, onde a mudança de coloração do meio significa a mudança de pH e consequente produção de CO₂, que quando dissolvido em meio aquoso resultava na formação do ácido carbônico.

3.2.2 Estudo do Processo Fermentativo

3.2.2.1. Estudo do processo fermentativo para a obtenção de biosurfactante em agitador rotativo – Composição do meio basal

Nesta primeira parte do estudo, as três linhagens de *B. subtilis* produtoras de biosurfactante, foram inoculadas em frascos de erlenmeyer de 50mL, com 15mL do meio de cultura basal composto de: 3% de glicose, 3% de NaCl, 0,1% de (NH₄)SO₄, 0,025% de MgSO₄, 0,1% de extrato de leveduras e 1% de solução de minerais (cuja composição em g/L foi: MnSO₄ 3,00 ; FeSO₄ 0,10 ; CaCl₂ 0,10 ; CoCl₂ 0,10 ; ZnSO₄ 0,10 ; CuSO₄ 0,01 ; H₃BO₄ 0,01 ; NaMnO₄ 0,01) em tampão fosfato 0,2M (COOPER *et alii*, 1981; SANTOS & PASTORE, 1997). Este meio padronizado e submetido a variações como a substituição da fonte de carbono, fontes de nitrogênio, adição de hidrocarbonetos e outros compostos de caráter hidrofóbico e estudo da melhor relação C/N. Todos ensaios desta etapa foram realizados em agitador rotativo.

3.2.2.2. Determinação da Massa Celular e Massa de Extrato Bruto por gravimetria

A massa celular e o extrato bruto (resultantes da acidificação com HCl) foram quantificados por gravimetria utilizando-se secagem por 24h a 105°C, em estufa de temperatura controlada, até peso constante .

3.2.2.3. Precipitação Ácida do Biosurfactante produzido

Após o período de fermentação, o meio de cultura foi centrifugado a 8000 rpm por 10 min, para a separação da massa celular. Após centrifugação, o sobrenadante livre de células foi acidificado com HCl 5N até pH 2,0, e a seguir mantido por 24h à 4°C. O biosurfactante foi separado do sobrenadante acidificado por centrifugação a 10.000 rpm por 15min.

3.2.2.4. Determinação da Tensão Superficial

A medida da Tensão Superficial foi feita utilizando-se um tensiômetro KRUESS PROCESSOR TENSIOMETER K12 V3.11(KRUSS GmbH Alemanha) . As análises foram feitas pelo método de placa, utilizando uma placa de platina iriada com perímetro molhado de 40,0 mm, comprimento de 19,9 mm e espessura de 0,10 mm, denominada placa de Wilhelmy.

As condições de análise foram pré-estabelecidas por tentativa, sendo padronizadas para todos os ensaios com as seguintes condições: volume médio da amostra 10 mL, temperatura ambiente, Intervalos de medidas 15seg, e desvio padrão referente a 5 medidas de: $\leq 0,20$ mN/m.

O equipamento foi calibrado sempre no início e término das análises, medindo-se da tensão superficial da água destilada cujo valor é em torno de 72mN/m.(ROSEN, 1971)

3.2.2.5. Determinação da Tensão Interfacial

A medida da Tensão Interfacial foi feita em um tensiômetro KRUESS PROCESSOR TENSIOMETER K12 V3.11(KRUSS GmbH Alemanha) . As análises foram feitas pelo método do anel, utilizando um anel de platina.

As medidas foram realizadas com meios de cultura basal fermentados por 72h, isento de células, tendo sido centrifugados a 8000 rpm por 10 min contra igual volume de hexadecano, como meio imiscível. Neste método, inicialmente o aparelho é zerado com hexadecano, que constitui a fase leve da mistura, e a seguir 15mL do meio de cultura fermentado contendo o biosurfactante é colocado no aparelho, o anel inserido, e somente depois quantidade igual de hexadecano é adicionada delicadamente com pipeta automática sobre o meio fermentado. Durante a medida da tensão interfacial, o anel sobe da fase pesada (meio fermentado) até a interface entre a fase pesada e a leve, e então determina a tensão entre elas.

O equipamento é zerado antes do início das análises com o hexadecano, e sempre determina-se a tensão interfacial do sistema hexadecano e água destilada, cujo valor é em torno de 45,30 mN/m.

3.2.2.6 Influência da Temperatura de Incubação na Produção de Biosurfactante

As três linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B, produtoras de biosurfactante, foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 50mL contendo 15mL do meio basal descrito no item 3.2.2.1. As linhagens foram incubadas em diferentes temperaturas, tais como 25°C, 30°C, 40°C e 45°C por 48h a 150rpm. Após o término do período de fermentação, determinou-se a tensão superficial do sobrenadante centrifugado, e quantificou-se a massa celular e o extrato bruto para cada uma das temperaturas testadas para cada uma das linhagens estudadas.

3.2.2.7 Influência do pH na Produção de Biosurfactante

As três linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B, produtoras de biosurfactante, foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 50mL contendo 15mL do meio basal de composição descrita no item 3.2.2.1 onde variou-se apenas o pH dos meios. As linhagens foram incubadas em pHs tais como 6,0; 6,5; 7,0 e 8,0, por 48h a 30°C. A seguir, após o término da fermentação, foi medida a tensão superficial do sobrenadante centrifugado, e quantificados a massa celular e o extrato bruto resultante da acidificação com HCl, para o meio de cultura nos diversos pHs.

3.2.2.8 Influência da Concentração de NaCl na Produção de Biosurfactante

As três linhagens de *B.subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B produtoras foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 50mL contendo 15mL do meio descrito conforme item 3.2.2.1, variando-se apenas as concentrações de NaCl, tais como 0%, 1%, 3% e 5%, sendo utilizado neste experimento a temperatura ótima e o pH ótimo, resultantes de testes descritos e realizados anteriormente.

Foi medida a tensão superficial do sobrenante centrifugado, e a massa celular e o extrato bruto resultante da acidificação com HCl foram secos e pesados.

3.2.2.9 Influência de uma fonte de nitrogênio (orgânica ou inorgânica) na produção de biosurfactante

Foram testadas várias fontes de nitrogênio, em meio basal conforme descrito em item 3.2.2.1, em agitador rotativo, na concentração de 0,1%. Neste experimento foram utilizadas condições do processo fermentativo, como temperatura de 30°C, concentração de NaCl de 3% e pH igual a 6,5, de acordo com testes realizados previamente. As fontes testadas neste experimento foram: uréia, NaNO₃, (NH₄)₂SO₄, extrato de levedura e peptona.

3.2.2.10 Influência de minerais na produção de biosurfactantes

Neste ensaio foi observada a influência da suplementação de sais minerais, no caso $MnSO_4$, $FeSO_4$ e $Fe_2(SO_4)_3$ nas concentrações de 3,3 μ l de sais minerais/ml de meio basal, 13,3 μ l/mL e 66,7 μ l/ML, ao meio basal, na produção de biosurfactante pelas linhagens de *B.subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B, em agitador rotativo, em frascos erlenmeyers com 15ml do meio de cultura composto conforme descrito item 3.2.2.1 . As linhagens forma incubadas a temperatura de 30°C, 150rpm por 72h. Após o período de fermentação, as células foram separadas do sobrenadante, quantificadas por gravimetria, e o sobrenadante foi acidificado com HCl 5N, para que ocorresse a precipitação do biosurfactante. O sobrenadante acidificado foi centrifugado a 8.000rpm por 15min. e a massa de biosurfactante (extrato bruto) foi quantificada por gravimetria.

3.2.2.11 Influência da fonte de carbono na produção de biosurfactantes

Neste ensaio, conforme meio basal descrito item 3.2.2.1, foram testadas diversas fontes de carbono, como glicose, sacarose, maltose, lactose, galactose, frutose, amido e glicerol na concentração de 3%, onde tomou-se a glicose como referência e observou-se a influência de outras fontes de carbono na produção de biosurfactantes para cada uma das três linhagens de *B. subtilis* estudadas, LB-262, LB-1993A e LB-1993B. As linhagens foram incubadas por 48h, 150rpm a 30°C.

A seguir foi medida a tensão superficial do sobrenante centrifugado, e foi quantificada a massa celular e o extrato bruto de biosurfactante resultante da acidificação com HCl por diferença de peso seco. A secagem realizada por 24h a 105°C, como descrito no item 3.2.2.2.

3.2.2.12. Influência da fonte de nitrogênio composta na produção de biosurfactantes

Neste ensaio, em meio basal conforme item 3.2.2.1, a fonte de nitrogênio padrão extrato de levedura e $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, foi substituída por diferentes fonte de nitrogênio, orgânicas ou inorgânicas, na concentração de 0,1%. A seguir as fontes de nitrogênio como peptona e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , e extrato de levedura foram combinadas entre si, com a finalidade de obtermos uma maior produção de biosurfactante.

As linhagens foram incubadas em agitador rotativo, temperatura de 30°C , por 48h a 150rpm.

3.2.2.13 Determinação da melhor relação C/N para produção de Biosurfactantes

Neste ensaio foi determinada a melhor relação C/N, com a glicose como fonte de carbono, para as linhagens estudadas LB-262, LB-1993A e LB-1993B. Foram testadas as seguintes proporções de C/N: 1, 5, 10, 20, 30 e 40, a fim de se determinar a influência da relação C/N na produção de biosurfactante.

O meio de cultivo basal foi composto conforme item 3.2.2.1, e as linhagens após incubação foram incubadas a 30°C , 150rpm por 48h.

3.2.2.14. Influência da adição de petróleo e de hidrocarbonetos com diferentes tamanhos de cadeia na produção de biosurfactantes

As linhagens *B. subtilis* LB-262, LB-199-3A e LB-199-3B foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 50mL contendo 15mL de meio de cultura basal descrito conforme item 3.2.2.1. A seguir, adicionou-se 1% de

compostos insolúveis, separadamente, ao meio basal e as linhagens após inoculação foram incubadas a 30°C, 150rpm por 48h..

Os compostos testados foram: petróleo bruto e hidrocarbonetos de cadeias saturadas, alcanos, como C14, C16, C18, C20 e C28, também foram testados hidrocarbonetos aromáticos como squaleno, tolueno e benzeno. Os meios constituídos dos diferentes tipos de compostos insolúveis tiveram a tensão superficial medida, após as amostras serem centrifugadas. A seguir as massas celulares resultantes foram quantificadas e os extratos bruto de biosurfactante, após precipitação com HCl, foram quantificados, conforme descrito no item 3.2.2.3.

3.2.2.15. Influência do tempo de fermentação no crescimento celular e produção de biosurfactantes

Neste ensaio, as linhagens de *B.subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B estudadas, foram inoculadas em frascos de Erlenmeyer de 250mL com 100mL de meio basal composto conforme descrito item 3.2.2.1. As linhagens foram incubadas em agiador rotativo a temperatura de 30°C por 120h com 150rpm.

A seguir alíquotas de 10mL foram retiradas em intervalos de 12, 24, 48, 72, 96 e 120h, centrifugadas, e a massa celular teve sua absorbância e peso seco determinados, e a tensão superficial determinada

3.2.2.16 Utilização de resíduos industriais de processamento de alimentos como fonte de carbono para produção de biosurfactante

Neste experimentos foram testados três tipos de resíduos industriais, dois provenientes do processamento de produtos cárneos, portanto ricos em gorduras, e pobres ou isentos de açúcares, e um proveniente do processamento da farinha de mandioca, rico em fontes de carbono simples e isento de resíduos gordurosos.

3.2.16.1 Resíduos industriais provenientes do abate de bovino e suínos : resíduos constituídos de 70% de gordura bovina e 30% de gordura suína.

Dois tipos de resíduos gordurosos provenientes da mesma empresa foram adicionados ao meio basal, descrito em item 3.2.2.1 na concentração de 1%, com a finalidade de induzir um aumento na produção de biosurfactante. Os resíduos, proveniente de uma indústria de produtos cárneos, devido a sua composição, foram denominados de gordura branca (GB), cujo resíduo proveniente do abate não sofreu nenhum tipo de tratamento e outro denominado de gordura preta (GP), resultante do tratamento da gordura branca e constituído não somente de gordura animal mas de outros resíduos proveniente da fábrica. As culturas foram cultivadas em agitador rotativo, a 150rpm a 30°C por 48h. A seguir foram realizadas medidas a tensão superficial dos sobrenantes, e quantificou-se o extrato bruto resultante da acidificação com HCl. A determinação gravimétrica se deu após secagem a 105°C por 24 h.

3.2.16.2 -Produção de biosurfactante utilizando manipueira como substrato

A manipueira é resíduo industrial proveniente da prensagem da mandioca destinada à produção de farinha de mandioca. Neste experimento, a manipueira foi utilizada como substrato para a produção de biosurfactante. Para tanto, a manipueira coletada foi aquecida até temperatura de 85°C, com a finalidade da remoção de sólidos em suspensão, e a seguir, o resíduo foi deixado em repouso, para decantação dos sólidos. A seguir, o sobrenadante isento de sólidos mais pesados, foi centrifugado com a finalidade de remover os sólidos mais finos. Após tal tratamento, determinou-se seu pH, e então procedeu-se a esterilização do resíduo em autoclave, com aquecimento por 15min, 121°C e pressão de 1atm.

As linhagens de *B. subtilis*, LB-262, LB-1993A e LB-1993B, foram inoculadas em manipueira tratada conforme descrito acima, sem adição de outros nutrientes e em pH natural e também em pH ajustado para 6,5, e em manipueira adicionada de íons Mn^{+} em pH 6,5. As culturas foram cultivadas em agitador rotativo, a 150rpm a 30°C por 120h. Alíquotas foram retiradas após 12h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h, onde em cada um dos intervalos, foram realizadas medidas de tensão superficial dos meios de cultura isentos de células, determinação do teor de glicose, determinação da massa celular e a de extrato bruto de biosurfactante.

3.2.17 Comparação entre a produção de biosurfactante produzido em meio basal e manipueira

Neste ensaio, as linhagens de *B.subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B foram inoculadas em meio de cultivo composto de manipueira isenta de sólidos em suspensão, pH natural de 5,6, sem adição de outros nutrientes e meio basal conforme descrito no item 3.2.2.1. As linhagens foram incubadas em agitador rotativo a 150 rpm, temperatura de 30°C por 120h.

A seguir foram realizadas medidas a tensão superficial dos sobrenantes, e quantificou-se o extrato bruto resultante da acidificação com HCl. A determinação gravimétrica se deu após secagem a 105°C por 24 h. (SANTOS *et alii*, 1999)

3.3 Atividade Emulsificante dos Biosurfactantes produzidos

Este ensaio teve o objetivo de avaliar a capacidade dos biosurfactantes produzidos em emulsificar compostos insolúveis, formando emulsões estáveis (CIRIGLIANO & CARMAN, 1984). Para tanto, os meios de cultura com 48h de fermentação foram centrifugados a 8000 rpm por 10min, e a seguir filtrados em membrana millipore 0,45µm, para total remoção de partículas. A seguir, em diversos tubos de ensaio de igual especificação foram colocados 0,1mL da substância a ser emulsificada, no caso, tetradecano, hexadecano, squaleno, óleo de milho e óleo de girassol e 4mL do meio basal previamente centrifugado e filtrado, para cada uma das linhagens estudadas. A seguir os tubos contendo o meio de cultura e o composto a ser emulsificado, foram agitados vigorosamente em agitador vortex com alta rotação. Após 10 min de repouso foi medida a absorbância a 540 nm. O meio de cultura basal sem fermentação foi utilizado como branco.

3.4 Concentração e Purificação do Extrato Bruto de Biosurfactante

3.4.1 Concentração do biosurfactante produzido e pré-purificação através do processo de ultrafiltração com membranas

A concentração e pré-purificação do extrato bruto de biosurfactante produzido pelas linhagens de *B.subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B, em meio de cultura basal em agitador rotativo, foram realizadas pelo sistema de ultrafiltração AMICON, de capacidade de 200mL. Foram testados três tipos de membranas com os seguintes pesos moleculares: 10.000 Da (PM10 - poliétersulfona), 30.000 Da (YM30 – celulose regenerada) e 50.000 Da (XM50 - PVC). A seguir, com a finalidade de se observar a eficiência da concentração do biosurfactante por cada uma das membranas testadas, avaliou-se o comportamento tensoativo do meio fermentado diluído em água.

Alíquotas de 1ml (CMD^{-1}) e 0,1ml (CMD^{-2}) do meio fermentado, para cada uma das linhagens, foram diluídos em 10mL de água, e tiveram a tensão superficial medida. A seguir o meio de cultura retido (RE) e o permeável, filtrado (PE), sofreram as mesmas diluições em água. O padrão, meio basal sem inóculo também foi diluído em água, nas mesmas proporções que as amostras, com a finalidade de se comparar o comportamento do filtrado, o qual após ultrafiltração, que não deveria mais possuir propriedades tensoativas, como o padrão.

3.4.2 Avaliação da eficiência da ultrafiltração

A fim de se avaliar a eficiência das membranas testadas em concentrar a surfactina presente no meio de fermentação em agitador rotativo, após centrifugação, mediu-se a tensão superficial do sobrenadante após fermentação, do

sobrenadante retido em cada uma das membranas e a tensão do sobrenadante que passou pela membrana. O padrão, meio de cultura sem inóculo, e os meios fermentados das três linhagens estudadas, resultante da ultrafiltrações com as membranas, PM10, YM30 e XM50, foram diluídos em 10ml de água, nas concentrações de 1ml (CMD^{-1}) e 0,1ml (CMD^{-2}) e seu comportamento tensoativo comparado com o padrão. Quanto aos meios retidos, seguiu-se o mesmo procedimento para o permeado, porém seu comportamento tensoativo após diluição em água foi comparado com o meio de cultura fermentado. Este teste foi realizado para com o meio basal das as três linhagens de *B.subtilis* produtoras, LB-262, LB-1993A e LB-1993B.

3.5 Determinação de glicose pelo método da glicose oxidase em meio basal e manípueira ao longo do processo fermentativo para cada uma das linhagens estudadas

Neste ensaio, o teor de glicose de amostras do meio de cultura coletadas durante o processo de fermentação foram determinado pelo método da glicose oxidase (BERGMEYER,1974). Estas análises foram realizadas através de método enzimático onde, 20 μ l da amostra a ser analisada é adicionada a 2mL do reativo composto da enzima glicose-oxidase, fenol, 4-aminofenazona e peroxidase. Em primeiro momento a glicose presente no meio reage com a glicose oxidase do reativo formando ácido glucônico e H_2O_2 . A seguir a H_2O_2 produzida reage com o composto 4-aminofenazona e com a peroxidase presentes no reativo adicionado formando o composto 4-p-benzoquinona-monoiminofenazona, cuja leitura é feita em espectrofotômetro a 505nm.

A quantidade de glicose presente é determinada após a leitura da absorbância dividindo-se o valor de absorbância obtido pelo valor de absorbância do padrão (20 μ l de solução estéril de glicose em 2mL do reativo), e ao final o

valor obtido pela divisão é multiplicado por 100. Estas análises tiveram o objetivo de analisar o consumo de glicose pelas linhagens estudadas ao longo do processo fermentativo e crescimento celular. Neste ensaio, em intervalos de 24, 48, 72, 96 e 120h, foram retiradas alíquotas do meio de cultura, onde após centrifugação, os meios de cultura fermentados para cada uma das linhagens de *B.subtilis* produtoras, LB-262, LB-1993A e LB-1993B, em agitador rotativo e em fermentadores de bancada e piloto, utilizando meio basal e manipeira,

Cálculo da glicose: $D/P \times 100$, onde D = absorvância da amostra a 505nm, e P = absorvância a 505nm obtida com 20 μ l de solução padrão de glicose

3.6 Produção de biosurfactante em fermentador

3.6.1 Produção de biosurfactante em fermentador de bancada

3.6.1.1 Preparação do pré-inóculo para produção de biosurfactante em fermentador de bancada

Para os ensaios em fermentador de bancada foi necessária a preparação de um pré-inóculo, em meio de cultura basal conforme item 3.2.2.1. Para tanto, linhagens de *B.subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B com 24h de crescimento em tubos inclinados contendo meio de manutenção conforme item 3.1.1, foram utilizados para a inoculação do pré-inóculo, o qual foi cultivado em agitador rotativo a 30°C, por 16h a 150rpm.

Após o término do tempo de cultivo, o pré-inóculo foi transferido para o fermentador de bancada na proporção de 3% do volume de trabalho presente no fermentador e a seguir foi observado o crescimento celular de acordo com o curso da fermentação.

3.6.1.2 Produção descontínua de biosurfactante em fermentador de bancada

Em meio de cultura basal conforme descrito no item 3.2.2.1, foi realizada a produção de biosurfactante, para cada uma das linhagens produtoras, em fermentador de bancada New Brunswick, BIOFLO III. Foram acompanhados fatores como o oxigênio dissolvido durante o processo de fermentação, variação do pH, massa celular e tensão superficial. Um novo fator foi estudado durante a produção do biosurfactante em fermentador, que foi a emulsificação do biosurfactante durante a fermentação devido à injeção de ar, que em contato com o biosurfactante do meio provocou a emulsificação deste e a necessidade de sua coleta na forma de espuma. (CARRERA *et alii*, 1993a) As condições estabelecidas a princípio para a produção de biosurfactante em fermentador de bancada foram 50% de oxigênio dissolvido, 150-300rpm, conforme o nível de oxigênio dissolvido, 0,5vvm de ar por litro de meio.

3.6.1.3 Determinação do KLa (coeficiente de transferência de oxigênio) para cada uma das linhagens estudadas em fermentador de bancada

Em intervalos de 0h, 6h, 12h, 18h, 24h e 48h do processo de fermentação, o KLa foi calculado para cada uma das linhagens produtoras em fermentador de bancada. Foi utilizado o método “gassing out dinámico”(MANZONI & CAVAZONI, 1998), a fim de se determinar o consumo de O₂ microbiano durante o processo fermentativo. Para isso, em cada intervalo de fermentação especificado, o fornecimento de ar ao meio foi suspenso e após 3 min foi medido o decaimento do oxigênio dissolvido no meio de fermentação em intervalos de tempo de 3 min, e após 15min foi medida a elevação do oxigênio dissolvido no meio de cultura com o retorno do fornecimento de ar ao meio de cultura. Com os

dados obtidos o valor de K_La foi determinado para cada intervalo especificado, durante o processo de fermentação, para cada uma das linhagens estudadas.

3.6.1.4 Coleta do biosurfactante produzido em meio basal em fermentador de bancada pelo fracionamento da espuma coletada

A produção de biosurfactante em fermentador de bancada diferiu em um dos aspectos da produção em agitador rotativo pelo fato de que neste último não havia a injeção de ar diretamente ao meio de cultura ao longo do processo fermentativo. Na produção de biosurfactante por linhagens de *B.subtilis*, a introdução de ar provocou a emulsificação do biosurfactante dissolvido no meio, e sua expulsão na forma de espuma através do dispositivo de exaustão de ar. Devido a tal peculiaridade, foi acoplada uma saída lateral ao fermentador, onde uma mangueira conectada a esta saída foi ligada a um funil de separação a fim de se coletar o biosurfactante emulsificado. A utilização de um funil de separação foi feita pelo fato de possibilitar a separação do meio de cultura que poderia eventualmente ser expulso do fermentador juntamente com a espuma. Esta separação não seria possível se a coleta da espuma fosse realizada em um kitassato. A seguir, a espuma coletada teve a tensão superficial, e a concentração micelar diluídas determinadas, conforme metodologia descrita.

3.6.2 Produção de biosurfactante em fermentador piloto

3.6.2.1 Preparo do pré-inóculo

Para os ensaios em fermentador piloto foi necessária a preparação de dois pré-inóculos em meio de cultura basal conforme item 3.2.2.1. Para tanto, linhagens de *B.subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B com 24h de crescimento

em tubos inclinados contendo meio de manutenção conforme item 3.1.1, foram utilizados para a inoculação do primeiro inóculo, o qual foi cultivado em agitador rotativo a 30°C, por 16h a 150rpm.

Após o término do tempo de cultivo, o primeiro inóculo foi transferido para um segundo inóculo, contendo o mesmo meio de cultura do primeiro, e este foi incubado na mesmas condições do inóculo anterior. Após o término do período de incubação do segundo inóculo, este foi transferido para o fermentador de bancada na proporção de 3% do volume de meio presente no fermentador .

3.6.2.2 Produção Descontínua de biosurfactante em Fermentador piloto

Em meio de cultura basal de acordo com o item 3.2.2.1, foi realizada a produção de biosurfactante, para cada umas das linhagens produtoras, em Fermentador piloto New Brunswick BIOFLO 8000 MP-80, através de produção descontínua, em batelada . Foram estudados fatores como oxigênio dissolvido durante o processo de fermentação, variação do pH, massa celular, tensão superficial e um novo fator que foi a emulsificação do biosurfactante durante a fermentação devido a injeção de ar, que em contato com o biosurfactante do meio provocou a emulsificação deste e a necessidade de sua coleta na forma de espuma.(CARRERA *et alii*, 1993a). As condições estabelecidas a princípio para a produção de biosurfactante em fermentador de bancada foram 50% de oxigênio dissolvido, 150-300rpm, conforme o nível de oxigênio dissolvido, 0,5vvm de ar por litro de meio.

3.6.2.3 Determinação do K_La (coeficiente de transferência de oxigênio) para cada uma das linhagens estudadas em fermentador piloto

Em intervalos que variaram de acordo com cada uma das três linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B, estudadas, durante o processo de fermentação, o K_La foi calculado para cada uma das linhagens produtoras em fermentador piloto. Foi utilizado o método “gassing out dinámico”(MANZONI & CAVAZONI, 1998), a fim de se determinar o consumo de O_2 microbiano durante o processo fermentativo. Para isso, em intervalos ao longo da fermentação, conforme o metabolismo de cada uma das três linhagens estudadas, o fornecimento de ar ao meio foi suspenso, e foi medido o decaimento do oxigênio dissolvido no meio de fermentação em intervalos de tempo de 1min, e após 10min foi medida a elevação do oxigênio dissolvido no meio de cultura com o retorno do fornecimento de ar ao meio de cultura. Com o dados obtidos, o valor de K_La foi determinado para cada uma das linhagens produtoras, em diferentes intervalos da fermentação.

3.6.2.4 Coleta do biosurfactante produzido em meio basal em fermentador piloto pelo fracionamento da espuma coletada

A produção de biosurfactante em fermentador piloto difere em um dos aspectos da produção em fermentador de bancada pelo fato de no fermentador piloto New Brunswick 8000 MP80 não ser possível acoplar uma saída lateral para a coleta da espuma e conseqüentemente esta teve de ser aspirada com uma bomba a vácuo, uma vez que este modelo de fermentador era dotado de um sensor que controlava os níveis de espuma dentro do fermentador, o qual prejudicou

sensivelmente o processo, pois o sensor provocava o desligamento da agitação quando os níveis de espuma era elevados.

3.6.2.5 Modelo de planta piloto para a produção descontínua de biosurfactante em Fermentador piloto

Nesta etapa, de acordo com os experimentos realizados em fermentador piloto, e levando-se em consideração as dificuldades encontradas no processo de produção da surfactina, foi proposto uma planta completa para a produção piloto da surfactina produzida pelas linhagens de *B.subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B, onde nesta etapa levou-se em consideração como seria uma linha completa de produção.

3.7 Determinação das propriedades tensoativas dos biosurfactantes produzidos pelas três linhagens produtoras em meio basal e manipueira

3.7.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

A CMC é definida como a concentração de surfactante necessária para se iniciar a formação de micelas em solução. Após atingir tal concentração, a produção de surfactante pode continuar aumentando, porém não ocorre mais abaixamento da tensão superficial.

A determinação da CMC foi realizada medindo-se a tensão superficial do meio fermentado através de diluições sucessivas, com igual volume de água destilada. Foi construído um gráfico com $\ln \text{ conc. (concentração do biosurfactante)}$ x TS (tensão superficial) onde a CMC foi determinada para o meio basal fermentado em agitador rotativo, fermentador de bancada e fermentador piloto para cada uma das três linhagens de *B. subtilis* estudadas.

3.7.2 Determinação da Concentração Micelar Diluída (CMD)

A CMD mede a capacidade do biosurfactante em abaixar a tensão superficial da água destilada. Para essa determinação, alíquotas de 0,1mL foram retiradas ao longo da fermentação em meio basal e manipueira, em agitador rotativo e fermentador de bancada, para cada uma das linhagens estudadas, a fim de se determinar a curva tensoativa ao longo do processo de fermentação. As alíquotas foram diluídas em água destilada até que se completasse o volume final de 10mL.

3.8 Determinação do teor de proteína do biosurfactante concentrado por ultrafiltração

3.8.1 Determinação proteica pelo método de Lowry dos biosurfactantes concentrados através da ultrafiltração

A quantidade de proteína presente no meio de cultura basal e de manipueira, após fermentação pelas linhagens de *B. subtilis* estudadas, foram determinadas pelo método de LOWRY *et alii* (1951). Os meios fermentados foram submetidos a ultrafiltração em membrana YM30, e a determinação de proteína foi feita no meio retido e no permeado. O método consistiu na adição de 0,5mL da solução contendo o biosurfactante bruto a ser analisado em 2,5ml do reagente composto de 50ml da solução de Na₂CO₃ 2% (reagente C) em NaOH 0,1N (reagente A) com 1mL da solução de CuSO₄.5H₂O 0,5% em tartarato de sódio e potássio 1% (reagente B). Após 10 min. da adição do reagente C, adiciona-se 0,25ml do reagente comercial de Folin-Cicalteau e espera-se mais 30min., onde a seguir lê-se a absorbância a 660nm. A quantidade de proteína na amostra é calculada de acordo com uma curva padrão construída com albumina de

soro bovino em diferentes concentrações conhecidas na concentração de 20 a 200 mg/mL.

3.9 Análise dos aminoácidos presentes no biosurfactante produzidos em meio basal e manipueira

3.9.1 Hidrólise da proteína em aminoácidos livres

Neste ensaio, amostras do biosurfactante bruto em solução, produzido em meio de cultura basal e manipueira, foram analisados quanto à sua composição de aminoácidos. Primeiro foi determinado o teor protéico da amostra de biosurfactante, pelo método de Lowry (1951). A seguir as amostras de biosurfactante bruto foram hidrolisadas com HCl 6N a 105°C por 24h. Após hidrólise, as amostras foram filtradas, lavadas com água destilada e ao fim adicionadas a um balão volumétrico, onde o volume foi completado com água destilada para 100mL. A seguir 10 mL da amostra diluída foram concentrados em rotavapor até a secagem completa, onde foi adicionado duas vezes 10mL de água destilada com a finalidade de remover possíveis impurezas das amostras. A seguir adicionou-se 5ml de tampão citrato pH 2.2, próprio para análise de aminoácidos.

3.9.2 Análise da composição dos aminoácidos nas amostras de biosurfactante após hidrólise da parte proteica em aminoácidos livres

Este método consiste na introdução de aminoácidos na forma livre no topo da coluna de troca iônica, onde tampões apropriados de alcalinidade crescente são introduzidos sequencialmente na coluna, de tal maneira a eluir os aminoácidos que ficam adsorvidos na coluna. A eluição se dá primeiro para os aminoácidos ácidos e neutros e depois os básicos e amônia. Após a corrida, os aminoácidos

misturam-se com o fluxo de ninidrina, iniciando-se uma reação azul-violeta, com todos os aminoácidos, com exceção da prolina e da hidroxiprolina, que tem cor de reação amarela-alaranjada. A seguir os aminoácidos são quantificados em um colorímetro e registrados num registrador. A coloração azul é lida a 570nm, e a amarela a 440nm. As áreas dos picos obtidas a partir da amostra desconhecida são quantificadas por comparação com as de uma mistura padrão de aminoácidos, pelo método e triangulação dos picos.

Neste ensaio, após o preparo das amostras conforme metodologia descrita no item 3.9.1, as amostras de biosurfactante bruto antes da injeção foram filtradas em filtro 0,45 μ m, e analisadas em analisador Pickering PCX 3100 com derivação pós-coluna. Foi utilizada uma coluna de Na⁺, de tamanho 8 μ m, 3mm de diâmetro interno por 250mm de comprimento. O fluxo utilizado para os tampões e para a ninidrina foi de 0,3ml/min. Quanto às temperaturas da coluna e do reator, estas foram de 55°C e 130°C, respectivamente .

3.10 Purificação dos biosurfactantes produzidos através do fracionamento da espuma

A obtenção de um biosurfactante purificado se deu através do cultivo das linhagens de *B. subtilis* estudadas, utilizando um fermentador de bancada de capacidade de 2,5L, conforme item 3.6.1.2. Uma mangueira foi acoplada lateralmente ao fermentador e ligada a funil de separação de forma que o meio de cultura expulso com a espuma, sendo mais denso, se acumulasse no fundo do funil e assim fosse possível sua remoção. A coleta da espuma foi realizada durante 48h, onde após este intervalo de tempo 2% de água destilada foi adicionada, provocando a liquefação da espuma. A seguir a espuma liquefeita foi filtrada em membrana millipore 0,22 μ m, duas vezes consecutivamente para a remoção de possíveis células e a seguir procedeu-se à concentração do

biosurfactante por ultrafiltração com membrana Amicon YM30. Este método de purificação faz com que seja possível a obtenção de uma surfactina com 99% de pureza e com tensão superficial extremamente baixa (CARRERA *et alii* 1993a).

3.11 Quantificação dos biosurfactantes produzidos utilizando HPLC

Amostras do meio de cultura fermentado em agitador rotativo e em fermentador de bancada e piloto, para cada uma das linhagens estudadas, conforme itens 3.2.2.1, 3.6.1 e 3.6.2, isento de células, foram filtradas em membrana millipore 0,45µm. A seguir, alíquotas de 20µL foram injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência, da marca Varian, com coluna C18 fase reversa, 5µm Merck, com fluxo de 1mL/min, gradiente linear, λ de 205nm com fase móvel constituída por 20% de solução 3,8mM de ácido trifluoracético e 80% acetonitrila. As amostras foram comparadas com uma solução de pH 8,0 constituída pelo padrão, Surfactina produzida pela Sigma com 98% de pureza (WEI & CHU, 1998). A quantidade de surfactina presente nos extratos foi considerada como a soma dos picos que constituem a surfactina comparando-se os tempos de retenção das amostras com o padrão.

3.12. Determinação do peso molecular dos biosurfactantes produzidos utilizando Espectrometria de massa de Bombardeamento rápido (FAB)

As amostras purificadas de biosurfactantes foram submetidas a análises de espectrometria de massa pelo método FAB (Fast Atom Bombardment) utilizando um equipamento FINNIGAN MAT 90, operado com uma bomba de césio, acelerador de voltagem de 5KV e uma corrente de 2-3mA. As amostras foram injetadas utilizando um probe de cobre com injeção direta, onde uma quantidade

de amostra em torno de 3 µg foram injetadas utilizando como matriz o glicerol ou 3-paranitrobenzilálcool. Além das amostras purificadas produzidas pelas linhagens estudadas, foi obtido o espectro do padrão da Sigma, cuja surfactina possui 98% de pureza, e este foi comparado com os espectros das amostras analisadas. (MULLIGAN & GIBBS, 1990).

3.13 Influência da surfactina na produção de α-amilase produzidas por linhagens do gênero *Bacillus*

3.13.1 Manutenção da linhagem

Uma linhagem de *Bacillus* sp. pré-selecionada como produtora de α-amilase foi mantida em tubos inclinados de ágar nutriente contendo 0,5% de amido solúvel .

3.13.2 Produção de α-amilases

Neste experimento, a linhagem de *Bacillus* sp. previamente selecionada como produtora de α-amilase, após ser mantida em ágar nutriente contendo amido, conforme item 3.13.1.1, foi inoculada em meio de cultura líquido, composto de 3% de extrato de levedura, 3% de (NH₄)₂SO₄, 0,2% MgSO₄.7H₂O, 1% de K₂HPO₄, 1% de NaCl e 1% de amido solúvel. A linhagem foi incubada em frascos de Erlenmeyers de 50mL contendo 15mL do meio de cultura descrito acima e foi incubada a 30°C, 150rpm por 48h. A seguir o meio de cultura fermentado contendo α-amilase foi centrifugado por 10min a 10.000 rpm e teve sua atividade determinada quanto à produção de açúcares redutores.

3.13.3 Influência da adição da surfactina e surfactante sintéticos como indutores na produção de α -amilase em diferentes tempos de fermentação

Nesta etapa, a surfactina produzida por cada uma das linhagens de *Bacillus subtilis* estudadas, LB-262, LB-1993A e LB-1993B, conforme metodologia descrita no item 3.2.2, e surfactantes sintéticos como Tween 20 e Tween 80, foram adicionados ao meio de cultura para a produção de α -amilase, na concentração de 0,033%. (GOES & SHEPPARD, 1999). Os surfactantes foram adicionados ao meio de cultura conforme descrito no item 3.14.1.2, em diferentes tempos de fermentação, uma no início da fermentação e outra após 24h de crescimento do microorganismo. A seguir avaliou-se a influência de cada surfactante adicionado no início da fermentação e após 24h.

3.13.4 Influência da adição da surfactina e surfactante sintéticos como indutores na produção de α -amilase em diferentes concentrações

Neste experimento, avaliou-se a influência da adição de três concentrações diferentes 0,033%, 0,33% e 0,66% dos surfactantes biológicos e sintéticos ao meio de cultura no início da fermentação. A seguir determinou-se a atividade enzimática de cada teste realizado. (GOES & SHEPPARD, 1999)

3.13.5 Determinação da atividade da α -amilase pelo método DNS*

A atividade enzimática das enzimas produzidas pelas linhagens estudadas foi determinada pelo método de BERNFELD (1955).

Este método consiste em adicionar 1ml da amostra contendo o extrato enzimático a 1mL do substrato preparado com 1% de amido solúvel isento de açúcares, a seguir o sistema é incubado por 3min em banho maria a 50°C a fim de estabilizar a temperatura. A seguir 2ml do reagente DNS foi adicionado ao sistema enzimático e o sistema foi incubado por 5min em banho com temperatura ebulição e a seguir o volume foi completado com 20ml de água e a seguir foi medida a absorbância a 540nm. O reagente utilizado foi preparado dissolvendo 30g de tartarato de sódio e potássio em 50mL de água e a seguir foi adicionado 20mL de NaOH 2N e a seguir cuidadosamente adicionou-se 1g de ácido 3,5 dinitrosalicílico. A atividade da α -amilase foi analisada comparando os resultados obtidos com a curva padrão da maltose, que é um dos produtos resultantes da ação da α -amilase .

3.14 Estabilidade do biosurfactante produzido em diversas condições de pH, temperatura e concentrações de NaCl

3.14.1 Estabilidade térmica

3.14.1.1 Determinação da estabilidade do biosurfactante bruto em diferentes temperaturas em diversos tempos de tratamento

Alíquotas de 0,1mL do meio basal fermentado e 0,1ml da manipueira fermentada, para cada uma das linhagens de *B. subtilis* estudadas, foram diluídos para cada 9,9ml de água destilada (CMD⁻²). Estas soluções foram incubadas em diferentes temperaturas como 50°C, 70°C, 90°C, e alíquotas foram retirada após 15, 30, 60 e 120 min de tratamento, a fim de se avaliar se o composto perde suas propriedades tensoativas quando aquecido a altas temperaturas. Após este período, as soluções aquecidas em diferentes temperaturas, foram analisadas quanto a tensão superficial e seus valores foram comparados com os valores de

tensão superficial das soluções que não sofreram tratamento ou seja, aquelas mantidas em temperatura ambiente.

3.14.1.2 Estabilidade dos biosurfactantes produzidos à autoclavagem seguida de refrigeração

Neste experimento 15mL dos sobrenadantes isento de células, meios de cultura fermentados em agitador rotativo por 72h, tiveram a tensão superficial determinada e a seguir foram submetidos ao processo de autoclavagem por 15min, 121°C e pressão de 1 atm. As amostras foram refrigeradas em banho de gelo, até que as amostras atingissem temperatura ambiente e tiveram novamente a tensão superficial medida, e os valores foram comparados com os obtidos antes do processo de autoclavagem.

3.14.2 Estabilidade e atividade do Biosurfactante em diferentes pHs

Alíquotas de 0,1mL do meio basal fermentado e da manipueira fermentada, para cada uma das linhagens produtoras, foram diluídos em tampões de 9,9mL de diferentes pHs, como, 2,6; 4,0; 5,75; 6,0; 6,5; 8,0 e 12,5 (soluções CMD⁻²). Foram então determinados os valores de tensão superficial, onde este experimento teve a finalidade de avaliar a capacidade tensoativa dos biosurfactantes em meios muito ácidos ou muito alcalinos.

3.14.3 Estabilidade do biosurfactante em soluções com diversas concentrações de NaCl

Alíquotas de 0,1mL do meio basal fermentado e da manipueira fermentada, para cada uma das linhagens produtoras, foram diluídos em 9,9mL de soluções com diferentes concentrações de NaCl, 0%, 2%, 4%, 6%, 8% e 12%, e a

seguir foram feitas medidas de tensão superficial. O ensaio teve a finalidade de avaliar a capacidade tensoativa em diferentes concentrações de NaCl .

3.15. Atividade microbiológica dos biosurfactantes e antibióticos produzidos pelas linhagens estudadas

3.15.1 Preparação dos extratos com propriedades antimicrobiana

3.15.1.1 Preparação do extrato de surfactina

A surfactina é um potente surfactante vastamente conhecido também por suas propriedades anti-microbiológicas, antitumorais, anticoagulantes e também anticolesterol. (VATER, 1989). Para que pudéssemos ter garantia da pureza da surfactina aplicada neste teste, bateladas de surfactina foram produzida em fermentador de bancada, e a surfactina purificada foi cuidadosamente coletada da espuma expulsa do fermentador durante o processo fermentativo (CARRERA *et alii*, 1993b).

A espuma coletada contendo a surfactina pura foi filtrada à vácuo em membrana 0,45 μ m, e logo após em membrana 0,22 μ m. A seguir a espuma foi concentrada por ultrafiltração utilizando membrana de 30KDa, conforme metodologia do item 3.9, e após concentração, o concentrado contendo a surfactina pura foi filtrado em condições estéreis utilizando filtros estéreis millex 0,22 μ m.

3.15.1.2 Preparação do extrato de antibiótico produzido simultaneamente a surfactina

Linhagens de *B. subtilis* são conhecidas por produzirem simultaneamente à surfactina, compostos antibióticos como a iturina A, e outros como a plipastina e a bacilomicina. Para tanto, o precipitado resultante da adição de HCl concentrado, processo padrão para a extração da surfactina bruta, foi então lavado à vácuo com tampão fosfato de sódio pH 7,0. Tal processo permite extrair um potente antibiótico (ROSSAL,1991), onde é importante evidenciar que o tampão fosfato de sódio não extrai a surfactina presente no precipitado, a qual é insolúvel no tampão utilizado. Após extração da fração antibiótica, procedeu-se aos passos de concentração e ultrafiltração utilizados em itens anteriores para a surfactina .

3.15.1.3 Preparação das culturas de microorganismos para os testes de atividade antimicrobiana

Culturas de bactérias consideradas patogênicas ao homem ou a animais, como *Salmonella choleraesuis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus equi*, *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, e da levedura *Candida albicans* foram cultivadas por 24h em tubos inclinados contendo ágar nutriente no caso da bactérias, e ágar malte no caso da levedura. Após tal período de incubação das culturas, foi preparado um inóculo em água destilada, e a transmitância das suspensões celulares foram padronizadas para 25%. A seguir 0,2mL deste inóculo preparado foi adicionado e homogeneizado em 12mL do meio de cultura especificados acima. Juntamente com os inóculos foi adicionado 1mL do corante 2,3,5-cloreto de trifênil tetrazolium ao meio, o qual provoca uma coloração rosada onde há

crescimento celular, proporcionado assim uma melhor visualização dos halos de inibição. A seguir o meio de cultura contendo o inóculo e o corante adequado foram adicionados a placas de Petri estéreis para o prosseguimento dos testes.

3.15.1.4 Detecção da atividade antibiótica

Neste experimento foi utilizado o método da difusão em placa, onde soluções estéreis de surfactina de diversas concentrações foram aplicadas nas placas preparadas conforme ítem 3.15.1.3. A seguir, um disco de metal tipo template com 6 orifícios, foi colocado sobre as placas inoculadas com as culturas, e a seguir os orifícios da placa foram preenchidos com soluções de surfactina em 3 diferentes concentrações . A seguir as placas foram incubadas por 24h a 37°C no caso da bactérias e a 30°C no caso da *C. albicans*. Após tal período o disco de aço inox foi retirado, e observou-se a formação do halo de inibição e seu diâmetro.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação do Microorganismo produtor de Biosurfactante

4.1.1 Característica Morfológicas

4.1.1.1 Morfologia Macroscópica das colônias

Após um período de incubação de 24h das linhagens estudadas em tubos inclinados contendo o meio de cultura citado no item 3.1.1, uma alçada de cada uma das linhagens foi diluída em água destilada estéril até a escala +2 de Mac Farland. A seguir, plaqueou-se a suspensão de células em placas de ágar nutriente e incubou-se as placas por 48h a 30°C. Após o período de incubação, verificou-se através de uma lupa as características macroscópicas das colônias das linhagens onde, conforme a tabela 4 e de acordo com as figuras 1,2 e 3, observamos as seguintes características:

TABELA 4: Características Morfológicas das colônias

Características das colônias	Linhagem LB-262	Linhagem LB-1993A	Linhagem LB-1993B
Tamanho	grande	grande	grande
Forma	circular	circular	circular
Elevação	plana	plana	plana
Margem	lobada	lobada	lobada
Superfície	rugosa	rugosa	rugosa
Densidade	opaca	opaca	opaca
Cromogênese	sem pigmentação	sem pigmentação	sem pigmentação
Cor	branca	branca	branca
Odor	ausente	ausente	ausente
Borda	irregular	irregular	irregular
Consistência	branca	branca	branca



FIGURA 1: Morfologia das colônias da linhagem LB-262 após 48h de incubação, a 30°C em ágar nutriente.

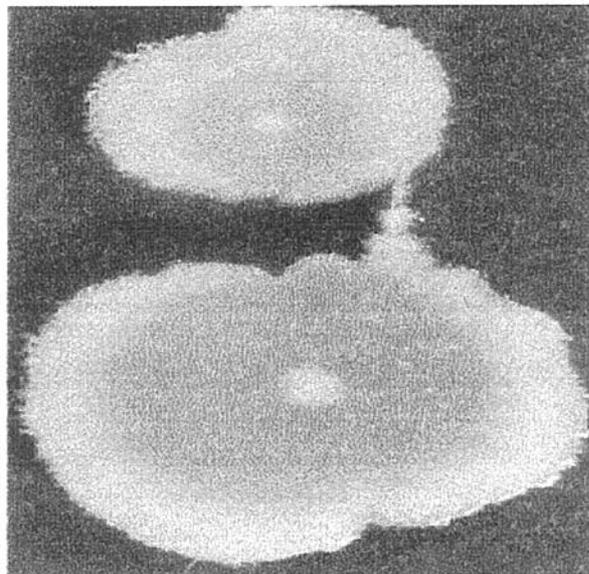


FIGURA 2: Morfologia das colônias da linhagem LB-1993A após 48h de incubação, a 30°C em ágar nutriente.

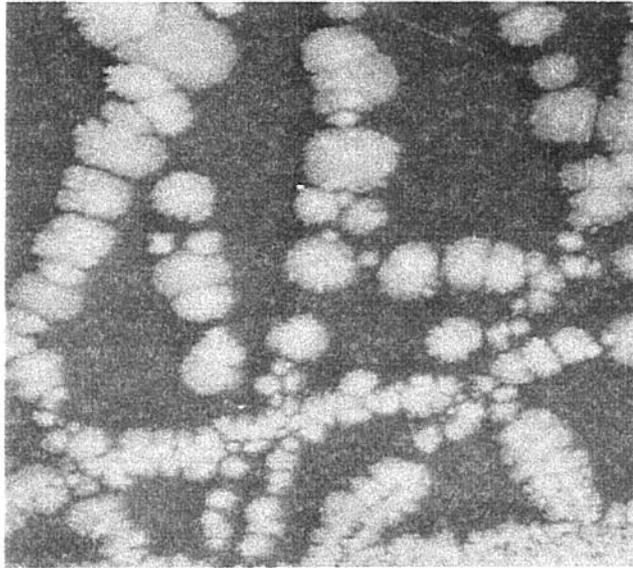


FIGURA 3: Morfologia das colônias da linhagem LB-1993B após 48h de incubação, a 30°C em ágar nutriente.

4.1.1.2 Características Microscópicas da Cultura

Neste teste observamos as características microscópicas das três linhagens a serem identificadas. Conforme podemos observar os dados da tabela 5 e as Figuras 4,5 e 6, estas mostram claramente serem as linhagens estudadas, bastonetes gram +. Quanto à presença de esporos, o que caracteriza o gênero *Bacillus*, as linhagens estudadas apresentaram esporos centrais e esporângio não entumescido, conforme podemos observar as Figuras 7,8 e 9, através da coloração verde malaquita, o que confirma, de acordo com Sneath *et alii* (1984) em Bergey's Manual de Bacteriologia Sistemática, serem as três linhagens estudadas pertencentes ao gênero *Bacillus* sp.

TABELA 5: Características Microscópicas da Cultura

Características	Linhagem LB-262	Linhagem LB-1993A	Linhagem LB-1993B
Formato da célula	bastonete	bastonete	bastonete
Gram	+	+	+
Esporo	presente	presente	presente
Formato do esporo	oval e central	oval e central	oval e central
Esporângio	não entumescido	não entumescido	não entumescido

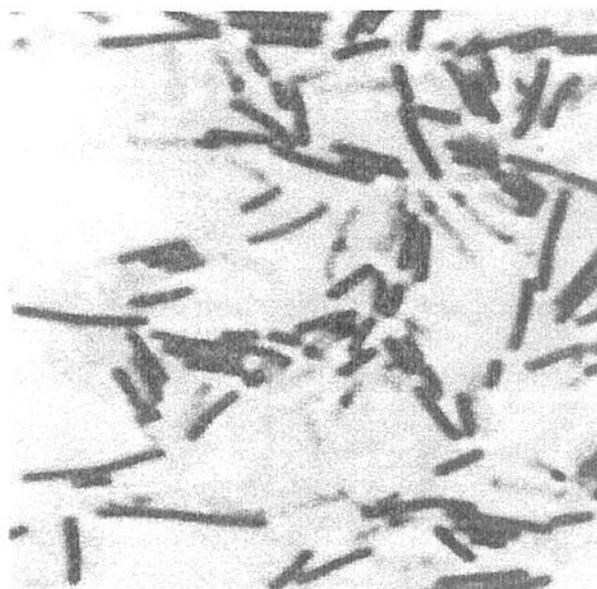


FIGURA 4: Características microscópicas da Linhagem LB-262 (aumento de 1000x), através da coloração de Gram, após 48h de incubação, a 30°C em ágar nutriente.

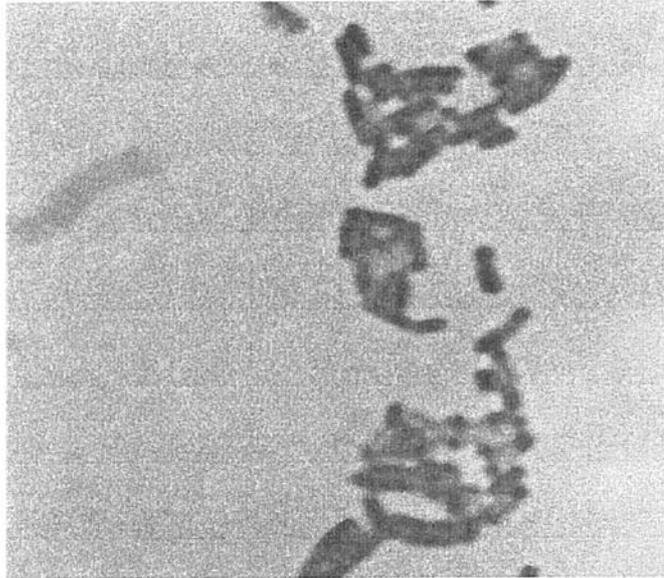


FIGURA 5: Características microscópicas da linhagem LB-1993A, através da coloração de Gram, após 48h de incubação, a 30°C em ágar nutriente (aumento de 1000x).

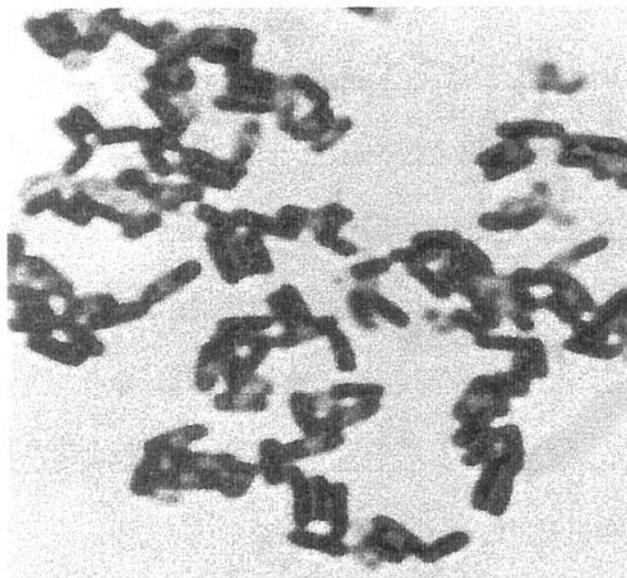


FIGURA 6: Características microscópicas da linhagem LB-1993B, através da coloração de Gram, após 48h de incubação, a 30°C em ágar nutriente (aumento de 1000x).

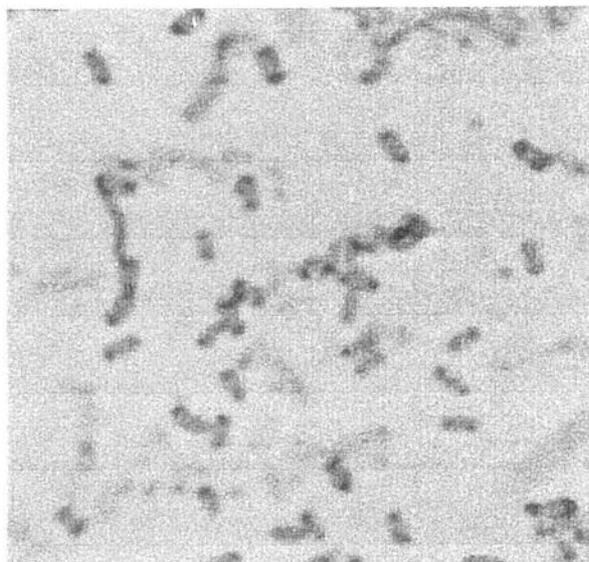


FIGURA 7: Esporos da Linhagem LB-262, através da coloração com verde de malaquita, após 7 dias incubação, a 30°C em ágar nutriente.

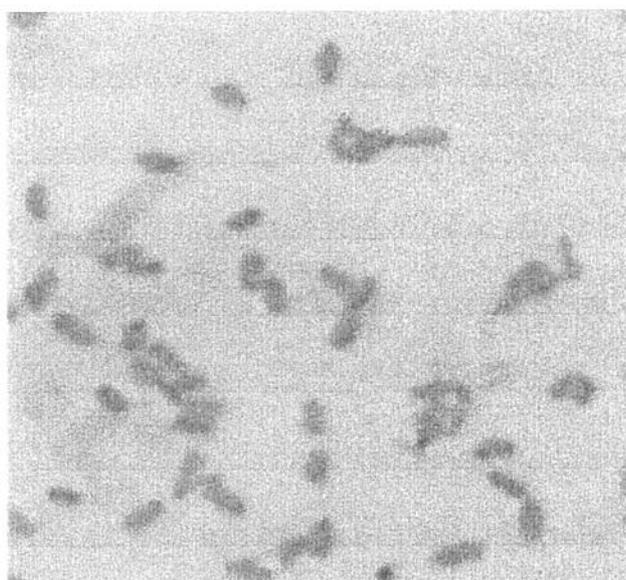


FIGURA 8: Esporos da Linhagem LB-1993A, através da coloração com verde de malaquita, após 7 dias incubação, a 30°C em ágar nutriente.

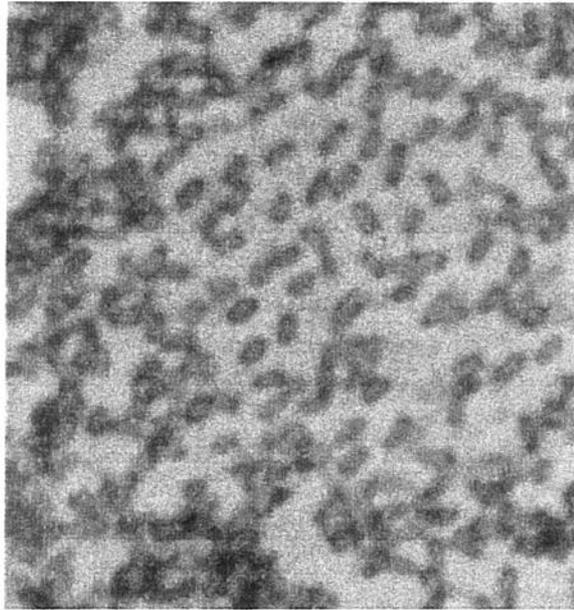


FIGURA 9: Esporos da Linhagem LB-1993B, através da coloração com verde de malaquita, após 7 dias incubação, a 30°C em nutriente ágar.

4.1.2 Características Fisiológicas

4.1.2.1 Determinação da Temperatura ótima de Crescimento:

Após um período de incubação de 72h verificou-se crescimento dos microrganismos a serem identificados nas diferentes temperaturas em que os tubos de nutriente ágar foram incubados. O crescimento foi comparado ao crescimento ocorrido com o tubo incubado a 30°C, que segundo a literatura é a temperatura ótima do crescimento para microrganismos do gênero *Bacillus*. Conforme podemos observar os dados da tabela 6, as linhagens estudadas apresentaram melhor crescimento nas temperaturas de 30°C e 37°C, o que é compatível com linhagens do gênero *Bacillus*.

TABELA 6: Temperaturas de Crescimento

Temperatura (°C)	Linhagem LB-262	Linhagem LB-1993A	Linhagem LB-1993B
5°C	+	+	+
20°C	++	++	++
30°C	+++	+++	+++
37°C	+++	+++	+++
45°C	++	++	++
55°C	+	+	+
60°C	+	+	+

Legenda: - não houve crescimento
+ crescimento muito fraco
++ crescimento fraco
+++ crescimento bom

4.1.2.2 Requerimento de Oxigênio:

Este teste teve por objetivo avaliar a necessidade das linhagens a ser identificadas quanto a necessidade de O₂ em seu metabolismo. Conforme podemos observar os resultados da tabela 7, houve crescimento apenas na superfície do tubo para as três linhagens estudadas, mostrando que o requerimento de oxigênio é totalmente necessário para o crescimento de ambas as linhagens, sendo elas portanto aeróbias estritas.

TABELA 7: Requerimento de Oxigênio

LINHAGEM	Linhagem LB-262	Linhagem LB-1993A	Linhagem LB-1993B
Crescimento no tubo	somente na superfície	somente na superfície	somente na superfície
Requerimento de O₂	aeróbio estrito	aeóbico estrito	aeóbico estrito

4.1.2.3 Teste de Osmotolerância

Este teste teve por objetivo avaliar a capacidade das linhagens estudadas em crescer em meio de cultura contendo diversas concentrações de NaCl. Neste caso, a turvação do meio caldo nutriente representa o crescimento do microrganismo no meio. Após 72h de incubação a 30°C, observou-se em relação a um tubo de caldo nutriente sem inóculo, o desenvolvimento da mudança da turvação do meio. Conforme podemos observar os dados da tabelas 8, as linhagens LB-262 e LB-1993A foram capazes de crescer em meio com até 7% de NaCl. Já a linhagem LB-1993B não apresentou crescimento no meio caldo nutriente contendo 7% de NaCl, sendo tolerante apenas em meio de culturas com até 5% de NaCl. Já a concentração de 10% inibiu o crescimento de ambas as linhagens estudadas.

TABELA 8: Teste de Osmotolerância : requerimento de NaCl

Concentração de NaCl	Linhagem LB-262	Linhagem LB-1993A	Linhagem LB-1993B
0%	+	+	+
2%	+	+	+
5%	+	+	+
7%	+	+	-
10%	-	-	-

4.1.3 Características Bioquímicas

Estes testes tiveram o objetivo de caracterizar a capacidade dos microrganismos a serem identificados em metabolizar certos tipos de compostos, como o amido, figuras 10,11 e 12 e a caseína, figura 13, através da produção de certos tipos de enzimas. Conforme podemos observar os dados da tabela 9, as três linhagens apresentaram características semelhantes em relação as características bioquímicas, diferindo apenas no teste de redução de nitrato, onde a linhagem LB-262 apresentou resultado duvidoso, a linhagem LB-1993A negativo e a linhagem LB-1993B positivo. Segundo com Sneath *et alii* (1984) em Bergey's Manual de Bacteriologia Sistemática, a maioria das linhagens do gênero *Bacillus* tem o teste de redução positiva.

TABELA 9: Características Bioquímicas

Teste	Linhagem LB-262	Linhagem LB-1993A	Linhagem LB-1993B
Hidrólise do Amido	+	+	+
Hidrólise da Caseína	+	+	+
Catalase	+	+	+
Hidrólise da gelatina	+	+	+
Oxidase	-	-	-
Redução do nitrato	-/+	-	+
ONPG	-	-	-
Desaminação da fenilalanina	-	-	-
Tirosina	-	-	-
Prova do indol	-	-	-
Utilização do citrato	-	-	-
Prova do 'VP'	+	+	+
arginina desidrolase (ADH)	-	-	-
lisina descarboxilase (LDC)	-	-	-
ornitina descarboxilase (ODC)	-	-	-
Urease	-	-	-

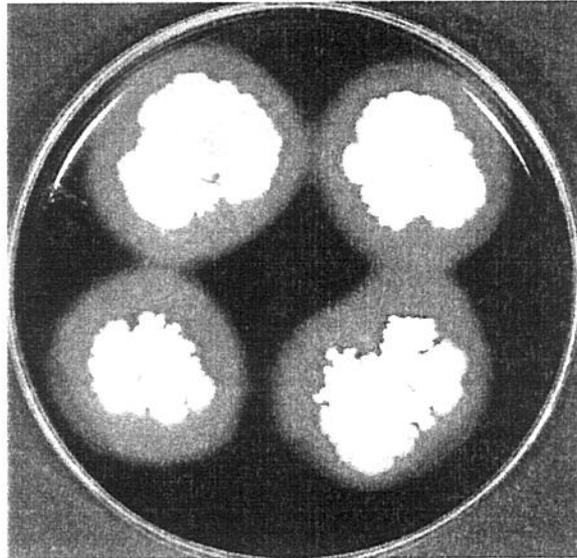


FIGURA 10: Linhagem LB-262 após 72h de incubação a 30°C em placas de ágar amido, onde as zonas claras ao redor das colônias indica que houve hidrólise do amido.

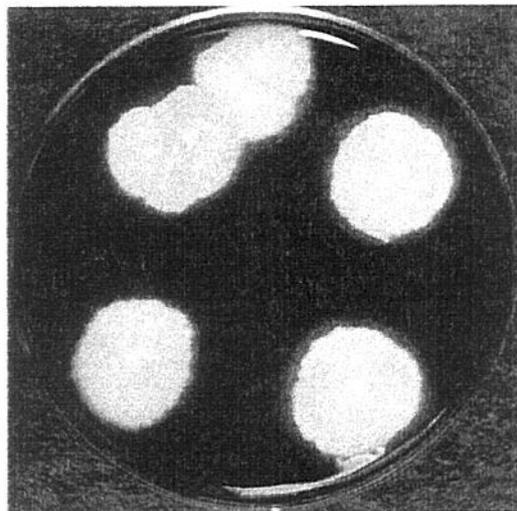


FIGURA 11: Linhagem LB-1993A após 72h de incubação a 30°C em placas de ágar amido, onde a as zonas claras ao redor das colônias indicam que houve hidrólise do amido.

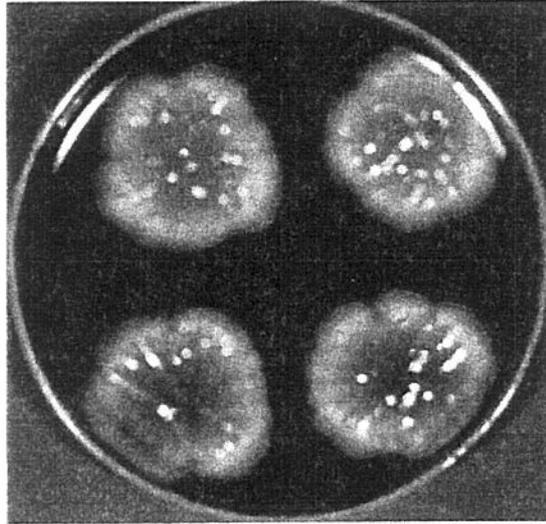


FIGURA 12: Linhagem LB-1993B após 72h de incubação a 30°C em placas de ágar amido, onde as zonas claras ao redor das colônias indica que houve hidrólise.

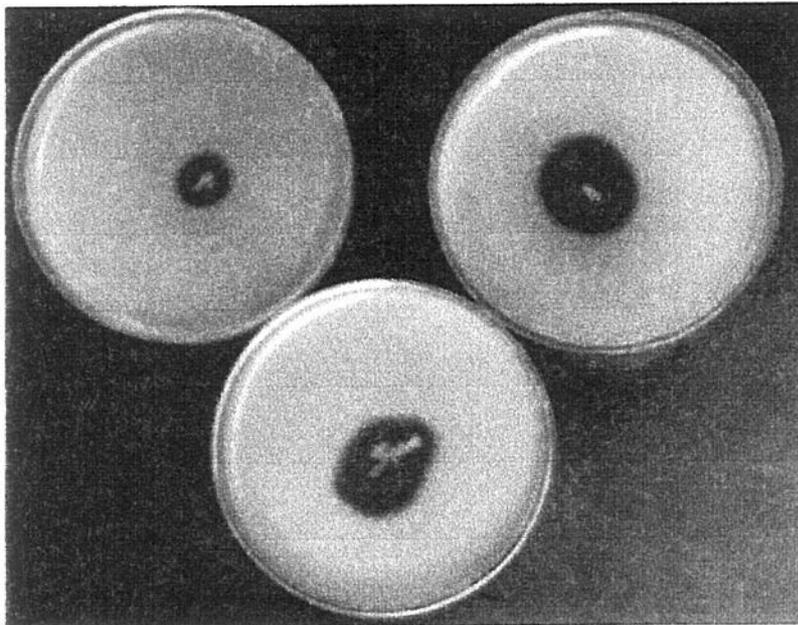


Figura 13: Linhagens LB-262, LB-1993A e LB-1993B, após 72h de incubação a 30°C em placas de ágar leite, onde as zonas claras ao redor das colônias indica que houve hidrólise da caseína

4.1.3.15 Produção de ácidos a partir de carboidratos - kit API 50CHB

A mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo indica a mudança de pH, e a conseqüente produção de ácido por parte do microrganismo após a utilização do carboidrato. Alguns testes no entanto tiveram o desenvolvimento de uma coloração intermediária, significando uma produção fraca de ácido. Outros tiveram o desenvolvimento de uma coloração vinho ao invés de amarelo, o que indica reação alcalina ao invés de ácida, porém o resultado do teste é considerado negativo. Estes testes foram realizados através do kit API-50CHB, cujas cúpulas contendo os carboidratos foram inoculadas com as linhagens a serem identificadas, e a leitura dos resultados foi realizada após 24 e 48h, onde avaliou-se a mudança de coloração do meio de vermelho para amarelo, conforme podemos observar na tabela 10 e nas figuras 14,15 e 16.

TABELA 10: Produção de ácidos a partir de carboidratos - kit API 50CHB

Carboidrato/Linhagem	LB-262	LB-1993A	LB-1993B
(0) controle	-	-	-
(1) glicerol	+	+	+
(2) eritritol	-	-	-
(3) D-arabinose	-	-	-
(4) L-arabinose	+	+	+
(5) ribose	+	+	+
(6) D-xilose	+	+	+
(7) L-xilose	-	-	-
(8) adonitol	-	-	-
(9) β -metil-xilosídeo	-	-	-
(10) galactose	+	+	+
(11) D-glicose	+	+	+
(12) D-frutose	+	+	+
(13) D-manose	-	+	+
(14) L-sorbose	-	-	-
(15) ramnose	-	-	-
(16) dulcitol	-	-	-
(17) inositol	+	+	+
(18) manitol	+	+	+
(19) sorbitol	+	+	+
(20) α -m-D-manosídeo	-	-	-
(21) α -m-D-glucosídeo	+	+	+
(22) N-acetil-glucosamina	-	-	-
(23) amidalina	+	+	+
(24) arbutina	+	+	+
(25) esculina	+	+	+
(26) salicina	+	+	+
(27) celobiose	+	+	+
(28) maltose	+	+	+
(29) lactose	+	+	+
(30) melibiose	+	+	+
(31) sacarose	+	+	+
(32) trealose	+	+	+
(33) inulina	-	-	-
(34) melezitose	-	-	-
(35) D-rafinose	+	+	+
(36) amido	+	-	+
(37) Glicogênio	+	+	+
(38) xilitol	+	+	+
(39) β -gentibiose	-	-	-
(40) D-turanose	+	+	+
(41) D-xilose	-	-	-
(42) D-tagatose	-	-	-

Carboidrato/Linhagem	LB-262	LB-1993A	LB-1993B
(43) D-fucose	-	-	-
(44) L-fucose	-	-	-
(45) D-arabitol	-	-	-
(46) L-arabitol	-	-	-
(47) gluconato	-/coloração rosa	-/coloração rosa	-/coloração rosa
(48) 2-ceto-gluconato	-	-	-
(49) 5-ceto-gluconato	-	-	-

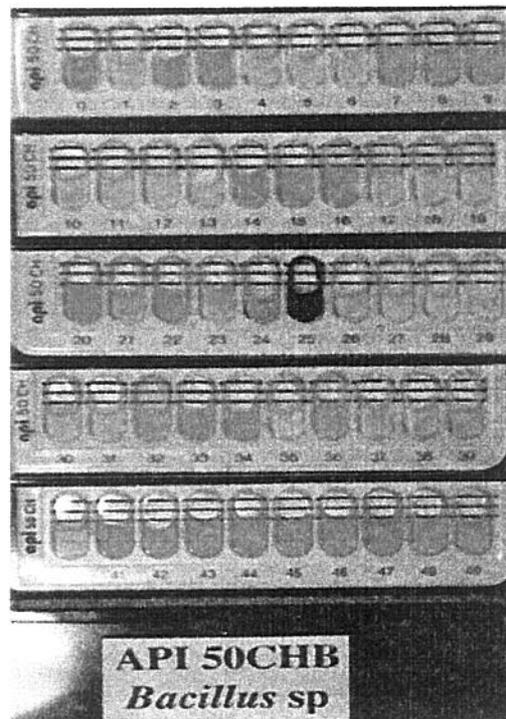


FIGURA 14: Produção de ácidos a partir de carboidratos (Kit de Identificação API 50CHB) pela linhagem do gênero *Bacillus* - Linhagem LB-262

*(ver tabela 7 como legenda para esta figura, onde vermelho significa resultado (-) e amarelo (+).

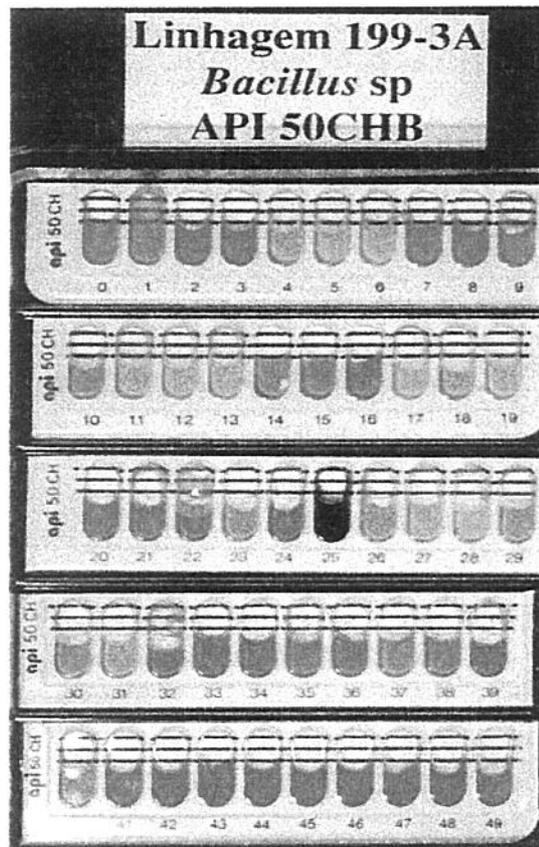


FIGURA 15: Produção de ácidos a partir de carboidratos (Kit de Identificação API 50CHB) pela linhagem do gênero *Bacillus* - LB-199 3A
*(ver tabela 7 como legenda para esta figura, onde vermelho significa resultado (-) e amarelo (+)).

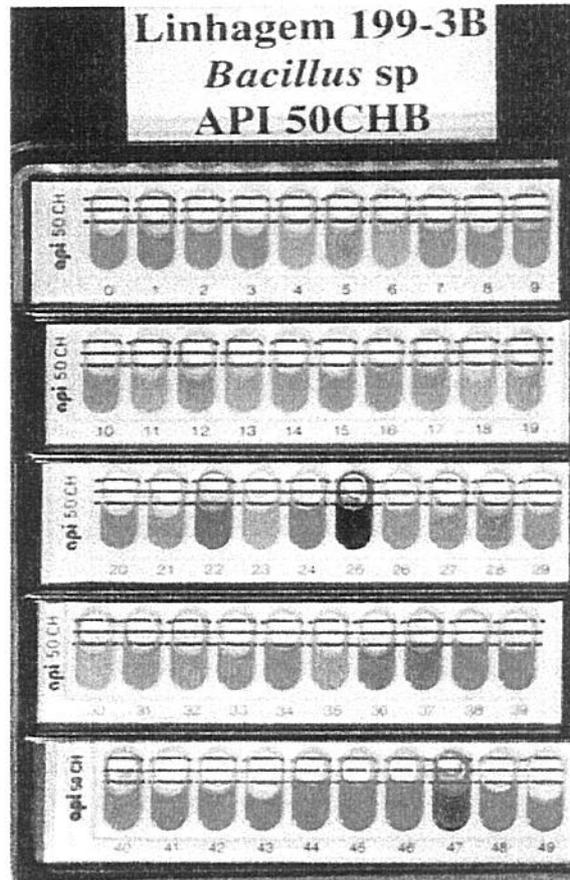


FIGURA 16: Produção de ácidos a partir de carboidratos (Kit de Identificação API 50CHB) pela linhagem do gênero *Bacillus* - LB-199 3B *(ver tabela 7 como legenda para esta figura, onde vermelho significa resultado (-) e amarelo (+)).

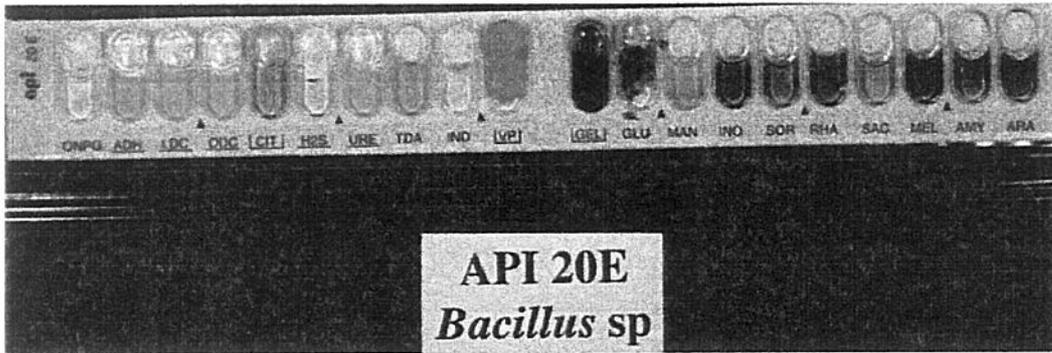


FIGURA 17: Kit de Identificação API 20E, complementar para o gênero *Bacillus* - Linhagem LB-262



FIGURA 18: Kit de Identificação API 20E, complementar para o gênero *Bacillus* - Linhagem LB-199 3A

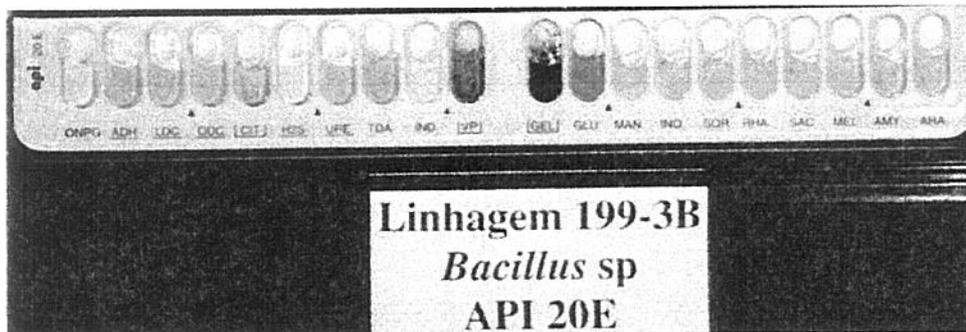


FIGURA 19: Kit de Identificação API 20E, complementar para o gênero *Bacillus* - Linhagem LB-199 3B

TABELA 11: Determinação da espécie para as linhagens do gênero *Bacillus*, LB262, LB-199-3A e LB-199-3B

Características	LB-262	LB-1993A	LB-1993B	<i>Bacillus subtilis</i>
diâmetro das células >1.0µm	-	-	-	-
esporo redondo	-	-	-	-
esporângio entumescido	-	-	-	-
cristais	-	-	-	-
catalase	+	+	+	+
ácido/glicose	+	+	+	+
ácido/L-arabinose	+	+	+	+
ácido/D-xilose	+	+	+	+
ácido/D-manitol	+	+	+	+
Hidrólise caseína	+	+	+	+
Hidrólise gelat.	+	+	+	+
Hidrólise amido	+	-	+	+
citrato	-	-	-	+
tirosina	-	-	-	-
fenilalanina	-	-	-	-
redução nitrato	+	-	+	+
indol	-	-	-	-
NaCl requerido	-	-	-	-
cresci/o pH 6.8	+	+	+	+
cresci/o pH 5.7	+	+	+	+
cresci/o 0%NaCl	+	+	+	+
cresci/o 2%NaCl	+	+	+	+
cresci/o 5%NaCl	+	+	+	+
cresci/o 7%NaCl	+	+	-	+
cresci/o 10%NaCl	-	-	-	ND
cresci/o 5°C				-
cresci/o 20°C				d
cresci/o 30°C	+	+	+	+
cresci/o 37°C		+	+	+
cresci/o 45°C				d
cresci/o 55°C				-
cresci/o 60°C				-
cresci/o lisozima				d
autólitico	-	-	-	-

FONTES: Sneath *et alii* (1984), em Bergey's Manual of Systematic Bacteriology

4.2 Estudo do Processo Fermentativo

4.2.1 Efeito do biosurfactante produzido pelas linhagens de *B. subtilis* sobre a tensão superficial do meio

As três linhagens estudadas como produtoras de biosurfactante foram testadas quanto a capacidade de abaixar a tensão superficial do meio de fermentação composto de com o item 3.2.2.1 As linhagens foram incubadas a 45°C, 150rpm por 48h.

Foi medida a tensão superficial do meio de cultura sem inóculo, que teve um valor médio de 46mN/m, que foi comparada com o sobrenadante do meio centrifugado após fermentação. Conforme podemos observar os valores da tabela 12, a tensão superficial do meio de cultura após fermentação obtidos para cada uma das linhagens produtora foi em torno de 26mN/m, oque é considerado um valor extremamente satisfatório e o qual confere com a literatura cujo valor de tensão superficial do meio de cultura fermentado por linhagens de *B. subtilis* produtoras de biosurfactante geram em torno de 25-27mN/m. (BANAT *et alii*, 2000)

TABELA 12: Produção de Biosurfactante

Tensão Superficial (mN/m)	Padrão (meio isento de inóculo)	LB-262	LB-199 3A	LB-199 3B
meio centrifugado	46,5	26,86	30,16	25,55

4.2.1.1. Influência da Temperatura na produção de biosurfactante

De acordo com as figuras 20, 21 e 22, referentes às linhagens produtoras de biosurfactante, observamos que a temperatura de 30°C proporcionou uma maior produção de biosurfactante e uma maior massa celular pelas linhagens de *B. subtilis* estudadas. A tensão superficial se manteve em torno de 26mN/m para todas temperaturas, no caso das linhagens LB-262 e LB-199-3B, conforme observamos as figuras 20 e 21. Já a linhagem LB-199-3A, conforme observamos a figura 22, apresentou um aumento mais significativo nos valores de tensão superficial para as temperaturas de 40 °C e 45 °C, evidenciando uma diminuição de produção do biosurfactante em temperaturas maiores. Ohno *et alii* (1995), estudou a influencia da temperatura na produção de surfactina e iturina em fermentação sólida pela linhagem de *B. subtilis* RB14. Os autores concluíram que a temperatura de 37 °C foi ótima para a produção de surfactina.

Makkar & Cameotra (1997a) descreveram ser possível a produção de biosurfactante por uma linhagem de *B. subtilis* cujo cultivo foi realizado a 45 °C .

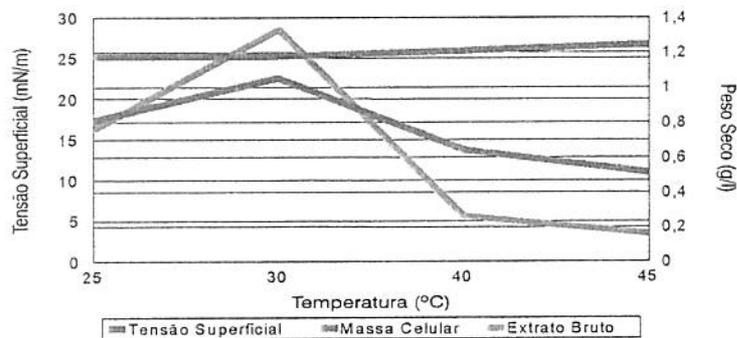


FIGURA 20: Influência da Temperatura na Produção de Biosurfactante pela linhagem *B. subtilis* LB-262

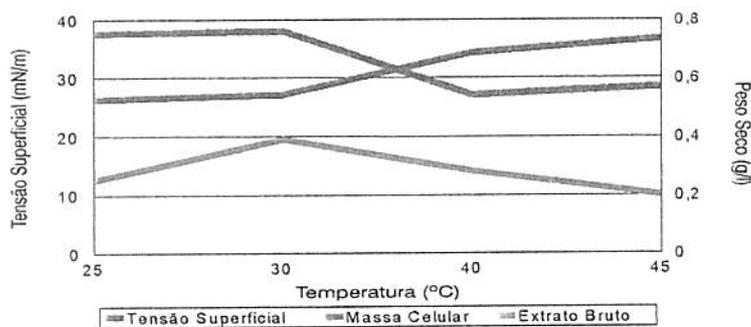


FIGURA 21: Influência da Temperatura na Produção de Biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-199 3A

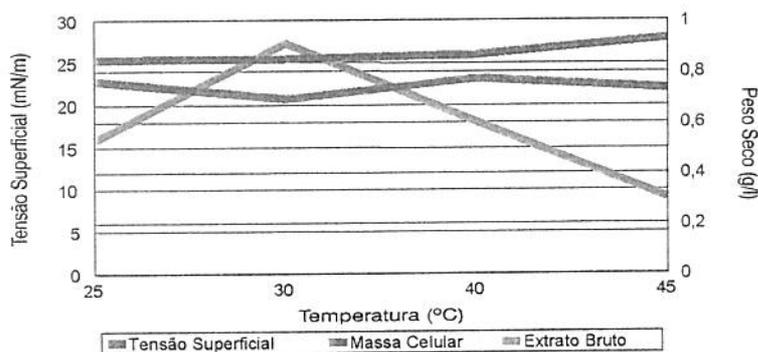


FIGURA 22: Influência da Temperatura na Produção de Biosurfactante pela linhagem *B. subtilis* LB-199 3B

4.2.1.2 Influência do pH na produção de biosurfactante

A influência do pH inicial do meio de cultura sobre a produção de biosurfactante pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B foi analisada, quanto à medida da tensão superficial, a produção de massa celular e à produção de extrato bruto de biosurfactante.

De acordo com as figuras 23,24 e 25, observou-se que não houve crescimento das três linhagens em pHs inferiores a 5,0. Além disso, em pH superior a 6,5 houve uma diminuição significativa na produção de extrato bruto. A tensão superficial não sofreu alteração entre os pHs 6,0 a 8,0.

Observou-se ainda, que o pH 6,5 ofereceu condições mais adequadas de crescimento celular e produção de biosurfactante para as linhagens em estudo .

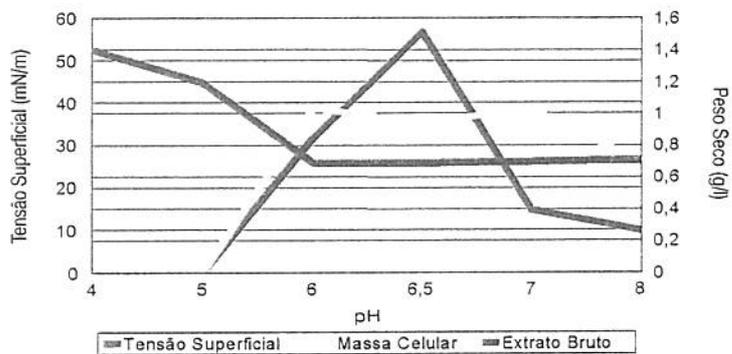


FIGURA 23: Influência do pH na Produção de Biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-262

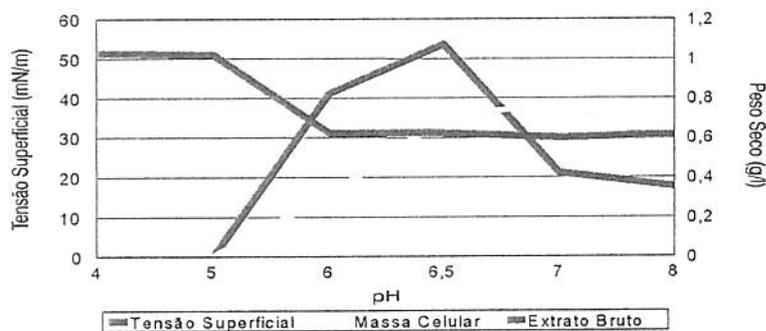


FIGURA 24: Influência do pH na Produção de Biosurfactante pela linhagem *B. subtilis* LB-199 3A

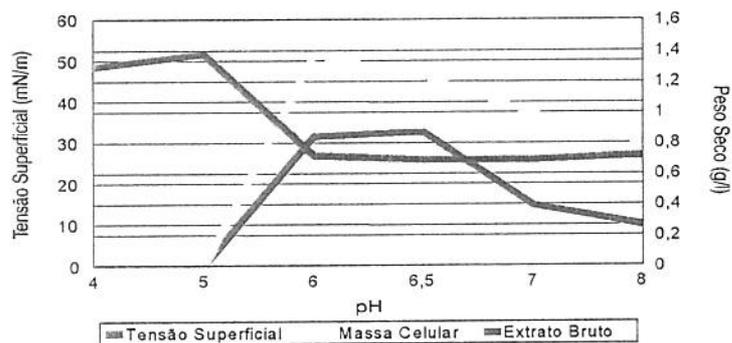


FIGURA 25: Influência do pH na Produção de Biosurfactante pela linhagem *B. subtilis* LB-199 3B

4.2.1.3. Influência da concentração de NaCl na produção de biosurfactante

De acordo com as figuras 26, 27 e 28, observamos que a adição de 3% de NaCl gerou um pequeno aumento na produção de biosurfactante para as linhagens LB-262 e LB-1993A. Já a linhagem LB-1993B apresentou uma maior produção de biosurfactante em meio isento de NaCl. Makkar & Cameotra (1997a) obtiveram uma máxima produção de biosurfactante por uma linhagem de *B. subtilis* quando esta foi cultivada em meio de cultura contendo 5% de NaCl. Jenneman *et alii* (1982) estudaram a produção de biosurfactante por uma linhagem de *B. licheniformis* JF-2, quando esta foi cultivada também em 5% de NaCl. No caso das três linhagens estudadas, LB-262, LB-199 3A e LB-199 3B, a adição de 5% de NaCl apresentaram resultados semelhantes aos obtidos quando foram adicionados apenas 3% de NaCl.

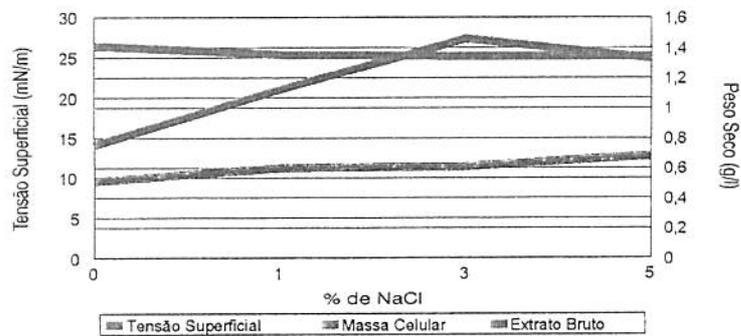


FIGURA 26: Influência da %NaCl na Produção de Biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-262

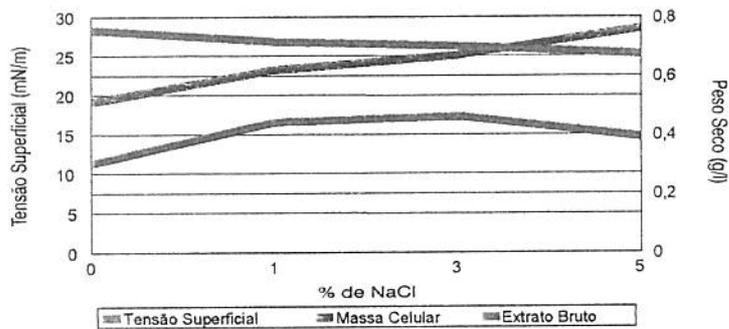


FIGURA 27: Influência da %NaCl na Produção de Biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-199 3A

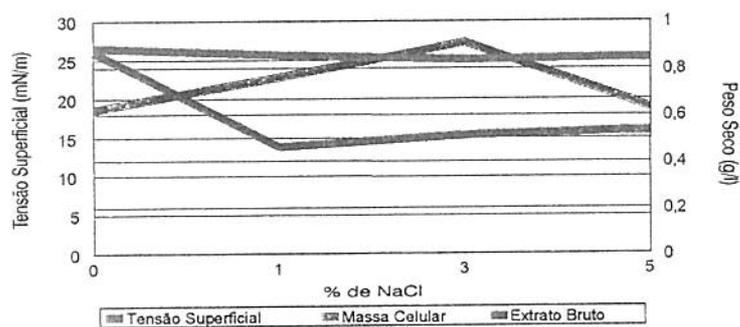


FIGURA 28: Influência da %NaCl na Produção de Biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-199 3B

4.2.1.4 Influência da fonte de nitrogênio simples na produção de biosurfactante

De acordo com os resultados obtido nas figuras 29 a 31, observamos que não houve crescimento celular, e conseqüentemente não ocorreu produção de biosurfactante quando adicionamos apenas uma fonte de nitrogênio inorgânica ao meio de cultura. Já fontes de nitrogênio orgânicas, como peptona ou extrato de levedura, propiciaram resultados bastante satisfatório. Resultados semelhantes com a peptona e o extrato de levedura foram obtidos pela linhagem LB-262 em relação a produção de biosurfactante. As linhagens LB-1993A e LB-1993B tiveram uma maior produção de biosurfactante quando utilizou-se extrato de levedura como fonte de carbono. No entanto, Santos *et alii* (1984) obtiveram baixas quantidades de biosurfactante por uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, quando se utilizou extrato de levedura como fonte de nitrogênio, onde a adição de nitrato provocou uma máxima produção.

Makkar & Cameotra (1997a) testaram diferentes fontes de nitrogênio para a produção de biosurfactante por uma linhagem termofílica de *B. subtilis*. As fontes testadas separadamente na concentração de 0,3% foram: uréia, peptona, extrato de levedura, extrato de carne, triptona, meio isento de fonte de nitrogênio, nitrato de potássio, nitrato de amônio e sulfato de amônio, onde uma maior produção de biosurfactante, 1,012g/l foi obtida quando se usou uréia como fonte de nitrogênio, apesar dos íons nitrato, no caso nitrato de sódio e nitrato de potássio provocarem um maior crescimento celular.

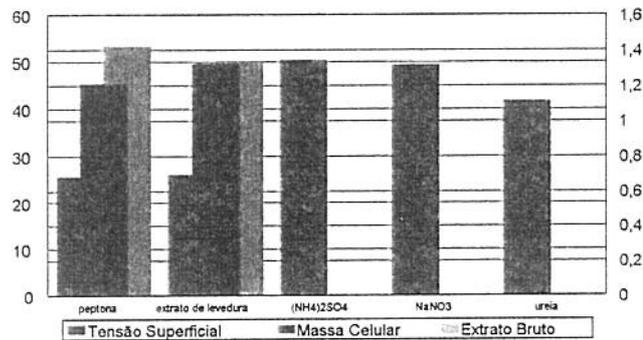


FIGURA 29: Influência da Fonte de Nitrogênio na Produção de Biosurfactante pela linhagem LB-262

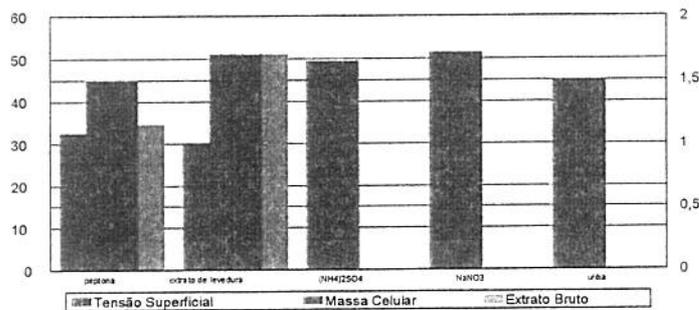


FIGURA 30: Influência da Fonte de Nitrogênio na Produção de Biosurfactante pela linhagem LB-199-3A

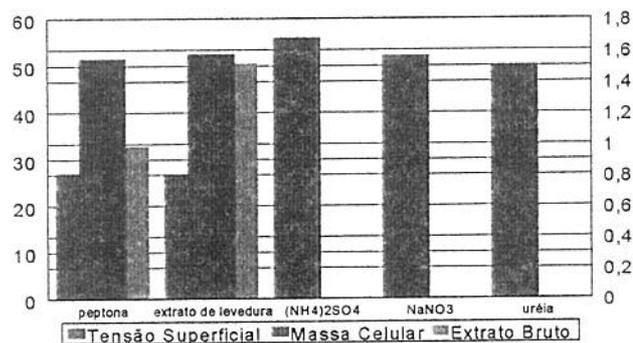


FIGURA 31: Influência da Fonte de Nitrogênio na Produção de Biosurfactante pela linhagem 199-3B

4.2.1.5 Influência de combinações de fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas na produção de biosurfactante

Neste experimento, adicionou-se ao meio de cultura uma fonte de nitrogênio inorgânica e uma fonte de nitrogênio orgânica, e observou-se a influência destas sobre o crescimento celular e a produção de biosurfactante pelas linhagens estudadas. As fontes, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NaNO_3 e extrato de levedura e peptona, foram testadas na concentração de 0,1%, realizando-se combinações entre elas. De acordo com os resultados obtidos, não houve crescimento celular, quando adicionamos apenas uma fonte de nitrogênio inorgânica. Já quando se adicionou peptona ou extrato de levedura, obtivemos um resultado bastante satisfatório. Conforme podemos observar os valores das tabelas 13 a 15, uma maior produção de biosurfactante pela linhagem LB-262, ocorreu quando todas as fontes testadas foram adicionadas ao meio de cultura. Já para linhagem LB-1993A, uma maior produção de biosurfactante ocorreu quando a combinação sulfato de amônia e extrato de levedura foram utilizados. Quanto à linhagem LB-1993B, uma maior produção de biosurfactante ocorreu quando sulfato de amônia e nitrato de sódio foram utilizados como fontes de nitrogênio. Makkar & Cameotra (1997a) obtiveram uma produção máxima de biosurfactante por uma linhagem de *B. subtilis*, quando se utilizou uréia como fonte de nitrogênio.

TABELA 13: Produção de biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-262 em função da fonte de nitrogênio

ENSAIO	Fonte de Nitrogênio	Tensão Superficial (mN/m)	Massa celular (g/l)	Biosurfactante (g/l)
1	-----	46,31	0,00	0
2	combinadas	25,9	2,01	4,74
3	sulfato	50,33	0,00	0
4	nitrato	49,47	0,00	0
5	sulf. +nitrato	26,22	1,43	4,56
6	sulf+ext. lev.	26,93	1,1	1,94
7	sulf + peptona	25,47	1,79	2,32
8	nitr+ext.lev.	26,63	1,29	1,17
9	nit. + peptona	26,45	1,42	1,42
10	peptona+ext.	26,51	0,998	1,71
11	extrato lev.	25,92	0,64	1,35
12	peptona	25,56	0,56	1,42
13	sulf+ext. lev.+pept.	25,57	2,48	1,21
14	sulf + ext. lev. +nit.	25,62	2,52	2,08
15	nitr+ext. lev.+pept.	26,89	0,89	3,67
16	pept.+sulf +nit.	26,84	1,03	4,07

TABELA 14: Produção de biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993A em função da fonte de nitrogênio

ENSAIO	Fonte de Nitrogênio	Tensão Superficial (mN/m)	Massa celular (g/l)	Biosurfactante (g/l)
1	-----	33,19	0	0
2	combinadas	27,58	1,95	2,63
3	sulfato	38,88	0	0
4	nitrato	39,45	0	0
5	sulf. +nitrato	28,29	1,04	3,36
6	sulf+ext. lev.	28,88	1,72	3,99
7	sulf + peptona	29,04	1,15	2,86
8	nitr+ext.lev.	31,18	1,86	1,63
9	nit. + peptona	31,76	1,57	2,49
10	peptona+ext.	32,05	1,63	3,16
11	extrato lev.	32,61	1,32	2,41
12	peptona	36,78	1,31	2,86
13	sulf+ext. lev.+pept.	27,81	1,63	3,43
14	sulf + ext. lev. +nit.	28,94	1,63	3,2
15	nitr+ext. lev.+pept.	31,83	0,93	2,27
16	pept.+sulf +nit.	29,52	1,1	2,43

TABELA 15: Produção de biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993B em função da fonte de nitrogênio

ENSAIO	Fonte de Nitrogênio	Tensão Superficial (mN/m)	Massa celular (g/l)	Biosurfactante (g/l)
1	-----	43,70	0	0
2	combinadas	26,62	1,55	3,18
3	sulfato	26,04	0	0
4	nitrito	26,75	0	0
5	sulf. +nitrito	25,72	2,14	4,61
6	sulf+ext. lev.	26,25	1,05	3,73
7	sulf + peptona	26,16	1,52	2,85
8	nitr+ext.lev.	26,57	1,82	1,8
9	nit. + peptona	26,06	1,55	1,27
10	peptona+ext.	27,24	0,7	2,35
11	extrato lev.	27,55	0,52	1,98
12	peptona	27,81	0,41	2,34
13	sulf+ext. lev.+pept.	26,78	2,07	2,22
14	sulf + ext. lev. +nit.	26,29	1,45	2,73
15	nitr+ext. lev.+pept.	26,31	0,99	2,95
16	pept.+sulf +nit.	26,39	2,17	2,07

4.2.1.6 Influência da suplementação do meio basal com elementos traços (sais minerais) na produção de biosurfactantes em meio basal

Este experimento teve o objetivo de observar os efeitos da ausência e da suplementação do meio basal conforme item 3.2.2.1, com sais minerais como o $MnSO_4$, $FeSO_4$ (sulfato ferroso) e $Fe_2(SO_4)_3$ (sulfato férrico), na produção de biosurfactante pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B. Para melhor visualizarmos a influência destes minerais sobre a produção de biosurfactantes, as cepas foram inoculadas em meio de cultura isento de minerais, em meio basal padronizado com 1% de minerais e em meio basal suplementado

com três diferentes concentrações de minerais 3,33µl/mL, 13,33µl/mL e 66,7µl/mL.

De acordo com os resultados das tabelas 16 a 18, podemos observar que a ausência de minerais não inibiu a produção de biosurfactante. Nessas condições, os valores de tensão superficial para as linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B, mantiveram-se próximos ao observados no meio basal contendo 1% de soluções de minerais. Os resultados obtidos para as três linhagens produtoras quando inoculadas em meio basal sem 1% de minerais, no meio basal padrão, ou nos meios suplementados com 3,33µl/mL e 13,33µl/mL de MnSO₄, sulfato férrico ou sulfato ferroso foram semelhantes na produção de biosurfactante, no crescimento celular e nos valores de tensão superficial obtidos, no entanto a adição de 66,7µl/mL de sulfato ferroso e sulfato férrico provocaram o aumento da tensão superficial do meio de cultura, o que pode ser interpretado como uma menor produção de biosurfactante.

Cooper *et alii* (1981) estudaram a influência do aumento de produção de biosurfactante pela linhagem *B. subtilis* ATCC 21332, onde a adição de diversos tipos de minerais influenciaram na produção de biosurfactante por parte da linhagem estudada, onde os íons MnSO₄, FeSO₄ e Fe₂(SO₄)₃ causaram um aumento de produção de biosurfactante, e um conseqüente aumento dos valores de CMC⁻¹. Por outro lado, a adição de Cu SO₄, Ni SO₄, Co SO₄ e Al₂(SO₄)₃ inibiram totalmente o crescimento da linhagem de *B. subtilis* estudada.

Sheppard & Cooper (1991) estudaram o efeito da adição de manganês sobre o crescimento celular e a produção de biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* ATCC 21332, e sua relação com íons ferro. O aumento da adição de íons manganês fez com que o requerimento de nitrogênio diminuísse, resultando num crescimento celular sob condições limitantes de ferro.

TABELA 16: Produção de biosurfactantes pela linhagem de *B. subtilis* LB-262 em função da suplementação do meio com elementos traços

Mineral suplementado	Tensão superficial (mN/m)			Massa celular (g/L)			Extrato bruto (g/L)		
SEM MINERAL*	26,45			2,61			1,98		
Basal s/ suplemento	26,18			1,93			2,42		
Qtide suplementada em µl/ml de meio	3,33	13,33	66,7	3,33	13,33	66,7	3,33	13,33	66,7
MnSO ₄	26,43	26,02	26,30	2,18	2,11	2,11	3,91	3,75	2,05
FeSO ₄ ferroso	26,44	26,14	29,73	1,77	2,06	3,92	2,90	3,68	3,25
(Fe) ₂ (SO ₄) ₃ férrico	26,34	26,26	40,52	2,09	2,69	3,90	2,60	3,09	1,97

TABELA 17: Produção de biosurfactantes pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993A em função da suplementação do meio com elementos traços

Mineral suplementado	Tensão superficial (mN/m)			Massa celular (g/L)			Extrato bruto (g/L)		
SEM MINERAL*	28,88			1,4			1,91		
Basal s/ suplemento	29,86			1,96			1,99		
Qtide suplementada em µl/ml de meio	3,33	13,33	66,7	3,33	13,33	66,7	3,33	13,33	66,7
MnSO ₄	30,84	30,19	31,28	2,39	2,22	2,43	2,61	2,69	2,26
FERROSO	30,55	29,11	30,97	2,06	2,19	2,48	1,9	3,02	1,53
FÉRRICO	31,15	29,37	36,52	2,19	2,35	3,9	2,5	2,11	1,64

TABELA 18: Produção de biosurfactantes pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993 B em função da suplementação do meio com elementos traços

Mineral suplementado	Tensão superficial (mN/m)			Massa celular (g/L)			Extrato bruto (g/L)		
SEM MINERAL*	27,25			1,38			1,57		
Basal s/ suplemento	27,6			2,13			1,89		
Qtide suplementada em µl/ml de meio	3,33	13,33	66,7	3,33	13,33	66,7	3,33	13,33	66,7
MnSO ₄	27,11	29,37	30,78	2,62	2,75	1,84	1,84	2,12	1,76
FERROSO	27,47	27,68	29,96	2,57	2,89	1,93	1,93	2,52	2,29
FÉRRICO	28,63	28,02	41,28	2,67	4,41	1,81	1,81	2,36	2,43

4.2.1.7 Influência da fonte de carbono na produção de biosurfactante

A influência de várias fontes de carbono sobre a produção de biosurfactantes foram testadas, tomando-se glicose como referência. Podemos observar pelos dados das tabelas 19 a 21, que houve crescimento celular para as linhagens estudadas, bem como produção de biosurfactante, em todas fontes de carbono testadas. Houve entretanto variação na quantidade de biomassa produzida e de extrato bruto de biosurfactante.

A lactose e a galactose propiciaram pequeno crescimento celular e baixa produção de biosurfactante em relação a glicose. A maltose, o amido e o glicerol se mostraram excelentes fontes de carbono, ocorrendo inclusive um pequeno aumento na produção de biosurfactante.

Quanto ao abaixamento de tensão superficial, o meio basal antes da fermentação, tinha um valor médio de tensão superficial de 45-50mN/m, sofrendo um abaixamento de tensão superficial para todos os valores encontrados com as fontes de carbono testadas, onde a média de valores de tensão superficial foram de 25,5mN/m para a linhagem LB-262, 29,00mN/m para LB-1993A e 27mN/m para a linhagem LB-1993B. Makkar & Cameotra (1997b) estudaram a produção de biosurfactante por duas linhagens de *B.subtilis* (MTCC 2423 e MTCC 1427) utilizando melão de cana como fonte de carbono e cuja produção de biosurfactante foi de 1g/L e 0,2g/L respectivamente.

Sheppard & Mulligan (1987) utilizaram turfa hidrolisada como fonte de carbono para a produção de biosurfactante por uma linhagem de *B.subtilis*, cuja hidrólise do material deu origem a seis açúcares (glicose, arabinose, ribose, xilose, galactose e manose), sendo a glicose 46% do total. A linhagem estudada apresentou capacidade de metabolizar todos açúcares presentes no hidrolisado, bem como de produzir biosurfactante. Em alguns casos adicionou-se 1% de glicose, o que provocou um aumento na biomassa, cuja produção foi de 1,11g/l.

Cooper & Goldenberg (1987) utilizaram um meio de cultura contendo 1% de sacarose como fonte de carbono para a produção de biosurfactante por duas espécies de *Bacillus*, *Bacillus sp.* e *Bacillus cereus*.

Tsuge *et alii* (1996) estudaram a produção de surfactina e plipastinaB1 por uma linhagem de *Bacillus subtilis* utilizando 10% de sacarose como fonte de carbono.

TABELA 19: Influência da fonte de carbono na produção de biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-262

FONTE DE CARBONO	Tensão Superficial (mN/m)	Massa Celular (g/l)	Biosurfactante (g/l)
Glicose	25,65	0,98	2,35
Sacarose	25,49	1,29	1,62
Maltose	25,54	1,19	2,75
Lactose	25,77	0,42	0,79
Galactose	26,64	0,23	0,75
Frutose	25,99	0,64	0,94
Glicerol	25,78	1,3	2,6
Amido	25,53	1,36	3,03

TABELA 20: Influência da fonte de carbono na produção de biosurfactante para a linhagem de *B. subtilis* LB-1993A

FONTE DE CARBONO	Tensão Superficial (mN/m)	Massa Celular (g/l)	Biosurfactante (g/l)
Glicose	29,63	1,8	2,85
Sacarose	28,44	1,28	2,08
Maltose	26,53	1,13	3,92
lactose	30,07	1,59	1,51
galactose	29,36	0,33	1,33
frutose	28,54	1,15	2,00
glicerol	27,65	1,31	2,11
amido	28,1	2,3	4,22

TABELA 21: Influência da fonte de carbono na produção de biosurfactante para a linhagem de *B. subtilis* LB-1993B

FONTE DE CARBONO	Tensão Superficial (mN/m)	Massa Celular (g/l)	Biosurfactante (g/l)
glicose	25,06	1,36	2,08
sacarose	26,26	1,99	1,83
maltose	20,90	1,85	2,08
lactose	31,29	0,28	0,29
galactose	27,4	0,62	1,3
frutose	26,84	1,12	2,4
glicerol	26,24	1,18	1,5
amido.	26,52	1,84	3,04

4.2.1.8 Influência da relação C/N na produção de biosurfactante

Neste experimento a glicose foi usada como referência e sua concentração foi fixada em 3%. Apenas variou-se a quantidade de nitrogênio presente no meio foi variada conforme dados da tabela 22.

De acordo com os dados obtidos nas tabelas 23, 24 e 25, para as três linhagens estudadas, quanto maior a quantidade de nitrogênio presente no meio, maior a massa celular, porém, a quantidade de biosurfactante produzido não sofreu um aumento de produção. Os resultados portanto indicaram que uma maior quantidade de nitrogênio, portanto uma menor C/N está diretamente relacionada com o crescimento celular, mas ela chega a reduzir a metade a produção de biosurfactante, nos levando a acreditar que a produção de biosurfactante é induzida sob condições limitantes de nitrogênio.

Neste experimento, relações C/N de 20, 30 e 40 propiciaram a obtenção de resultados similares em relação à produção, sendo que a relação C/N de 40, é a relação de referência utilizada no meio basal.

Sheppard & Cooper (1991) utilizaram turfa hidrolisada como fonte de carbono para a produção de biosurfactante e observaram que a relação C/N era inversamente proporcional a produção de massa celular, sendo que uma relação C/N igual a 2,2 provocou um crescimento celular de 0,46g/L e uma relação C/N de 33,3, uma massa celular de 1,11g/L.

TABELA 22: Cálculo da % de nitrogênio a ser adicionada ao meio basal, para diferentes valores de C/N, fixando a fonte de carbono em 3%

C/N	glicose 3%	(NH ₄) ₂ SO ₄ (%)	extrato lev.(%)	Ntotal(g)
1	1,2	4	4	1,2
5	1,2	0,8	0,8	0,24
10	1,2	0,4	0,4	0,12
20	1,2	0,2	0,2	0,06
30	1,2	0,15	0,15	0,04
40	1,2	0,1	0,1	0,03

TABELA 23: Influência da relação C/N na produção de biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-262

C/N	Tensão superficial (mN/m)	Massa celular (g/L)	Extrato bruto (g/L)
1	4,91	27,7	1,53
5	4,35	26,7	1,99
10	3,26	26,42	1,16
20	4,32	26,35	2,41
30	1,95	26,53	2,51
40	1,63	26,34	1,75

TABELA 24: Influência da relação C/N na produção de biosurfactante biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993A

C/N	Tensão superficial (mN/m)	Massa celular (g/L)	Extrato bruto (g/L)
1	3,66	27,1	1,69
5	3,29	28,1	1,02
10	2,87	28,49	2,07
20	2,3	29,51	3,44
30	1,94	29,65	4,03
40	1,39	29,34	2,48

TABELA 25: Influência da relação C/N na produção de biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993B

C/N	Tensão superficial (mN/m)	Massa celular (g/L)	Extrato bruto (g/L)
1	3,52	28,12	1,15
5	3,2	27,84	2,46
10	3,08	26,67	1,28
20	2,72	27,01	2,8
30	2,15	27,45	2,53
40	1,86	26,91	2,85

4.2.1.9 Estudo da adição de hidrocarbonetos e compostos insolúveis ao meio de cultura com ação indutora na produção de biosurfactantes

Neste experimento foi adicionado ao meio basal 1% de compostos insolúveis, separadamente, com a finalidade de induzir e aumentar a produção de biosurfactante. Os microrganismos foram cultivados em meio contendo uma fonte de carbono simples, no caso a glicose, para indução de crescimento e posteriormente metabolizar, uma fonte de carbono complexa, um composto insolúvel, onde este seria metabolizado através da excreção do biosurfactante no meio de cultura.

Podemos observar no entanto, através da tabela 28, que a linhagem LB-1993B produziu menor quantidade de biosurfactante quando adicionou-se alcanos ao meio de cultura. Ao contrário da linhagem LB-262, cujo dados estão na tabela 26, teve a quantidade de biosurfactante aumentada quando adicionamos hexadecano ao meio de cultura, e a linhagem LB-1993A, dados na tabela 27, teve uma boa produção quando adicionou-se 1% de petróleo ao meio de cultura. O importante deste experimento no entanto é que mesmo com uma produção de biosurfactante reduzida, os compostos insolúveis adicionados ao meio foram emulsificados durante o processo de fermentação, indicando a clara ação do biosurfactante presente no meio.

Cooper *et alii* (1981) estudaram a produção de biosurfactante por uma linhagem de *B. subtilis* adicionando-se hexadecano ao meio basal contendo glicose, e observou-se que houve um aumento na produção de massa celular, mas a produção de biosurfactante foi totalmente inibida pela presença de hexadecano.

Makkar & Cameotra (1997a) estudaram a produção de biosurfactante por uma linhagem termofílica de *B. subtilis* adicionando-se 2% de compostos insolúveis separadamente, como hexadecano, dodecano, decano, querosene e pristano, ao meio basal que continha glicose como fonte de carbono simples, e observaram que houve uma redução na produção de biosurfactante de 0,65g/L produzidos no meio basal isento de compostos insolúveis para 0,241g/L, 0,127g/L, 0,134g/L, 0,093g/L e 0,145g/L respectivamente.

TABELA 26: Influência da adição de hidrocarbonetos e compostos insolúveis na produção de biosurfactante para linhagem de *B. subtilis* LB-262

Substrato insolúvel	Tensão superficial (mN/m)	Massa celular (g/L)	Extrato bruto (g/L)
C14	26,83	0,8	1,19
C16	27,37	0,97	4,08
C18	26,45	0,913	1,57
C20	26,94	0,825	2,49
C28	26,24	0,79	1,66
petróleo	27,54	1,04	2,03
tolueno	26,65	1,34	2,55
Benzeno	26,59	0,96	2,49
squaleno	26,67	1,85	3,37

TABELA 27: Influência da adição de hidrocarbonetos e compostos insolúveis na produção de biosurfactante para linhagem de *B. subtilis* LB-1993A

Substrato insolúvel	Tensão superficial (mN/m)	Massa celular (g/L)	Extrato bruto (g/L)
C14	31,46	1,24	1,52
C16	31,82	1,08	2,62
C18	33,28	2,73	2,4
C20	28,93	2,54	2,92
C28	29,86	2,38	1,3
Petróleo	30,06	0,81	3,03
tolueno	26,55	1,13	2,74
benzeno	29,01	1,24	2,9
Squaleno	32,96	0,83	1,76

TABELA 28: Influência da adição de hidrocarbonetos e compostos insolúveis na produção de biosurfactante para linhagem de *B. subtilis* LB-1993B

Substrato insolúvel	Tensão superficial (mN/m)	Massa celular (g/L)	Extrato bruto (g/L)
C14	28,27	1,37	0,67
C16	27,47	1,42	0,94
C18	28,06	1,3	0,57
C20	27,47	1,53	0,76
C28	26,91	1,46	0,63
Petróleo	33,05	1,66	1,98
Tolueno	26,31	1,56	2,54
Benzeno	26,61	1,71	2,66
squaleno	26,66	1,58	0,69

4.2.1.10 Influência do Tempo de Fermentação na Produção de Biosurfactante

Em frascos de Erlenmeyer contendo 100 mL do meio basal foram inoculadas as linhagens LB-262, LB-1993A e LB-1993B, separadamente, seguindo-se incubação à 30°C por 120h. Alíquotas de 10mL foram retiradas, assepticamente, em intervalos regulares. De acordo com as figuras 32 a 34, podemos observar que a produção de biosurfactante iniciou-se após 12h de fermentação, o que refletiu no abaixamento da tensão neste período com a produção máxima de biosurfactante ocorrendo entre 48 e 72h, não aumentando nem diminuindo após este período. Quanto ao crescimento celular, este se estabilizou entre 48h e 72h de fermentação.

Cooper & Goldenberg (1987) estudaram a produção de biosurfactante por duas espécies de *Bacillus* em fermentador de bancada, cujo máximo crescimento celular ocorreu após 30h de fermentação, e máximo abaixamento de tensão superficial ocorreu apenas após 60 h de fermentação.

Makkar & Cameotra (1997b) estudaram o crescimento celular e a produção de biosurfactante em intervalos de tempo que variaram entre 24 e 120h, e observaram que após 48h houve um pequeno aumento no crescimento celular, onde com 96h foi obtido um crescimento máximo. Após 120h houve um pequeno declínio da biomassa, como ocorreu com as linhagens acima estudadas. Quanto ao abaixamento de tensão superficial, após 24h, já obteve-se um abaixamento máximo de tensão superficial, e entre 48h e 72h a produção de biosurfactante máxima foi obtida, assim como ocorreu com as linhagens estudadas.



FIGURA 32: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante pela linhagem *B. subtilis* LB-262

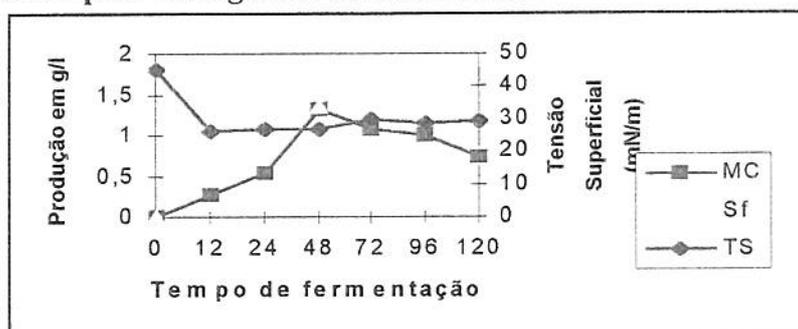


FIGURA 33: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante para a linhagem de *B. subtilis* LB-1993A

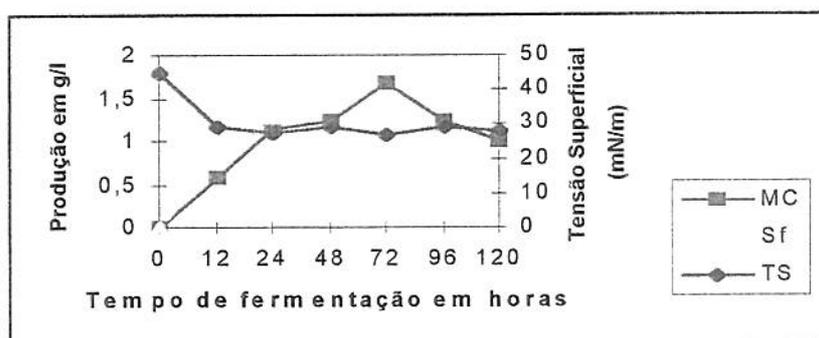


FIGURA 34: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante para a linhagem *B. subtilis* LB-1993B

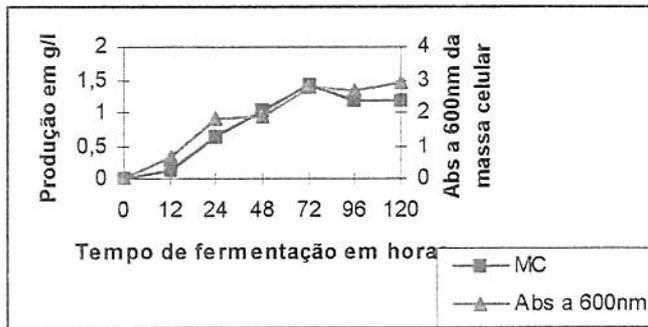


FIGURA 35: Crescimento celular em função ao tempo de fermentação pela linhagem de *B. subtilis* LB- 262

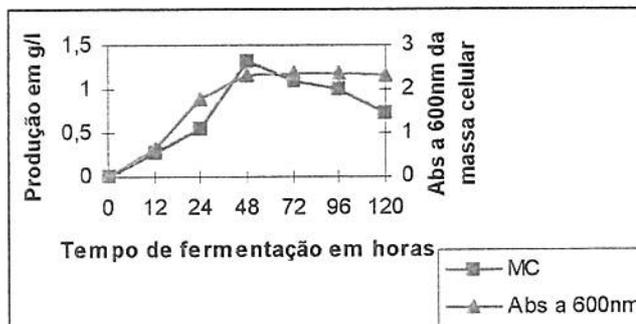


FIGURA 36: Crescimento celular em função ao tempo de fermentação pela linhagem de *B. subtilis* LB- 199-3A

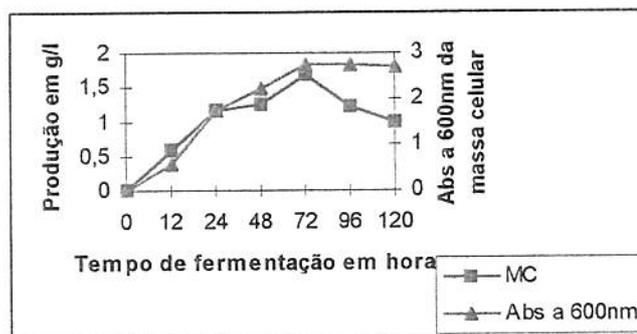


FIGURA 37: Crescimento celular em função ao tempo de fermentação pela linhagem de *B. subtilis* LB-199-3B

4.2.1.11 Utilização de resíduos industriais de processamento de alimentos como fonte de carbono para produção de biosurfactante

Nestes experimentos foram testados três tipos de resíduos industriais, dois provenientes do processamento de produtos cárneos, portanto ricos em gorduras, e pobres ou isentos de açúcares, e um proveniente do processamento da farinha de mandioca, rico em fontes de carbono simples e isento de resíduos gordurosos.

4.2.1.11.1 Resíduos industriais provenientes do abate de bovino e suínos : resíduos constituídos de 70% de gordura bovina e 30% de gordura suína.

Dois tipos de resíduos gordurosos provenientes da mesma empresa foram adicionados ao meio basal na concentração de 1%, com a finalidade de induzir um aumento na produção de biosurfactante. Os resíduos, devido a sua composição foram denominados de gordura branca (GB), cujo resíduo proveniente do abate não sofreu nenhum tipo de tratamento e outro denominado de gordura preta (GP), resultante do tratamento da gordura branca e constituído não somente de gordura animal mas de outros resíduos proveniente da fábrica. Conforme podemos observar os dados da tabela 29, houve um pequeno aumento na produção de biosurfactante por pelas linhagens de *B. subtilis* LB-1993A e LB-262 quando adicionou-se gordura branca ao meio basal, porém a adição da gordura preta não provocou um aumento significativo na produção de biosurfactante, cuja quantidade produzida em meio basal isento de compostos insolúveis girou em torno de 2,5g/L. No caso da linhagem de *B. subtilis* LB-1993B, a adição de ambos os resíduos gordurosos ao meio, não induziu um aumento na produção de biosurfactante.

os resíduos gordurosos ao meio, não induziu um aumento na produção de biosurfactante.

A tensão superficial, no entanto, apresentou valores superiores aos obtidos com o meio basal padrão, cuja tensão superficial do meio basal após fermentação gira em torno de 26mN/m, sendo que quando adicionamos resíduos gordurosos, os valores de tensão superficial subiram para um valor médio de 31mN/m.

Deshpande & Daniels (1995) estudaram a produção do biosurfactante, soforose lípides, por uma linhagem de *Candida bombicola* ATCC 22214 usando gordura animal. Neste experimento os autores obtiveram uma produção de 120g/L.

TABELA 29: Utilização de resíduos industriais gordurosos na produção de biosurfactante pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B

Gordura branca	LB-1993A	LB-1993B	LB-262
TS (mN/m)	30,01	32,72	29,94
MC (g/l)	2,26	1,68	1,68
Sf (g/l)	3,36	2,25	3,19
Gordura preta	LB-1993A	LB-1993B	LB-262
TS (mN/m)	31,20	32,41	30,50
MC (g/l)	1,98	2,01	1,29
Sf (g/l)	2,97	2,79	2,74

4.2.1.11.2 Resíduo proveniente do processamento de farinha de mandioca (manipueira)

A manipueira é resíduo industrial proveniente da prensagem da mandioca destinada à produção de farinha de mandioca. Conforme podemos observar a tabela 30, a manipueira é rica em fontes de carbono, fonte de nitrogênio e sais minerais, sendo capaz de produzir crescimento de microrganismo. Para tanto as linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B foram incubadas em manipueira com a finalidade de avaliar a utilização desta como substrato para a produção de biosurfactantes. Foram então, realizados

três experimentos para as linhagens estudadas, onde em um deles foi adicionado sulfato de manganês à manipueira,

De acordo com os dados nas tabelas 31 a 33 podemos observar que a manipueira se mostrou um excelente substrato para a produção de biosurfactante pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B. Houve um significativo aumento de massa celular em relação ao cultivo em meio basal, que foi cerca de 2,00g/L, passou a ser em média 3,5g/l, mostrando ser a manipueira uma excelente fonte de carbono para o crescimento das linhagens, principalmente do ponto de vista econômico, onde um resíduo de custo zero, rico em nutrientes, e descartado pela indústria, pode ser utilizado através da biotecnologia para produzir produtos de alto valor comercial. Quanto à produção de biosurfactante, os resultados foram bastante promissores, conforme podemos observar nas tabelas 28, 29 e 30 principalmente quando a manipueira foi adicionada de íons Mn^{+} , cuja produção de biosurfactante nesse caso aumentou de 2,50g/l (valor médio produzido pelas linhagens em meio basal) para 6,5g/l, no caso da linhagem LB-262. No entanto, como se trata de um resíduo industrial, cuja composição de nutrientes pode variar entre um processamento e outro, os resultados obtidos podem variar, portanto apesar de promissores, a produção de biosurfactantes pelas linhagens LB-262, LB-1993A e LB-1993B, merece um estudo mais aprofundado.

Sheppard & Mulligan (1987) utilizaram turfa hidrolisada como fonte de carbono para a produção de biosurfactante por uma linhagem de *B.subtilis*. A hidrólise do material deu origem a seis açúcares (glicose, arabinose, ribose, xilose, galactose e manose), sendo a glicose 46% do total. A linhagem estudada apresentou capacidade de metabolizar todos os açúcares presentes no hidrolisado, bem como de produzir biosurfactante. Em alguns casos adicionou-se 1% de glicose, o que provocou um aumento na massa celular, cuja produção foi de 1,11g/l.

TABELA 30: Composição da manipueira utilizada como fonte de carbono para a produção de biosurfactante

Açúcares	g/L
Açúcares totais (sacarose, glicose, maltotriose, frutose e maltose)	60
Açúcares redutores (glicose e frutose)	40
Nitrogênio	g/L
N	1,61
Minerais	mg/L
P	1,25
K	800
Ca	120
Mg	170
S	40
Zn	4,5
Mn	0
Cu	0
Fe	7,5
Na	4,5
pH natural	5,8 - 6,0

Fonte: Damasceno *et alii* (1999)

TABELA 31: Utilização da manipueira para a produção de biosurfactante para a linhagem LB-262

Substrato (manipueira)	Tensão Superficial (mN/m)	Massa Celular (g/l)	Extrato bruto de biosurfactante(g/l)
manipueira antes da fermentação	42,61	-----	-----
pH 5,8	26,35	3,04	2,03
pH 6,5	26,75	5,25	2,48
pH 6,5 com Mn ⁺	26,88	3,01	6,45

TABELA 32: Utilização da manipueira para a produção de biosurfactante para a linhagem LB-1993A

Substrato (manipueira)	Tensão Superficial (mN/m)	Massa Celular (g/l)	Extrato bruto de biosurfactante(g/l)
manipueira antes da fermentação	42,61	-----	-----
pH 5,8	27,14	2,47	1,10
pH 6,5	26,48	2,93	1,60
pH 6,5 com Mn ⁺	27,08	2,44	1,48

TABELA 33: Utilização da manipueira para a produção de biosurfactante para a linhagem LB-1993B

Substrato (manipueira)	Tensão Superficial (mN/m)	Massa Celular (g/l)	Extrato bruto de biosurfactante(g/l)
manipueira antes da fermentação	42,61	-----	-----
pH 5,8	26,67	3,74	2,5
pH 6,5	27,66	4,39	3,48
pH 6,5 com Mn ⁺	27,15	5,92	2,78

4.2.1.11.2.1 Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em manipueira

4.2.1.11.2.1.1 Comparação entre a produção de biosurfactante pelas linhagens produtoras em meio basal sintético e em manipueira

Conforme podemos observar nas figuras 38 a 40, houve um aumento na produção de biosurfactante pelas três linhagens de *B.subtilis*, quando estas foram cultivadas em manipueira. No caso da linhagem de *B. subtilis* LB-262, a produção de biosurfactante de 2,0g/L, em meio basal, aumentaram para 7,1g/L quando a linhagem foi cultivada em manipueira. Para as linhagens de *B.subtilis* LB-1993A e LB-1993B, conforme podemos observar na figura 39 e 40, a produção média de 2,0g/L em meio basal aumentou para 4,0g/L quando a manipueira foi utilizada como substrato para produção.

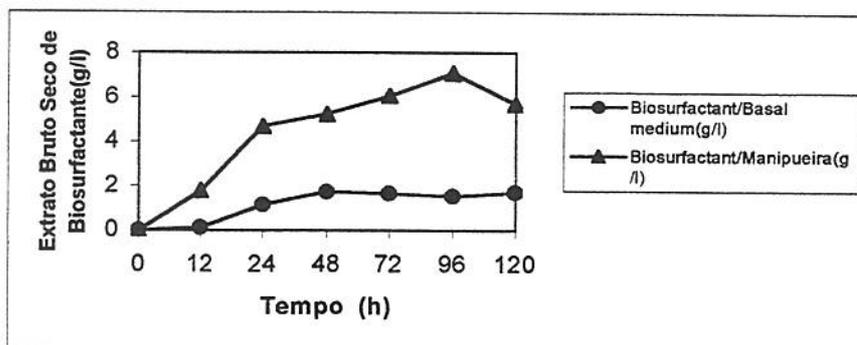


FIGURA 38: Produção de biosurfactante em meio basal e em manipueira pela linhagem de *B. Subtilis* LB-262

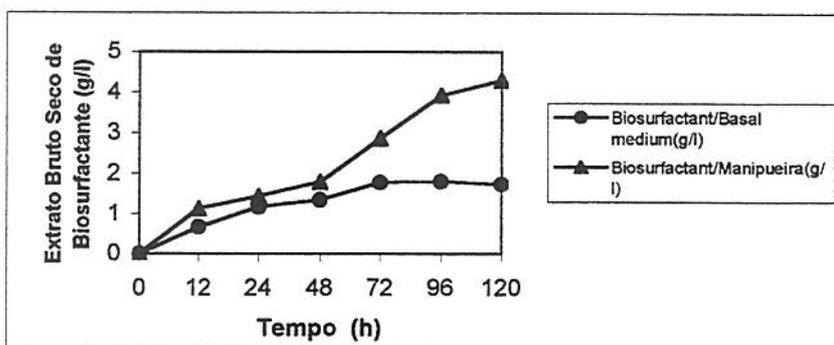


FIGURA 39: Produção de biosurfactante em meio basal e em manipueira pela linhagem de *B. Subtilis* LB-1993A

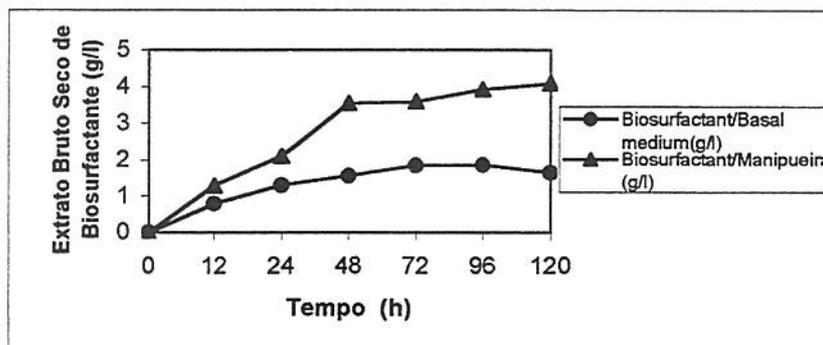


FIGURA 40: Produção de biosurfactante em meio basal e em manipueira pela linhagem de *Bacillus Subtilis* LB-1993B

4.2.1.11.2.1.2 Curva de crescimento das linhagens produtoras de biosurfactante cultivadas em manipueira

Conforme podemos observar através das figuras 41, 42 e 43 e das tabelas 34 a 36, a tensão superficial foi reduzida nas primeiras 12h de 41,98mN/m para 26,29mN/m pela linhagem de *B. subtilis* LB-262, de 44,27mN/m para 29,38mN/m para a linhagem de *B. subtilis* LB-1993A e no caso da linhagem *B. subtilis* LB-1993B, o abaixamento foi de 48,8mN/m para 26,68. Segundo estudos realizados, linhagens de *B. subtilis* produzem um biosurfactante chamado surfactina, as quais são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72,8mN/m para 26mN/m.(VATER, 1989; DESAI & BANAT, 1997; MAKKAR & CAMEOTRA, 1997a;b). Quanto ao crescimento das três linhagens em estudo, podemos observar que houve um acentuado crescimento celular nos intervalos de 0 a 96h no caso da linhagem de *B. subtilis* LB-262, já no caso da linhagem *B. subtilis* LB-1993A, o aumento foi mais acentuado nas primeiras 72 horas de cultivo, após tal período o crescimento não se mostrou tão significativo. Quanto à linhagem *B. subtilis* LB-1993B, um aumento de massa celular mais significativo pode ser observado nas primeiras 72h de fermentação. Makkar & Cameotra (1997b), estudaram o crescimento celular e produção de biosurfactante por duas linhagens de *B. subtilis*, cultivados em melaço durante 96h. Segundo os autores, um crescimento celular se mostrou mais significativo nas primeiras 24h de fermentação, e se tornou praticamente constante para a linhagem de *B. subtilis* MTCC 2423 após este período. Quanto a segunda linhagem estudada, *B. subtilis* MTCC 1427, um crescimento significativo ocorreu nas primeiras 48h de fermentação, e após tal período houve um declínio na quantidade de massa celular produzida.

Quanto à produção de extrato bruto de biosurfactante, as quantidades produzidas pelas três linhagens estudadas foi superior em relação as quantidades

produzidas por linhagens de *B. subtilis* citadas na literatura, cuja produção média é de 1g/L (MAKKAR & CAMEOTRA, 1997).

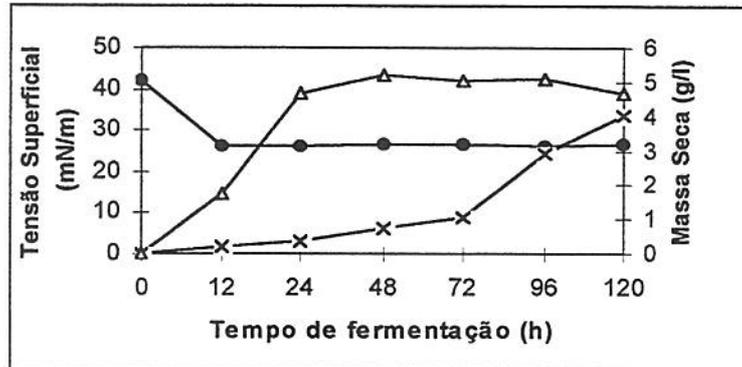


FIGURA 41 Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-262, em relação ao crescimento durante 120h (• Tensão Superficial (mN/m), x Massa Celular(g/l), Δ Extrato bruto de biosurfactante)

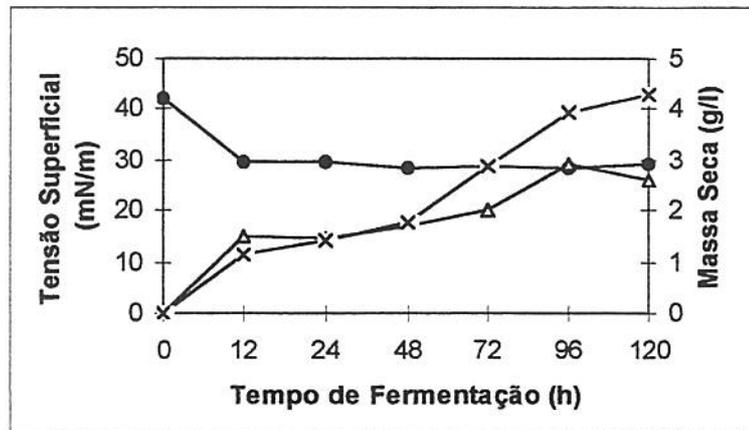


FIGURA 42: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993A, em relação ao crescimento durante 120h (• Tensão Superficial (mN/m), x Massa Celular(g/l), Δ Extrato bruto de biosurfactante)

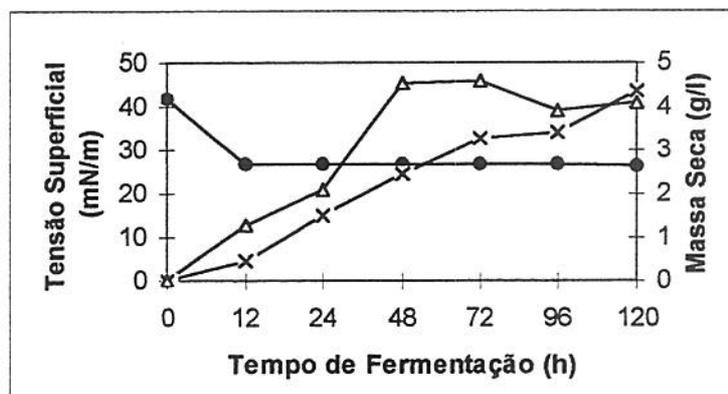


FIGURA 43: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993B, em relação ao crescimento, durante 120h

• Tensão Superficial (mN/m), x Massa Celular(g/l), Δ Extrato bruto de biosurfactante)

TABELA 34: Influência do tempo de incubação na produção de biosurfactante em manípueira para a linhagem de *B. subtilis* LB-262

Tempo (h)	Massa Celular (g/l)	Abs a 600nm	Extrato Bruto (g/l)	TS (mN/m)	CMD ⁻¹ (mN/m)	CMD ⁻² (mN/m)	Consumo de Glicose (mg/dL)
0	0	0	0	41,98	51,21	59,76	766,35
12	0,19	0,0402	1,76	26,29	26,73	34,77	715,92
24	0,38	3,2384	4,68	26,22	26,81	31,46	585,77
48	0,76	3,9988	5,23	26,63	26,84	32,87	439,87
72	1,08	4,8102	6,05	26,59	26,71	30,9	4,49
96	2,9	5,6398	7,1	26,31	26,92	33,96	3,43
120	4,06	5,3986	5,68	26,46	27,19	34,68	2,55

TABELA 35: Influência do tempo de incubação na produção de biosurfactante em manipueira para a linhagem de *B. subtilis* LB-1993A

Tempo (h)	Massa Celular (g/l)	Abs a 600nm	Extrato Bruto (g/l)	TS (mN/m)	CMD ⁻¹ (mN/m)	CMD ⁻² (mN/m)	Consumo De Glicose (mg/dL)
0	0	0	0	44,27	50,43	59,05	764,78
12	1,5	0,6785	1,135	29,38	38,32	54,25	616,16
24	1,45	3,2384	1,43	29,46	28,48	52,54	584,08
48	1,71	3,9988	1,79	28,16	28,72	52,21	23,43
72	2,01	4,8102	2,87	28,88	30,81	54,47	5,72
96	2,9	5,6398	3,93	28,32	29,65	47,97	1,2
120	2,6	5,3986	4,3	29,04	30,01	47,71	1,48

TABELA 36: Influência do tempo de incubação na produção de biosurfactante em manipueira para a linhagem de *B. subtilis* LB-1993B

Tempo (h)	Massa Celular (g/l)	Abs a 600nm	Extrato Bruto (g/l)	TS (mN/m)	CMD ⁻¹ (mN/m)	CMD ⁻² (mN/m)	Consumo De Glicose (mg/dL)
0	0	0	0	48,8	52,34	59,81	699,73
12	0,44	0,6285	1,28	26,68	32,76	49,28	682,51
24	1,51	3,5416	2,11	26,67	27,52	50,19	591,09
48	2,46	4,1682	4,55	26,82	26,67	32,11	2,95
72	3,27	4,2584	4,59	26,65	26,89	30,05	1,93
96	3,41	4,595	3,92	26,77	26,85	30,46	1,96
120	4,35	5,1013	4,09	26,57	26,71	30,03	1,48

4.2.1.11.2.1.3 Consumo de glicose durante o crescimento celular da linhagens produtoras de biosurfactante em meio basal e manipueira, em agitador rotativo

De acordo com os resultados das figuras 44 a 46, podemos observar que o consumo de glicose no meio basal por *B. subtilis* LB-262 foi baixo, em comparação às linhagens de *B. subtilis* LB-1993A e LB-1993B, as quais utilizaram quase toda glicose presente no meio após 96h e 120h de fermentação, respectivamente. Quanto ao consumo de glicose na manipueira, as linhagens de *B. subtilis* apresentaram um consumo mais acelerado da glicose presente nesta, onde a linhagem LB-262 apresentou ter consumido quase toda glicose presente até o período 120h de fermentação. Já a linhagem LB-1993A apresentou um acentuado consumo da glicose presente na manipueira nas primeiras 72h de fermentação. Quanto à linhagem LB-1993B, esta apresentou um consumo mais acelerado da glicose, a qual foi reduzida de 697,73mg/dL para 9,79mg/dL nas primeiras 72h de fermentação.

$$\text{GLICOSE (mg/dL)} = \text{D/P} \times 100$$

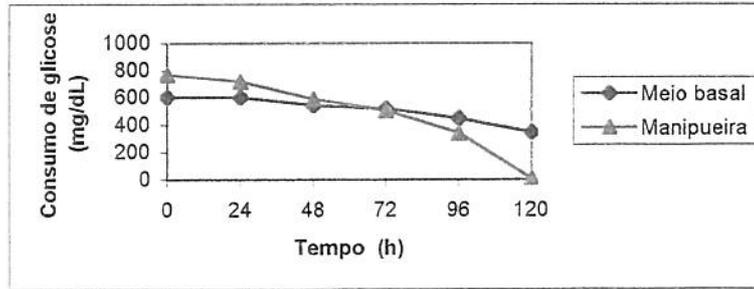


FIGURA 44: Consumo de glicose em meio basal e manipueira pela linhagem de *B. subtilis* LB-262

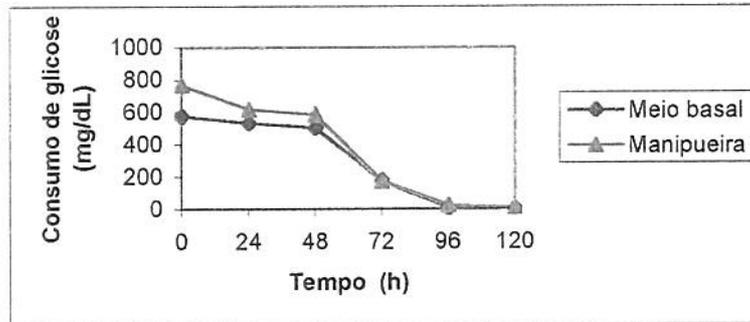


FIGURA 45: Consumo de glicose em meio basal e manipueira pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993A

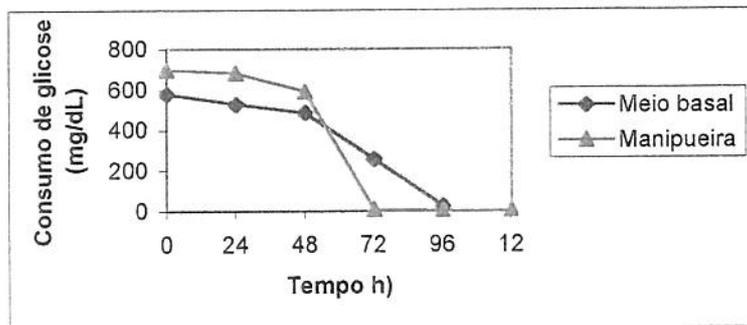


FIGURA 46: Consumo de glicose em meio basal e manipueira pela linhagem de *Bacillus subtilis* LB-1993B

4.2.1.12 Propriedades tensoativas do meio de cultura basal fermentado em agitador rotativo após remoção das células

Neste experimento o meio fermentado em agitador rotativo foi centrifugado e a TS e a CMD medidas no sobrenadante. Conforme observamos os dados das tabelas 47 a 49, podemos observar que nas primeiras 24h de fermentação ocorreu o abaixamento máximo de tensão superficial do meio de cultura para as três linhagens de *B. subtilis* produtoras de biosurfactante. A tensão superficial do meio sem inóculo abaixou de 44,72mN/m para 25,73mN/m para a linhagem LB-262, de 45,53mN/m para 28,63mN/m para a linhagem LB-1993A e de 43,68mN/m para 27,07mN/m. Quanto aos testes de concentração micelar diluída, estes podem avaliar a capacidade de um dado surfactante em abaixar a tensão superficial da água cujo valor médio de tensão superficial de 72,80mN/m é reduzido para 27mN/m quando apenas 0,005% de surfactina é adicionada (ARIMA, 1968; DESAI & BANAT, 1997).

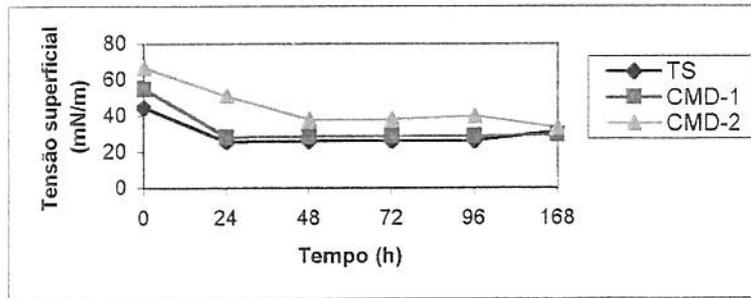


FIGURA 47: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal fermentado em agitador rotativo pela linhagem de *B. subtilis* LB-262

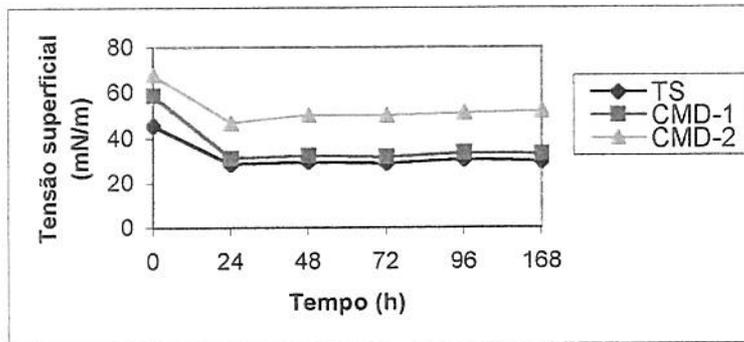


FIGURA 48: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal fermentado em agitador rotativo pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993A

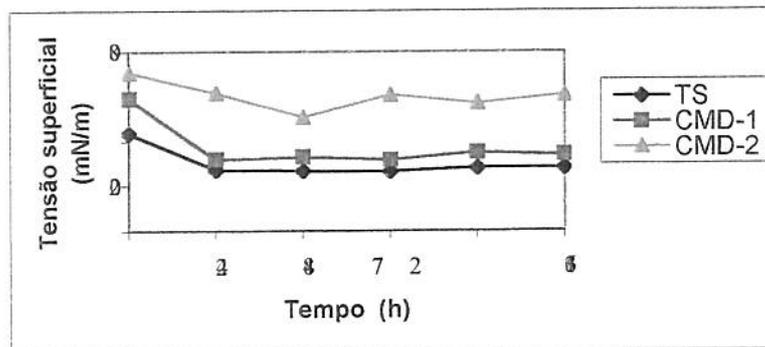


FIGURA 49: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal fermentado em agitador rotativo pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993B

4.3 Teste de emulsificação

A atividade de um bioemulsificante é definida como a quantidade de emulsificante extracelular que provoca uma absorvância de 1,0 a 540nm contra o branco (meio de cultura filtrado sem inóculo). Este experimento seguiu o método de Cirigliano & Carman (1984) com o método de Johnson *et alii* (1992). Neste trabalho, compostos insolúveis foram adicionados na concentração de 2% a 4mL do meio basal contendo glicose como fonte de carbono, para cada uma das linhagens estudadas. Através da absorvância observou-se a capacidade emulsificante do biosurfactante produzido pelas linhagens estudadas quando estas foram fermentadas em meio contendo glicose como fonte de carbono. Neste experimento, o espectrofotômetro foi calibrado, com o tubo controle, o qual consistiu do meio basal fermentado, centrifugado, isento de células e de compostos insolúveis. Os meios de fermentação foram filtrados em membrana millipore 0,45µm para cada uma das linhagens estudadas (JOHNSON *et alii*, 1992) para evitar a influência de partículas durante a leitura da absorvância.

Conforme podemos observar através dos resultados da tabela 37, e das figuras 50 a 53, houve uma maior capacidade de emulsificação dos óleos vegetais pelo biosurfactante, no caso óleo de milho e girassol, do que dos alcanos adicionados. O biosurfactante produzido pela linhagem LB-262 apresentou segundo o método testado, maior capacidade emulsificante para ambos os tipos de compostos. O biosurfactante produzido pela linhagem LB-1993B não apresentou boa capacidade de emulsificar o squaleno, porém os resultados foram bastante satisfatório para os outros compostos testados. O biosurfactante produzido pela linhagem LB-1993A foi o que apresentou menor atividade emulsificante, com exceção do óleo de milho, cujo resultado foi comparável ao obtido para as demais linhagens. Cirigliano & Carman (1984), testaram vários meios de culturas com

diferentes substratos (glicose, hexadecano, parafina, óleo de soja, óleo de oliva, óleo de milho, onde cada uma delas foi emulsificada com hexadecano) e obtiveram uma menor atividade para o meio contendo glicose, 0,09, e uma maior para o meio contendo óleo de soja, o qual mostrou uma atividade de 0,98.

Tabela 37: Emulsificação de composto insolúveis com leitura de absorbância a 540nm

Composto	LB-262	LB-1993A	LB-1993B
1 (hexadecano)	1,9901	0,4612	1,2602
2 (tetradecano)	2,0215	0,3610	1,2933
3 (squaleno)	1,7387	0,4762	0,4597
4(óleo de girassol)	2,5878	3,3577	2,8949
5(óleo de milho)	3,2346	2,0590	3,1199

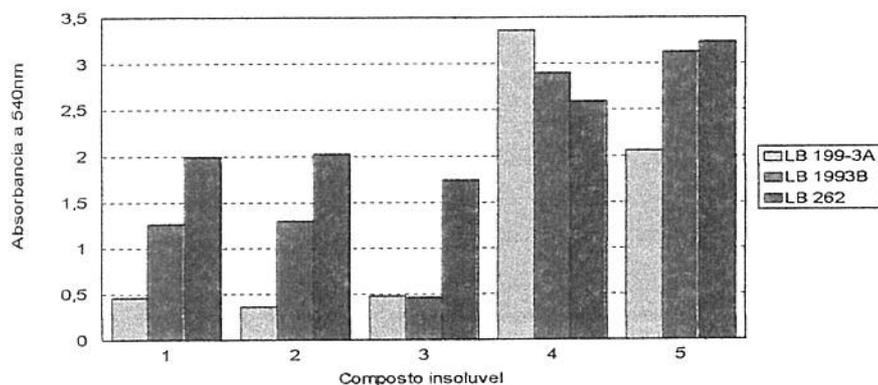


FIGURA 50: Emulsificação de compostos insolúveis com leitura de absorbância a 540nm

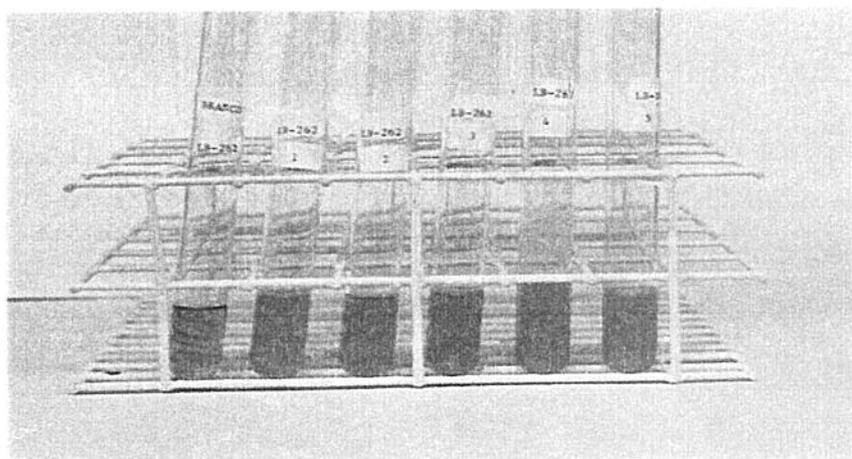


FIGURA 51: Teste de emulsificação de compostos insolúveis com o biosurfactante produzido por *B. subtilis* LB-262

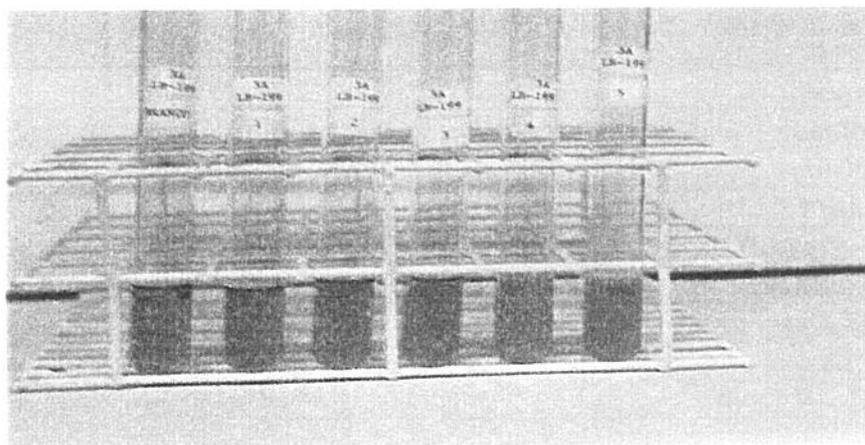


FIGURA 52: Teste de emulsificação de compostos insolúveis com o biosurfactante produzido por *B. subtilis* LB-1993A

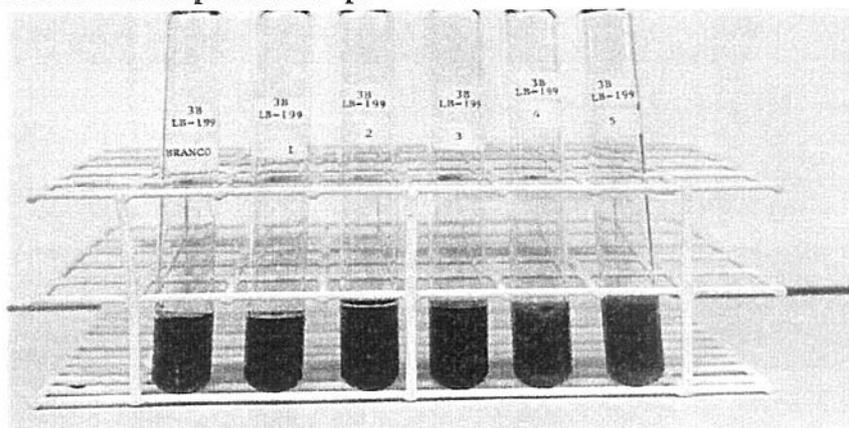


FIGURA 53: Teste de emulsificação de compostos insolúveis com o biosurfactante produzido por *B. subtilis* LB-1993B

4.4 Pré-purificação do biosurfactante produzido utilizando o processo de ultrafiltração

4.4.1 Pré-purificação do biosurfactante produzido em meio basal

Este experimento teve por objetivo concentrar o biosurfactante produzido pelas linhagens de *B.subtilis*, utilizando três tipos de membranas de diferentes pesos moleculares, de 10.000 Da (PM 10, membrana de poliétersulfona), tabela 38, 30.000 Da (YM 30, membrana de celulose regenerada), dados na tabela 39, e 50.000 Da (XM 50, membrana de PVC), dados tabela 40, e avaliar assim a eficiência do processo de concentração nas diferentes membranas testadas.

Quanto ao comportamento do meio retido pela membrana, seu comportamento tensoativo deveria se assemelhar ou provocar tensões superficiais mais baixas quando diluídos na mesma quantidade em água destilada, já que a concentração de 0,1mL do meio retido pela membrana deve conter mais biosurfactante do que 0,1mL de meio após fermentação, pois para todas membranas testadas, 100mL de meio após fermentação foram concentrados para 15ml, sendo o volume do filtrado portanto de 85mL, e teoricamente todo biosurfactante diluído em 100mL de meio deveria ser retido pela membrana e passar a ser diluído em 15mL de meio.

Conforme podemos observar os dados da tabela 38, a membrana de 10KDa foi eifciente para as três linhagens estudadas, onde os valores de CMD^{-1} e CMD^{-2} para o permeado tiveram valores semelhantes a tensão superficial da água indicando que pequena quantidade de biosurfactante presente. Já quando utilizamos as membranas YM30 e XM50, de peso molecular de 30KDa e 50KDa respectivamente, tabelas 39 e 40, podemos observar que o permeado possuía maiores propriedades tensoativas que o permeado resultante da ultrafiltração realizada com a membrana 10KDa (PM10), indicando maiores perdas de

biosurfactante no concentrado quando as membranas YM30 e XM50, sendo que uma perda mais significativa ocorreu quando a membrana XM50 foi utilizada na concentração do biosurfactante produzido pela linhagem LB-262..

Mulligan & Gibbs (1990) concentraram e purificaram o biosurfactante produzido por uma linhagem de *B. subtilis*, produtor da surfactina, e uma linhagem de *P.aeruginosa*, produtor de raminolípidos. Os autores utilizaram membranas de diferentes pesos moleculares e materiais, YM10, YM30, XM 50, XM 100 e XM 300, onde os melhores resultados para a surfactina foram obtidas com as membranas YM 10, YM30 e XM50, onde a retenção da surfactina foi de 98,2%, 96,8% e 98,2% respectivamente, enquanto que para as membranas XM 100 e XM 300, a % de retenção da surfactina foi de 73,8 e 28% respectivamente. Já no caso dos ramnolípidos as membranas YM 10 e YM 30 foram capazes de reter 92% e 80% do biosurfactante presente no meio após fermentação, respectivamente, enquanto que as demais membranas provocaram perdas superiores a 40%.

Lin & Jiang (1997) concentraram a surfactina produzida por uma linhagem de *B. subtilis* utilizando uma membrana de 30.000 Da, de celulose regenerada, onde após a ultrafiltração o retido foi diluído em metanol, as micelas rompidas, e o retido novamente submetido ao processo de ultrafiltração onde desta vez desejava que o biosurfactante fosse coletado no filtrado (PE). A seguir o filtrado foi seco e submetido a análises de aminoácidos e HPLC, e os autores obtiveram uma pureza de 95%.

TABELA 38: Concentração do biosurfactante produzido pela linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B , utilizando ultrafiltração com a membrana PM10

<i>B. subtilis</i> LB-262	FE	RE	PE
Sem diluição	26,77	26,49	33,88
CMD ⁻¹	29,62	29,77	61,00
CMD ⁻²	29,42	32,04	72,91
<i>B. subtilis</i> LB-1993A	FE	RE	PE
Sem diluição	28,82	28,55	44,33
CMD ⁻¹	35,01	39,41	60,2
CMD ⁻²	37,82	40,41	61,22
<i>B. subtilis</i> LB-1993B	FE	RE	PE
Sem diluição	27,82	28,27	47,43
CMD ⁻¹	31,79	33,58	67,14
CMD ⁻²	42,98	38,19	64,9

TABELA 39: Concentração do biosurfactante produzido pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B utilizando ultrafiltração com a membrana YM30

<i>B. subtilis</i> LB-262	FE	RE	PE
Sem diluição	26,77	26,31	41,62
CMD ⁻¹	29,42	28,66	52,11
CMD ⁻²	29,62	28,90	55,64
<i>B. subtilis</i> LB-1993A	FE	RE	PE
Sem diluição	28,82	28,37	40,04
CMD ⁻¹	35,01	33,28	49,8
CMD ⁻²	37,82	36,88	52,91
<i>B. subtilis</i> LB-1993B	FE	RE	PE
Sem diluição	27,82	26,91	36,03
CMD ⁻¹	31,79	31,52	54,44
CMD ⁻²	42,98	35,49	59,68

TABELA 40: Concentração do biosurfactante produzido pela linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B, utilizando ultrafiltração com a membrana XM50

<i>B. subtilis</i> LB-262	FE	RE	PE
Sem diluição	26,77	26,46	27,92
CMD ⁻¹	29,62	28,26	42,12
CMD ⁻²	29,42	29,33	50,08
<i>B. subtilis</i> LB-1993A	FE	RE	PE
Sem diluição	28,82	28,43	42,53
CMD ⁻¹	35,01	33,86	65,69
CMD ⁻²	37,82	32,91	60,60
<i>B. subtilis</i> LB-1993B	FE	RE	PE
Sem diluição	27,82	27,01	44,09
CMD ⁻¹	31,79	30,44	34,32
CMD ⁻²	42,98	34,13	35,24

Legenda para a tabelass 35 a 37:

FE: meio de cultura centrifugado após 48h de fermentação

RE: meio de cultura centrifugado após 48h de fermentação, retido pela membrana de ultrafiltração (no retido é que deve haver uma maior quantidade de biosurfactante)

PE: meio de cultura centrifugado após 48h de fermentação, filtrado através da membrana de ultrafiltração, e onde teoricamente não deveria haver biosurfactante

4.4.2 Pré-purificação do biosurfactante produzido em manipueira

A manipueira fermentada em agitador rotativo por cada uma das linhagens de *B. subtilis* produtoras, foi concentrada por ultrafiltração em dois tipos de membrana, PM10 e YM 30, baseando-se em estudos realizados anteriormente com o meio basal. Membranas com aberturas superiores a 30.000KDa, provocam uma perda de biosurfactante superiores a 12% (MULLIGAN & GIBBS, 1990). Como a produção de biosurfactante em manipueira é inédita, não há precedentes na literatura de qual membrana seria adequada para sua concentração e pré-purificação. Supondo os biosurfactantes produzidos em manipueira teriam estruturas semelhantes à dos biosurfactantes produzidos em meio basal, utilizamos a mesma metodologia de pré-purificação do biosurfactante em meio

basal para os biosurfactantes produzidos em manipueira. Como a membrana XM50 provocou maiores perdas durante a concentração do meio basal, esta não foi utilizada neste experimento.

De acordo com os resultados das tabelas 41 e 42 , as membranas apresentaram resultados semelhantes para as três linhagens de *B.subtilis*. O permeado obtido com a concentração da membrana de peso molecular de 10.000KDa e de 30.000KDa apresentaram baixas propriedades tensoativas em relação ao retido (concentrado) para todas as amostras analisadas, indicando portanto uma eficiente concentração dos biosurfactantes produzidos em tal metodologia. (MULLIGAN & GIBBS,1990)

TABELA 41: Ultrafiltração do biosurfactante produzido em manipueira pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B- membrana PM10

<i>B. subtilis</i> LB-262	FE	RE	PE
CMD ⁻¹	26,91	26,81	47,00
CMD ⁻²	31,83	31,18	66,71
<i>B. subtilis</i> LB-1993A	FE	RE	PE
CMD ⁻¹	30,21	30,17	63,12
CMD ⁻²	45,23	38,69	64,64
<i>B. subtilis</i> LB-1993B	FE	RE	PE
CMD ⁻¹	27,11	27,13	48,44
CMD ⁻²	32,45	28,65	71,5

TABELA 42: Ultrafiltração do biosurfactante produzido em manipueira pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B- membrana YM30

<i>B. subtilis</i> LB-262	FE	RE	PE
CMD ⁻¹	26,93	26,00	47,14
CMD ⁻²	33,48	29,49	62,57
<i>B. subtilis</i> LB-1993A	FE	RE	PE
CMD ⁻¹	29,79	27,96	49,96
CMD ⁻²	50,21	37,09	59,09
<i>B. subtilis</i> LB-1993B	FE	RE	PE
CMD ⁻¹	29,79	27,96	50,09
CMD ⁻²	36,83	31,87	58,74

4.4.3 Análise do teor de proteína presente no retido e no permeado (YM30) em meio basal e manipeira

De acordo com os dados das tabelas 43 e 44, podemos observar que houve uma maior concentração de proteína presente no meio de cultura fermentado e retido pela membrana após o processo de ultrafiltração, uma vez que o permeado obtido para cada uma das linhagens fermentadas apresentaram quantidades bastante inferiores de proteína quando comparada com a quantidade de proteína no retido. No entanto, estas análises foram feitas a fim de comprovarmos a eficiência do processo de ultrafiltração em concentrar o biosurfactante presente no meio de cultura.

TABELA 43: Teor de proteína do retido e do permeado do meio basal fermentado pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B – Membrana YM30

<i>B.subtilis</i> LB-262	Dil.	Abs.	Ccdil. Ug	Cctotal mg/ml
FE	1:15	0,8042	408,96	6,134
RE	1:15	0.879	502,4	7,54
PE	1:15	0.3172	176,2	2,64
<i>B.subtilis</i> LB-1993A	Dil.	Abs.	Ccdil.	Cctotal mg/ml
FE	1:15	0.469	264,3	3,96
RE	1:15	0.7268	413,8	6,21
PE	1:15	0.3315	184,5	2,77
<i>B.subtilis</i> LB-1993B	Dil.	Abs.	Ccdil.	Cctotal mg/ml
FE	1:15	0.4449	250,4	3,76
RE	1:15	0.6322	358,9	5,38
PE	1:15	0.2721	150,0	2,25

TABELA 44: Teor de proteína do retido e do permeado da manipueira fermentada pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B – Membrana YM30

<i>B.subtilis</i> LB-262	Dil.	Abs.	Ccdil.	Cctotal mg/ml
FE	1:15	0.6172	350,2	5,25
RE	1:15	0.9808	561,2	8,42
PE	1:15	0.3406	189,73	2,85
<i>B.subtilis</i> LB-1993A	Dil.	Abs.	Ccdil.	Cctotal mg/ml
FE	1:15	0.6172	350,2	8,45
RE	1:15	0.9808	561,2	13,14
PE	1:15	0.3406	189,73	8,09
<i>B.subtilis</i> LB-1993B	Dil.	Abs.	Ccdil.	Cctotal mg/ml
FE	1:15	0.7893	403,7	6,05
RE	1:15	1.2526	718,5	10,77
PE	1:15	0.4688	264,1	3,96

4.6 Determinação da tensão interfacial do meio basal e manipueira contra hexadecano

A tensão interfacial mede a tensão na interface entre dois líquidos imiscíveis, e quanto menor a tensão na interface, maior será a capacidade deste sistema de formar uma emulsão estável, quando em condições adequadas. Com o objetivo de se estudar mais uma propriedade do biosurfactante produzido pelas linhagens estudadas, e também com o intuito de comprovar a concentração do biosurfactante produzido pelo sistema de ultrafiltração, o fermentado (FE) e o permeado (PE) resultante de ultrafiltração do meio basal e da manipueira em membrana YM30, para cada uma das linhagens produtoras, tiveram a tensão interfacial contra o hexadecano determinadas. Conforme podemos observar pelos resultados da tabela 45, a tensão interfacial do meio de cultura basal e da

manipueira, apresentaram uma tensão interfacial baixa contra o hexadecano, quando comparamos a tensão na interface entre a água e o hexadecano, que de 45,30mN/m abaixou para valores inferiores a 3mN/m. Quanto à comprovação da eficiência da concentração dos biosurfactantes produzidos por ultrafiltração, os permeados resultantes da ultrafiltração do meio basal e de manipueira mostraram ter uma tensão interfacial contra o hexadecano maior que a do meio de cultura antes do processo de ultrafiltração. Hommel *et alii* (1987) observaram que a tensão interfacial entre o hexadecano e um meio de cultura fermentado por uma linhagem de *Torulopsis bombicola* era em torno de 1mN/m. Horowitz *et alii* (1990) mostraram que a tensão interfacial do meio de cultura fermentado por uma linhagem de *B. licheniformis*, cujo surfactante tem estrutura semelhante ao da surfactina reduziu a tensão interfacial contra o hexadecano para 0,36mN/m, podendo chegar a valores inferiores a este.

TABELA 45: Tensão interfacial do sistema hexadecano contra os meios basal e manipueira para as linhagens de *B. subtilis* produtoras de biosurfactante

SISTEMA	TI(mN/m) hexadecano/meio basal	TI(mN/m) hexadecano/manipueira
Hexadecano/H ₂ O	45,30	45,30
Hexadecano/meio s/ inóculo	19,7	23,40
Hexadecano/LB-262FE	0,87	1,15
Hexadecano/LB-1993AFE	3,19	2,43
Hexadecano/LB-1993BFE	1,14	1,51
Hexadecano/LB-262PE	4,8	14,78
Hexadecano/LB-1993APE	6,61	20,86
Hexadecano/LB-1993BPE	3,41	17,10

4.5 Produção de biosurfactante em meio basal utilizando fermentador de bancada

4.5.1 Efeito do tempo de incubação na produção de biosurfactante em meio basal utilizando fermentador de bancada

Este experimento teve o objetivo de estudar a produção de biosurfactante pelas linhagens de *B.subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B em fermentador de bancada. Conforme observamos os dados das tabelas 46 a 48, diferentemente dos ensaios realizados em agitador rotativo, a tensão superficial das amostras do meio de cultura coletadas de dentro do fermentador apresentaram aumento da tensão superficial em relação ao tempo de fermentação. Após algumas horas de iniciado o período de cultivo, observou-se que uma grande quantidade de espuma era formada com 6h de fermentação para a linhagem LB-262, em torno de 12h para a linhagem LB-1993B e apenas 2h para a linhagem LB-1993A, e sua saída forçada pela saída de exaustão de ar. Foi conectada então, durante cada fermentação, uma mangueira, que acoplada a um funil de separação, passou a coletar a espuma do fermentador. As linhagens apresentaram grandes diferenças de metabolismo no fermentador, diferenças estas que não foram tão claras quando a produção de biosurfactantes foi feita em agitador rotativo. A linhagem de *B. subtilis* LB-262 apresentou após 9h de fermentação seu maior consumo de oxigênio, enquanto que para a linhagem LB-1993A, este tempo foi de 16h e para a linhagem LB-1993B, isso ocorreu após 24h. Não houve diminuição do pH durante o curso da fermentação para nenhuma das linhagens estudadas, e o crescimento celular foi mais acentuado nas primeiras 24h de fermentação. Quanto ao tempo de fermentação, estes diferiram entre uma linhagem e outra.

TABELA 46: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em fermentador de bancada pela linhagem de *B. subtilis* LB-262

Tempo (h)	Massa Celular (g/L)	Abs (600nm)	Glicose (mg/dL)	TS (mN/m)	OD	pH
0	0	0	567,67	45,71	91	5,87
9	0,21	0,1001	564,88	33,65	32,0	5,70
24	0,52	0,2903	497,82	29,35	41,8	5,70
48	0,67	0,3795	494,54	39,17	45,8	5,75
72	0,72	0,4125	477,52	39,62	45,3	5,75
96	0,70	0,3965	455,32	48,03	45,7	5,71

TABELA 47: Influência do tempo de fermentação na produção de osurfactante em fermentador de bancada pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993A

Tempo (h)	Massa Celular (g/L)	Abs a 600nm	Glicose (mg/dL)	TS (mN/m)	OD	Ph
0	0	0	485,60	44,99	96,5	6,53
3	0,16	0,1564	472,31	31,60	65,3	6,23
16	0,91	0,534	418,23	42,88	23,0	6,40
24	1,00	0,559	461,84	43,39	48,7	6,32
48	0,85	0,518	378,41	43,54	48,3	6,27

TABELA 48: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em fermentador de bancada pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993B

Tempo de fermentação (h)	Massa Celular (g/L)	Abs a 600nm	Glicose	Tensão Superficial	OD	Ph
0	0	0	569,67	54,91	95	5,61
24	1,25	0,64	577,47	28,63	22,2	5,11
48	1,29	0,71	461,23	55,51	50,4	5,3
72	1,91	0,854	366,09	45,30	50,2	5,28
96	1,15	0,821	251,58	43,05	50,3	5,27

4.5.2 Propriedades tensoativas do meio de cultura basal fermentado em fermentador de bancada

Neste experimento, 2L de meio de cultura basal foram fermentados por cada uma das linhagens de *B. subtilis*, LB-262, LB-1993A e LB-1993B, em fermentador de bancada, BIOFLO III, com capacidade de 2,5L, conforme figura 57. As condições de fermentação foram temperatura de 30°C, OD de 50% controlado pela agitação, cujo intervalo estipulado foi de no mínimo de 150rpm até 300rpm. O pH do meio antes do processo de autoclavagem foi ajustado para 6,5, no entanto após o processo de autoclavagem houveram variações, as quais porém não influíram negativamente para o bom curso da fermentação.

De acordo com os resultados obtidos nas figuras 54, 55 e 56, a tensão superficial do meio de cultura de dentro do fermentador, apresentou tensão superficial alta se compararmos com as propriedades tensoativas do meio de cultura resultante do cultivo em frascos agitados. Isso ocorreu pois neste tipo de fermentação o biosurfactante diluído no meio de cultura vai sendo emulsificado de acordo com a injeção de ar durante o curso da fermentação, e coletado através da saída de ar do fermentador, por isso a tensão superficial do meio de cultura de dentro do fermentador tende a aumentar conforme o biosurfactante vai sendo emulsificado e coletado para fora deste, figuras 57 e 58. Conforme observamos na tabela 54, nas primeiras 24h de fermentação para a linhagem LB-262, havia no meio de dentro do fermentador uma quantidade de biosurfactante capaz de abaixar a tensão superficial do meio de 52,31mN/m para 29,35mN/m porém, a partir daí a tensão superficial subiu para valores médios de 42,35mN/m, mostrando que quase todo biosurfactante já havia sido coletado através da espuma do fermentador. Nas tabelas 54 a 56, que retrata o curso da fermentação das linhagens LB-1993A e 1993B, ocorreu o mesmo comportamento, exceto que no caso da linhagem LB-1993A, a tensão superficial se manteve baixa, em torno de

31,60mN/m apenas enquanto a espuma ainda não tinha sido forçada para fora do fermentador, pois nas primeiras 24h de fermentação a tensão do meio já se encontrava alta, em torno de 43mN/m.

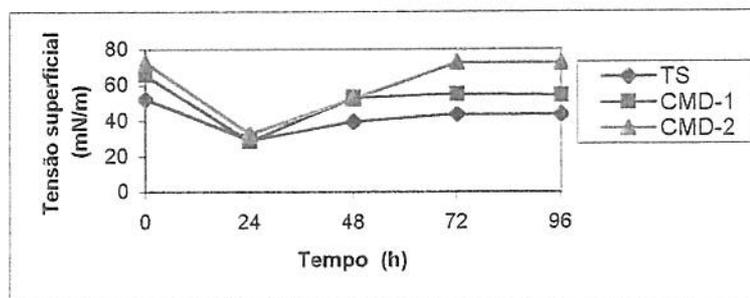


FIGURA 54: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal pela linhagem de *B. subtilis* LB-262 – Ensaio em fermentador de bancada

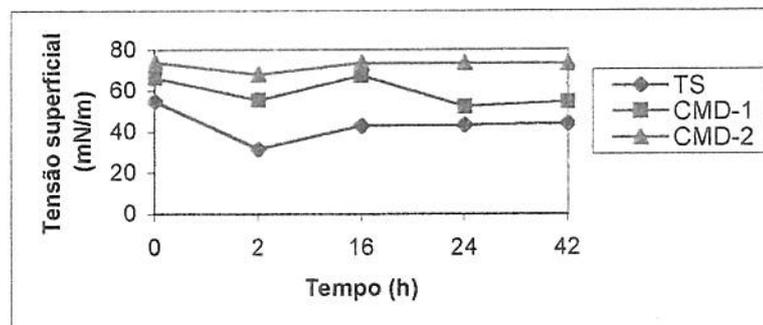


FIGURA 55: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993A – Ensaio em fermentador de bancada

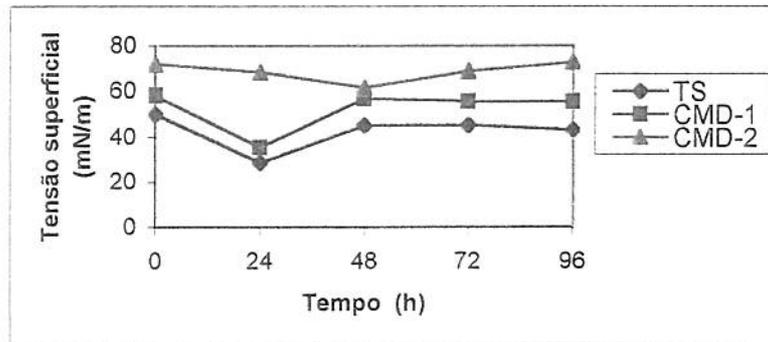


FIGURA 56: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993B – Ensaio em fermentador de bancada

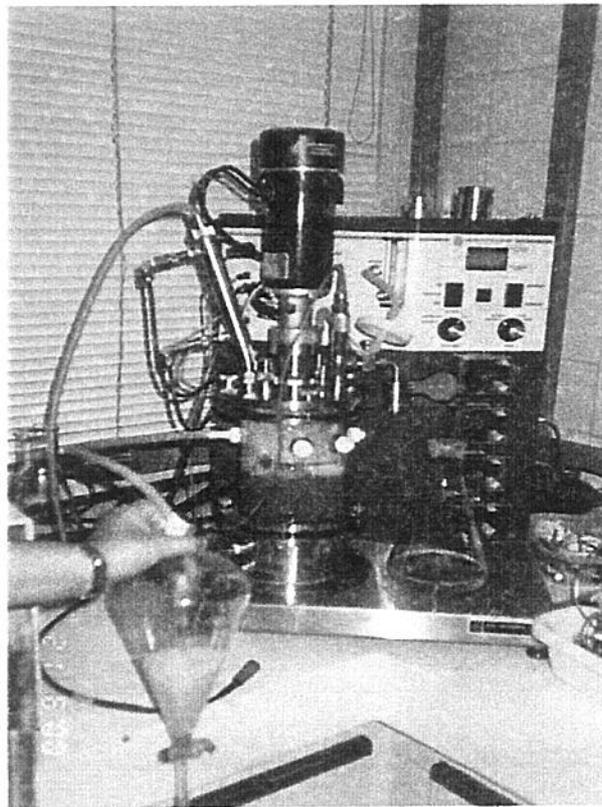


FIGURA 57: Fermentador de bancada Bioflo III com 2,5L de capacidade utilizado na produção de surfactina (coleta da espuma produzida)



FIGURA 58: Espuma obtida durante o cultivo de *B. subtilis* LB-262 em Fermentador de bancada Bioflo III com 2,5L de capacidade

4.5.3 Propriedades do biosurfactante produzido pelas linhagens de *B.subtilis* em fermentador de bancada

A coleta da espuma através de uma saída lateral acoplada ao fermentador, foi fundamental em fermentações cujo objetivo é a produção de biosurfactantes por linhagens de *B. subtilis* pois a injeção de 0.5vvm de ar no fermentador, provocou a emulsificação do biosurfactante dissolvido no meio de cultura e sua consequente expulsão do fermentador. Através de análises de tensão superficial da espuma coletada em cada uma das fermentações realizadas, observamos que a esta possuía baixos valores de tensão superficial e alta capacidade de abaixar a tensão superficial da água. Isso não ocorria mais com o meio de dentro do fermentador, conforme podemos observar os resultados da tabela 49. É importante considerar que uma maior ou menor quantidade de espuma produzida não implica numa maior produção de biosurfactante, mas sim em propriedades diversas do biosurfactante produzido por determinada linhagem, que quando em contato com o ar injetado tem a capacidade de formar espumas mais estáveis, cuja

característica estaria associada a estrutura da cadeia lipídica do biosurfactante produzido. (RAZAFINDRALAMBO *et alii*, 1998)

Um exemplo claro disso ocorreu com a linhagem de *B. subtilis* LB-1993A, que apresentou um metabolismo de produção de biosurfactante mais acelerado em relação às outras linhagens, pois uma quantidade extremamente grande de espuma foi formada, apesar da tensão superficial da espuma ser maior se comparada com a tensão superficial das espumas produzida pelas linhagens LB-262 e LB-1993B. A linhagem LB-1993B apresentou pequena quantidade de espuma produzida, dificultando inclusive a coleta através da saída de exaustão de ar, no entanto a tensão superficial da espuma se mostrou incrivelmente baixa, com valor menor que 25mN/m. A fermentação da linhagem LB-262 apresentou quantidades médias de formação de espuma em relação às linhagens LB-1993A e LB-1993B. É importante evidenciar que a produção de espuma durante a fermentação para a produção de biosurfactante por linhagens de *B. subtilis* não está relacionada com a formação de espuma do meio de cultura que ocorre em certos tipos de fermentação, não requerendo a adição de nenhum tipo de antiespumante, pois através de análises comprovadas de tensão superficial, comprovamos que todo biosurfactante produzido necessita ser coletado na forma de espuma, sendo que a vantagem é que o biosurfactante se expulso sem meio de cultura, sai do fermentador mais puro do que quando era extraído de frascos agitados (CARRERA *et alii*, 1993a; CARRERA *et alii*, 1993b). Cooper *et alii* (1981) estudaram a extração da surfactina, biosurfactante produzido pela linhagem de *B. subtilis* ATCC 21332, através da coleta e fracionamento da espuma coletada através da saída do ar de exaustão.

TABELA 49: Propriedades do biosurfactante produzido pelas linhagens de *Bacillus subtilis* em fermentador de bancada através da coleta da espuma produzida

Linhagem de <i>B.subtilis</i>	TS (mN/m)	CMD ⁻¹ (mN/m)	CMD ⁻² (mN/m)
LB-262	26,01	28,71	29,75
LB-1993A	28,12	32,42	44,93
LB-1993B	24,75	27,56	29,96

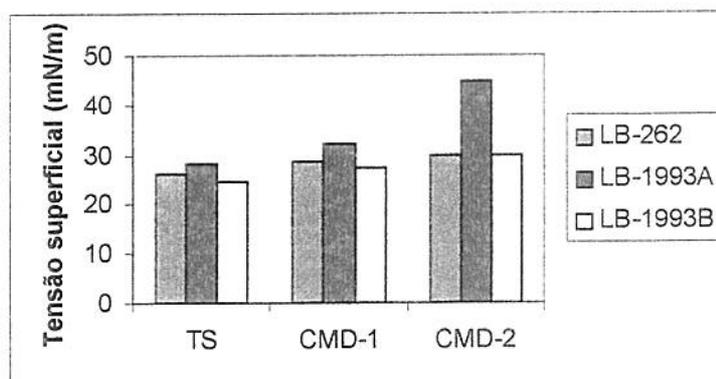


FIGURA 59: Propriedades do biosurfactante produzido pelas linhagens de *Bacillus subtilis* em fermentador de bancada através da coleta da espuma produzida

4.5.4 Cálculo do coeficiente de transferência de oxigênio (KLa), durante a fermentação pelas linhagens de *B.subtilis* produtoras de biosurfactante em meio basal utilizando fermentador piloto

O coeficiente de transferência de oxigênio expressa a necessidade das células em fazer com que o oxigênio dissolvido no meio de cultura entre por difusão através da membrana celular suprindo assim suas necessidades metabólicas.

Conforme podemos observar as figuras 60,61 e 62, os baixos valores de KLa obtidos, após 24h de fermentação, pelo método “gassing out” se devem ao fato de após este intervalos haver o início do acúmulo de espuma no fermentador, o que prejudica sensivelmente a transferência de oxigênio do meio de cultura para as células. Este comportamento foi semelhante para as três linhagens estudadas, conforme podemos observar as figuras 60 a 62. Hbid *et alii* (1996) estudaram o cálculo de KLa durante a fermentação de linhagens de *B.subtilis* pelo método “gassing out”, e a influência da adição de n-decano no KLa.

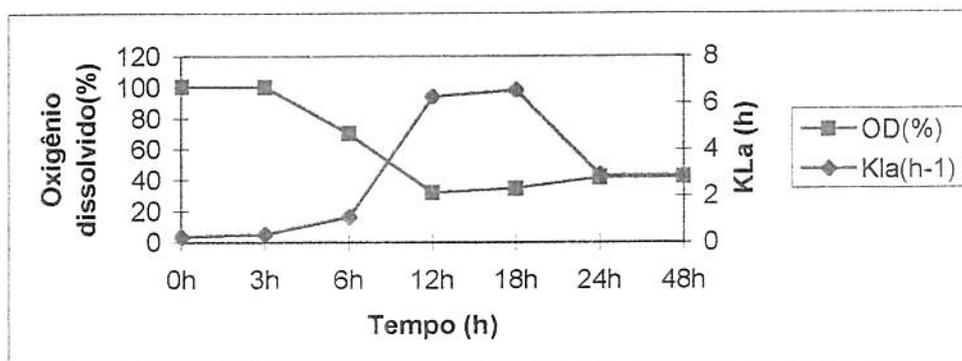


FIGURA 60: Consumo de oxigênio da linhagem de *B. subtilis* LB-262 durante a produção de biosurfactante em fermentador de bancada

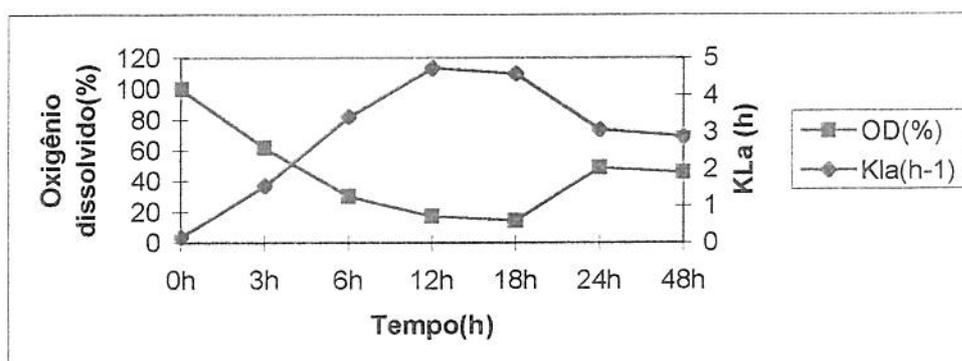


FIGURA 61: Consumo de oxigênio da linhagem de *B. subtilis* LB-1993A durante a produção de biosurfactante em fermentador de bancada

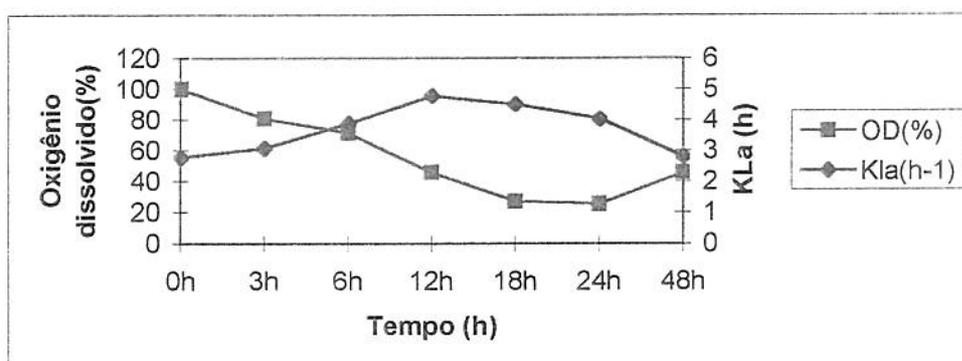


FIGURA 62: Consumo de oxigênio da linhagem de *B. subtilis* LB-1993B durante a produção de biosurfactante em fermentador de bancada

4.6 Produção de surfactina em Fermentador Piloto

4.6.1 Efeito do tempo de incubação na produção de biosurfactante em meio basal utilizando fermentador piloto

Para a produção de surfactina em fermentador piloto foram preparados dois inóculos conforme metodologia descrita em ítem 3.7.2.1.

A produção de biosurfactante em fermentador piloto, conforme Figura 66, diferiu em um dos aspectos da produção em fermentador de bancada, Figura 57, pelo fato de em fermentador de bancada, ser possível a conexão de uma saída lateral ao fermentador, facilitando a coleta da espuma, uma vez que a produção de biosurfactante por linhagens de *B.subtilis*, a introdução de ar provoca a emulsificação do biosurfactante diluído no meio, e sua expulsão na forma de espuma através do dispositivo de exaustão de ar, o que não foi possível ser feito neste fermentador de maior escala, tornando mais difícil a coleta da espuma isenta de meio de cultura. A espuma coletada teve a tensão superficial, e a concentração micelar diluídas determinadas, conforme metodologia descrita. Conforme podemos observar os resultados das tabelas 50, 51 e 52, uma significativa produção de biosurfactante foi produzida após 6h de fermentação para a linhagem LB-262.

TABELA 50: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em meio basal utilizando fermentador piloto pela linhagem LB-262

Tempo (h)	Massa Celular (g/L)	Abs (600nm)	Glicose (mg/dL)	TS (mN/m)	OD (%)	pH
0	0	0	30,16	45,30	100,7	6,41
3	0,05	0,0876	28,77	35,80	88,9	6,37
6	0,10	0,2134	23,17	27,43	31	6,33
12	0,62	0,62	18,72	26,54	4,2	5,98
18	1,25	1,25	14,23	29,52	0,3	5,95
24	0,97	0,97	12,28	27,56	0,3	5,94

TABELA 51: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em meio basal utilizando fermentador piloto pela linhagem LB-1993A

Tempo (h)	Massa Celular (g/L)	Abs (600nm)	Glicose (mg/dL)	TS (mN/m)	OD (%)	pH
0	0	0	42,1	42,88	100,2	6,08
4	0,16	0,0586	41,4	43,37	96,7	6,09
8	0,78	0,72	38,56	43,39	38,8	6,09
12	1,1	1,2580	25,05	32,12	44,6	5,80
16h	1,96	1,2478	17,92	30,29	51,7	5,20

TABELA 52: Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactante em meio basal utilizando fermentador piloto pela linhagem LB-1993B

Tempo (h)	Massa Celular (g/L)	Abs (600nm)	Glicose (mg/dL)	TS (mN/m)	OD (%)	pH
0	0	0	31,86	42,22	100	6,25
8	0,03	0,1172	26,58	32,59	82	6,25
16	0,78	0,9823	19,62	32,40	60,5	5,99
24	1,45	2,2619	14,51	36,67	44,2	5,88
32	1,94	2,4959	7,62	43,26	33,4	5,48

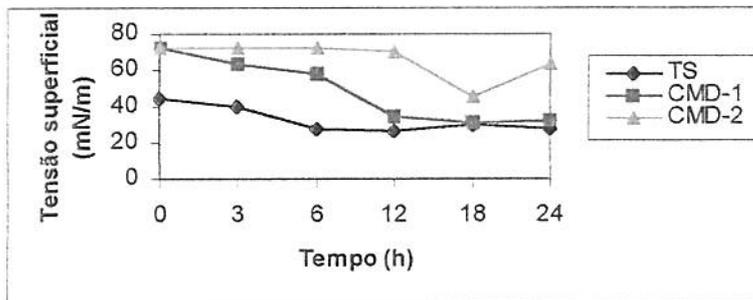


FIGURA 63: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal pela linhagem de *B. subtilis* LB-262- Ensaio fermentador piloto

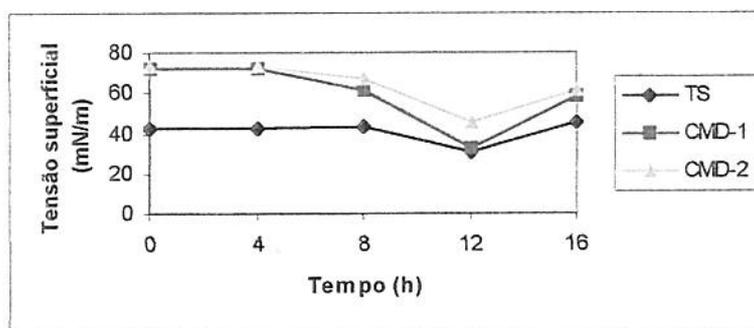


FIGURA 64: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal fermentado pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993A- Ensaio fermentador piloto

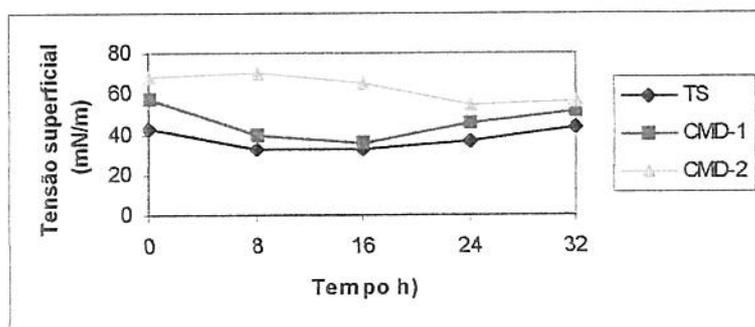


FIGURA 65: Propriedades tensoativas do meio de cultura basal fermentado pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993B- Ensaio fermentador piloto

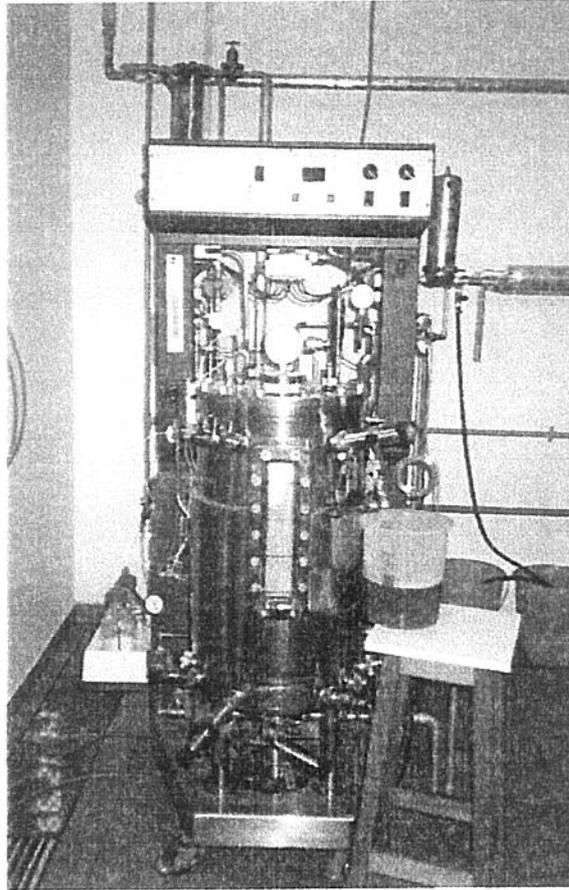


FIGURA 66: Fermentador piloto New Brunswick Scientific Bioflo 8000 MP80 com 80L de capacidade utilizado na produção de surfactina pelo método da coleta de espuma

4.6.2 Consumo e transferência de oxigênio pelas linhagens de *B. subtilis* produtoras de surfactina durante ensaio em fermentador piloto

Em intervalos específicos ao longo do cultivo em fermentador piloto, o K_La foi calculado para cada uma das linhagens produtoras de biosurfactante em diversos intervalos de fermentação. Foi utilizado o método “gassing out dinâmico”(MANZONI & CAVAZONI, 1998), a fim de se determinar o consumo de O_2 microbiano durante o processo fermentativo. Para isso, o fornecimento de ar ao meio foi suspenso e foi medido o decaimento do oxigênio dissolvido no meio de fermentação em intervalos de 3 min durante um período de 10 min. Após este período, o ar foi novamente fornecido e foi medida a elevação do oxigênio dissolvido no meio de cultura. Com os dados obtidos, o valor de K_La para cada uma das linhagens produtoras foi determinado através de métodos gráficos. Conforme podemos observar pelas figuras 67, 68 e 69, uma maior transferência de oxigênio ocorreu após 6h de fermentação para a linhagem LB-262, após 8h para a linhagem LB-1993A e apenas após 16h para a linhagem LB-1993B, cujos intervalos constituem a fase log de crescimento das linhagens quando cultivadas em fermentador piloto. Após estes intervalos específicos para cada linhagem, a diminuição da transferência de oxigênio foi associada ao início do excesso de espuma produzida durante a fermentação, a qual foi responsável pela diminuição da transferência de oxigênio no fermentador.

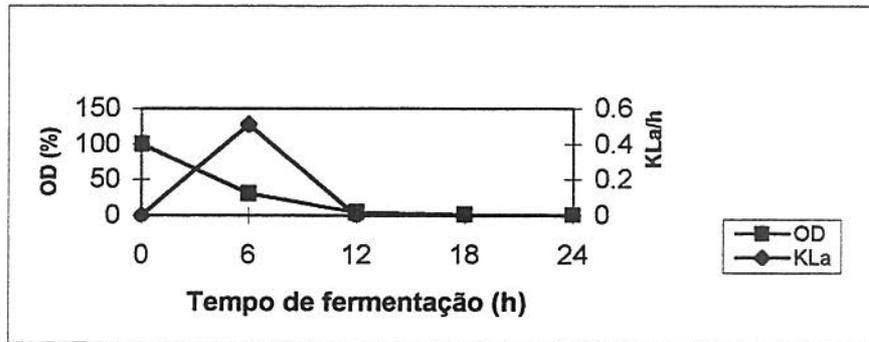


FIGURA 67: Consumo e transferência de oxigênio pela linhagem LB-262

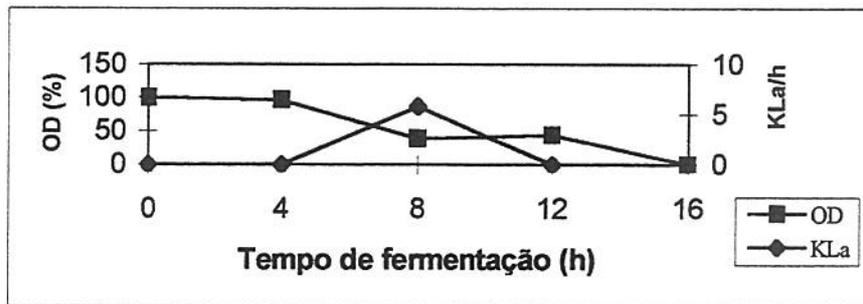


FIGURA 68: Consumo e transferência de oxigênio pela linhagem LB-199 3A

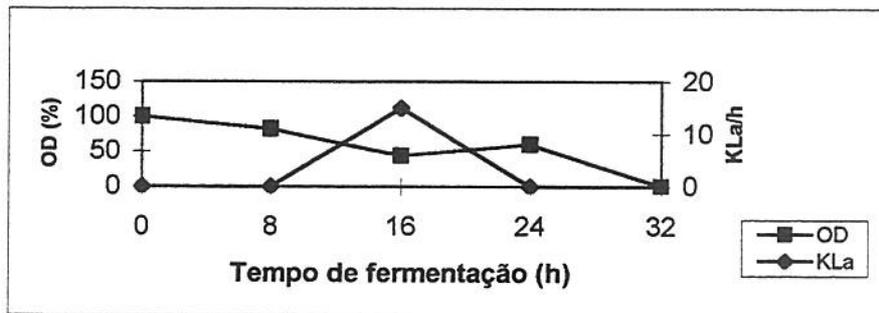


FIGURA 69: Consumo e transferência de oxigênio pela linhagem LB-199 3B

4.6.3 Características da velocidade de formação e expulsão da surfactina na forma de espuma

Conforme podemos observar nas tabelas 50, houve diferenças no tempo de fermentação de cada uma das linhagens produtoras, sendo 24h para a linhagem LB-262, 16h para a linhagem LB-1993A e 32h para a linhagem LB-1993B. Este tempo foi definido de acordo com a quantidade de espuma, biosurfactante emulsificado com meio de cultura, produzido no fermentador. A linhagem de *B. subtilis* LB-1993A foi a linhagem que causou uma maior produção de espuma, a qual de acordo com a tabela 53, teve início a partir de 30 min de fermentação, cuja espuma pode ter sido introduzida ao fermentador pelo próprio inóculo.

A linhagem LB-262 foi a que melhor se adaptou à produção piloto, apesar da expulsão da espuma ocasionar a perda de células viáveis, esta foi feita de forma graduada, começando após 6h de fermentação e atingindo seu limite após 24h quando a fermentação teve que ser interrompida pelo excesso de espuma e ausência de oxigênio disponível e conseqüentemente falta de transferência de oxigênio para o interior das células.

A linhagem LB-199 3B apresentou um metabolismo mais lento em relação às outras linhagens estudadas. A produção de espuma ocorreu apenas após 12h de fermentação, sendo expulsa e coleta apenas após 18h de fermentação. A tensão superficial se mostrou mais alta ao final da fermentação, 32h, e o volume de espuma coletada foi consideravelmente inferior ao volume de espuma coletada durante a fermentação das outras duas linhagens de *B. subtilis* estudadas LB-262 e LB-1993A. Em ambos os casos, foi se dado o final da fermentação quando não havia mais oxigênio disponível e quando a espuma formada foi excessiva, dificultando sua coleta a atingindo os sensores de proteção, os quais quando atingidos desligavam o fermentador.

O aumento de escala para a produção da surfactina exige um sistema especial que possibilite sua coleta na forma de espuma. O ideal seria que houvesse um depósito para a espuma em um tanque para decantação das células associadas, o retorno destas ao fermentador, e a concentração da espuma isenta de células.

No entanto, fermentadores piloto, com capacidade acima de 15L, dificultam a expulsão da espuma contendo surfactina, e quando esta atinge os sensores existentes no vaso do fermentador, faz com que este, por sistema de segurança pare de operar suspendendo a agitação e a injeção de ar para dentro do fermentador. Portanto, a produção de surfactina em escalas maiores, apesar de promissora, exige o desenvolvimento de um sistema otimizado, que permite obter a surfactina em grandes quantidades e com grau de pureza adequado (CARRERA *et alii*, 1993a).

TABELA 53: Formação de espuma e expulsão da surfactina na forma de espuma produzida por linhagens de *B. subtilis* em fermentador piloto

LINHAGEM	<i>B. subtilis</i> LB-262	<i>B. subtilis</i> LB199-3A	<i>B. subtilis</i> LB199-3B
TS(mN/m) espuma	25,56	30,18	43,26
Início da Formação de Espuma	6h	0,5h	12h
Expulsão da espuma	6h	1h	18h

4.6.4 Aumento de escala para a produção de surfactina

Em função das dificuldades enfrentadas no aumento de escala para a produção de surfactina devido a mecanismos que facilitassem a constante coleta da espuma e a separação das células que poderiam ter sido expulsas juntamente com o meio de cultura do fermentador, propusemos uma linha de produção para a coleta constante da espuma, a centrifugação das células nesta presente e o retorno do meio de cultura e células ao fermentador. Conforme podemos observar a

Figura 70, a espuma coletada cairia num tanque de formato cônico, similar a um funil de separação, onde o meio de cultura remanescente, seria bombeado de volta ao fermentador e a espuma seria processada de forma contínua até sua completa liofilização, onde obtemos a surfactina com 99% de pureza. Reisman (1988), propôs um processo integrado de produção contínua de biosurfactante, onde as células expulsas seriam retornadas ao fermentador, sem perdas, através de um processo de filtração. Mulligan & Gibbs (1990) propuseram um esquema para a produção de surfactina em escala industrial onde a espuma seria coletada e as células nela presentes retornariam ao fermentador, conforme esquema proposto nesta dissertação, no entanto, os autores citados não mencionam o completo tratamento da espuma coletada quanto à remoção das células antes desta sofre o processo de ultrafiltração, onde a presença de células entupiria a membrana e contaminaria a surfactina pura. Outro ponto importante proposto neste fluxograma é a necessidade da adição de 2% de água destilada ao volume de espuma coletada uma vez que a espuma coletada deve ser quebrada antes de ser concentrada e antes da remoção das células, sem o qual o processo se tornaria bastante problemático e demorado (CARRERA *et alii*, 1993b).

A construção do fluxograma proposto nesta dissertação, foi baseado na literatura, mas principalmente em experiências e testes realizados nesta dissertação, cujo experimentos realizados em escala piloto foram de extrema importância como um passo para uma possível produção industrial.

Linha de Produção da Surfactina - Escala Piloto

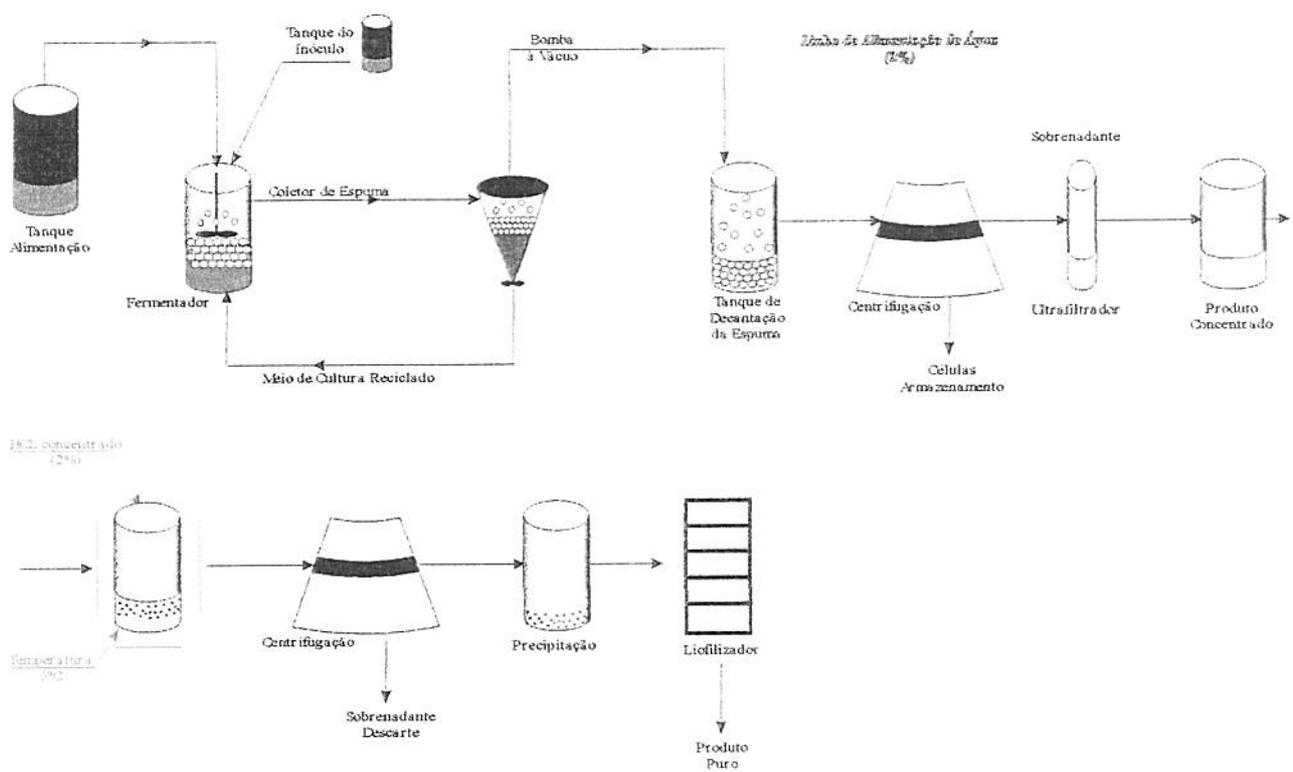


FIGURA 70: Linha completa da produção da surfactina em escala piloto pelo método da coleta da espuma

O cálculo da concentração micelar crítica de um determinado biosurfactante revela qual a quantidade mínima de biosurfactante necessária para um abaixamento máximo de tensão superficial, sendo que quantidades inferiores às da CMC provocariam o início do aumento progressivo da tensão superficial do meio.

O cálculo da CMC é feito traçando-se um gráfico da TS x log diluição do biosurfactante na solução. É importante ressaltar que a CMC determina a concentração mínima necessária de biosurfactante em solução para que ocorra um abaixamento máximo de tensão superficial, onde menores concentrações adicionadas representariam um fator econômico. De acordo com Kosaric *et alii* (1990) acredita-se que a CMC da surfactina em solução seria em média 20 mg/L, onde o CMC^{-1} de 50, representaria a quantidades de vezes que o meio de cultura pode ser diluído antes que se atinja a concentração micelar crítica. Mulligan & Gibbs (1990) citaram ser possível encontrar uma CMC do meio de cultura fermentador de 1 a 2000 mg/L, onde um menor valor encontrado, maior foi a eficiência da fermentação. Cooper & Paddock (1983) citaram ser a CMC da surfactina pura, em torno de 11mg/L. A adição desta quantidade de surfactina em água representaria um máximo abaixamento de tensão superficial.

Conforme podemos observar pelos valores das tabelas 54 a 58, a linhagem LB-262 apresentou valores de CMC mais baixos quando comparados com os obtidos para as outras linhagens estudadas LB-1993A e LB-1993B. A produção em agitador rotativo foi a que apresentou um menor valor de CMC, e conseqüentemente uma maior produção de biosurfactante. Já a linhagem LB-1993A apresentou o mesmo rendimento quando cultivada em agitador rotativo e em fermentador de bancada, diminuindo seu rendimento apenas fermentada em fermentador piloto, pelo excesso de espuma ter prejudicado o curso da fermentação.

A linhagem LB-1993B apresentou durante todo estudo fermentativo, um metabolismo mais lento que as demais, além de baixa produção de espuma, isto devido a um pigmento preto que a linhagem excreta durante a fermentação e o qual é índice de seu bom crescimento.

Quanto à produção do biosurfactante em maniveira, conforme podemos observar pelos dados da tabela 58, foram encontrados valores de CMC abaixo dos valores encontrados no meio basal nos três métodos de fermentação para todas as linhagens estudadas, mostrando ser a maniveira um excelente substrato para a produção de biosurfactante.

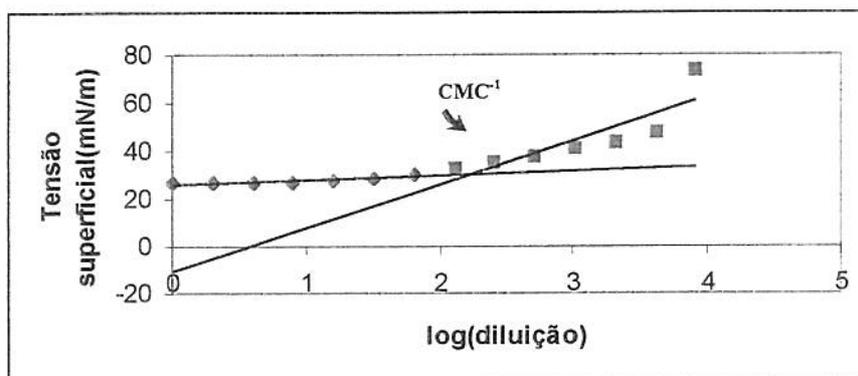


FIGURA 71: Gráfico do cálculo da CMC, onde o ponto de cruzamento entre as duas linhas determina o valor da CMC, onde $CMC^{-1} = 1/CMC$

TABELA 54: Concentração micelar crítica do biosurfactante produzido em meio basal por *B. subtilis* LB-262

Diluição	Log(dil.)	FRASCOS AGITADOS	FERMENTADOR BANCADA	FERMENTADOR PILOTO
0	0	26,18	26,17	25,63
2	0,3011	26,67	27,08	26,04
4	0,602	27,53	27,79	27,15
8	0,9031	28,32	28,72	27,47
16	1,204	29,93	30,42	27,78
32	1,505	31,56	34,14	29,72
64	1,808	32,43	38,72	38,60
128	2,107	36,83	46,42	42,18
256	2,408	41,48	62,56	56,72
512	2,709	48,21	70,75	61,52
1024	3,010	60,12		
2048	3,311	73,60		

TABELA 55: Concentração micelar crítica do biosurfactante produzido em meio basal por *B. subtilis* 199-3A

Diluição	Log(dil.)	FRASCOS AGITADOS	FERMENTADOR BANCADA	FERMENTADOR PILOTO
0	0	29,87	29,07	28,46
2	0,3011	31,12	30,97	29,07
4	0,602	32,21	30,65	29,59
8	0,9031	34,72	33,66	31,80
16	1,204	38,39	34,88	41,94
32	1,505	42,19	40,69	53,60
64	1,808	54,11	43,77	68,70
128	2,107	62,47	44,35	73,40
256	2,408	73,19	49,55	
512	2,709		48,97	
1024	3,010		51,25	
2048	3,311		55,82	

TABELA 56: Concentração micelar crítica do biosurfactante produzido em meio basal por *B. subtilis* LB-1993B

Diluição	Log (Dil)	FRASCOS AGITADOS	FERMENTADOR BANCADA	FERMENTADOR PILOTO
0	0	25,74	26,02	36
2	0,3011	25,83	25,91	36,5
4	0,602	26,83	26,88	38,5
8	0,9031	27,55	27,77	43,5
16	1,204	28,77	31,08	44,2
32	1,505	32,04	35,05	45,1
64	1,808	34,57	38,24	47,8
128	2,107	37,99	46,58	49,2
256	2,408	42,97	58,24	65,1
512	2,709	45,10	61,37	66,2
1024	3,010	52,17	71,02	72,5
2048	3,311	64,18		
4096	3,6123	71,23		
8192	3,9133	72,1		
16384	4,214	73,06		

TABELA 57: Concentração micelar crítica (CMC) do biosurfactante produzido com manipueira pelas linhagens de *B. subtilis* LB262, LB-1993A e LB-1993B

Diluição	Log(dil)	<i>B. subtilis</i> LB-262	<i>B. subtilis</i> LB-1993A	<i>B. subtilis</i> LB-1993B
0	0	26,56	29,87	27,34
2	0,3011	27,12	32,53	27,15
4	0,602	28,54	33,27	27,38
8	0,9031	30,21	36,35	27,48
16	1,204	32,16	39,6	28,08
32	1,505	35,32	43,32	29,29
64	1,808	37,14	50,86	31,75
128	2,107	40,89	68,32	34,47
256	2,408	43,31	74,02	36,94
512	2,709	47,24		41,04
1024	3,010	73,16		45,44
2048	3,311			51,04
4096	3,6123			72,79

TABELA 58: Cálculo da concentração micelar crítica da surfactina produzida em meio basal (diferentes processos de produção) e em manipueira (em agitador rotativo)

CMC(mg/L)	<i>B. subtilis</i> LB-262	<i>B. subtilis</i> LB-1993A	<i>B. subtilis</i> LB-1993B
FRASCOS AGITADOS	7,99	61,39	26,25
FERM 2L	31,3	61,38	62,36
FERM 30L	30,62	129,87	371,74
manipueira	5,92	35,63	17,50

4.8 Análise quantitativa da surfactina produzida por HPLC

A surfactina produzida pelas linhagens de *B. subtilis*, LB-262, LB-1993A e LB-1993B nos diferentes tipos de fermentação estudadas foi quantificada por HPLC.

O meio de cultura centrifugado, no caso da produção em agitador rotativo, e a espuma, isenta de células, no caso da produção em fermentadores de 2L e 80L de capacidade, foi filtrado em millex 0,45 μ m, e 20 μ L foram injetados no cromatógrafo líquido conforme a metodologia do item 3.12. Neste experimento a Surfactina comercial produzida pela Sigma (98% de pureza, produzida por linhagens de *B. subtilis*), foi utilizada como padrão. Soluções de surfactina em fase móvel, com concentrações conhecidas foram injetadas no cromatógrafo e suas áreas plotadas em um gráfico, com a finalidade de se calcular a concentração de surfactina presente nas amostras analisadas.

Conforme podemos observar através do cromatograma obtido para o padrão, figuras 72 a 75, a surfactina é composta por 6 picos significativos com tempos de retenção 2,997 min, 3,684min, 4,379 min, 6,241 min, 7,537 min e 8,438 min. Quanto às amostras contendo a surfactina produzida pelas linhagens

Conforme podemos observar através do cromatograma obtido para o padrão, figuras 72 a 75, a surfactina é composta por 6 picos significativos com tempos de retenção 2,997 min, 3,684min, 4,379 min, 6,241 min, 7,537 min e 8,438 min. Quanto às amostras contendo a surfactina produzida pelas linhagens estudadas, podemos observar as tabelas 59, 60 e 61 e as figura 76 a 78, que a surfactina produzida pela linhagem LB-262 foi a que mais se aproximou com do perfil da surfactina padrão. Algumas amostras apresentaram ausência de um ou mais picos, pela pequena quantidade deste isômero, e portanto não foram detectadas pelo cromatógrafo. Isso ocorreu principalmente com as amostras obtidas pela fermentação da linhagem LB-1993B, tabelas 62, 63 e 64 e figuras 82 a 84.

Wei & Chu (1998) classificaram a quantificação da surfactina por HPLC como sendo complexa, devido ao número de isômeros presentes no cromatograma. Ao analisar as amostras, os autores escolheram os picos com os tempos de retenção mais próximos aos dos picos obtidos pela análise cromatográfica do padrão (Surfactina Sigma). A soma das áreas dos picos mais significativos, foi utilizada para a quantificação da surfactina. Outro ponto importante relatado pelos autores é que houve diferença na quantidade de cada isômero quando comparamos as amostras com o padrão.

Carrera *et alii* (1993a) procederam a quantificação da surfactina produzida por um mutante da linhagem de *B. subtilis* mutante da linhagem de *B. subtilis* ATCC 21332, o qual procedeu da mesma maneira que os autores citados acima. A surfactina foi quantificada como a soma dos picos significativos. Carrera *et alii* (1993a) avaliou a produção de surfactina em frascos agitados com a produção em fermentador através da quantificação da surfactina produzida por HPLC. Os autores comprovaram que a produção de surfactina em frascos agitados foi de 0,04 a 0,05 g/L, e a produção em fermentador pelo método da coleta da espuma permitiu obter uma produção de 1,0-2,0g/L.

No presente trabalho, conforme podemos observar pelos dados da tabela 65, as quantidades de surfactina encontradas para a linhagem LB-262 nos diferentes tipos de fermentação, foram semelhantes às quantidades encontradas por Carrera *et alii* (1993a), onde a maior produção ocorreu através da produção em fermentador piloto. Já as outras linhagens, a maior produção ocorreu em fermentador de bancada, com pequenas diferença nas quantidades produzida, onde a surfactina analisada foi a presente na espuma coletada, e uma vez que as linhagens não tiveram LB-1993A e LB-1993B não tiveram boa reprodutibilidade, a produção em fermentador de bancada e piloto para essas linhagens não foram satisfatórios. A análise da quantidade de surfactina por HPLC nos diferentes métodos de produção de surfactina, acabou avaliando a eficiência do processo de produção, a qual foi obtida apenas para linhagem de *B. subtilis* LB-262, cujo resultados foram satisfatórios e contundentes com a literatura.

TABELA 59: Tempo de retenção dos picos constituintes da surfactina produzida pela linhagem de *B. subtilis* LB-262

PICOS	TEMPO DE RETENÇÃO (min)			
	PADRÃO	FRASCOS AGITADOS	FERM/2L	FERM/80L
1	2,997	2,959	3,207	3,112
2	3,684	3,713	n.d.	3,524
3	4,379	4,409	4,479	4,831
4	6,241	6,299	5,438	5,858
5	7,537	7,661	7,146	n.d.
6	8,438	9,441	n.d.	8,712

TABELA 60: Tempo de retenção dos picos constituintes da surfactina produzida pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993A

TEMPO DE RETENÇÃO (min)				
PICOS	PADRÃO	FRASCOS AGITADOS	FERM/2L	FERM/80L
1	2,997	3,072	3,193	3,223
2	3,684	3,369	3,541	n.d.
3	4,379	4,344	4,787	4,141
4	6,241	5,657	6,263	n.d.
5	7,537	7,049	n.d.	7,503
6	8,438	8,836	n.d.	8,686

TABELA 61: Tempo de retenção dos picos constituintes da surfactina produzida pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993B

TEMPO DE RETENÇÃO (min)				
PICOS	PADRÃO	FRASCOS AGITADOS	FERM/2L	FERM/80L
1	2,997	3,169	n.d.	n.d.
2	3,684	n.d.	3,386	3,524
3	4,379	n.d.	5,128	4,407
4	6,241	5,633	n.d.	5,451
5	7,537	7,259	7,051	7,552
6	8,438	8,834	9,578	8,861

TABELA 62: % de cada pico constituinte da surfactina produzida pela linhagem de *Bacillus subtilis* LB-262

% ISÔMERO				
PICOS	PADRÃO	FRASCOS AGITADOS	FERM/2L	FERM/80L
1	5,22	14,89	4,8645	6,29
2	15,68	6,49	n.d.	20,36
3	12,15	27,44	34,9230	20,64
4	41,45	20,21	54,0694	51,58
5	23,14	29,18	6,1432	n.d.
6	2,37	1,77	n.d.	0,0135

TABELA 63: % de cada pico constituinte da surfactina produzida pela linhagem de *Bacillus subtilis* LB-1993A

% ISÔMERO				
PICOS	PADRÃO	FRASCOS AGITADOS	FERM/2L	FERM/80L
1	5,22	19,99	5,24	5,43
2	15,68	6,82	42,62	n.d.
3	12,15	19,86	12,11	0,4658
4	41,45	43,32	39,12	n.d.
5	23,14	0,01	n.d.	68,21
6	2,37	0,77	n.d.	3,14

TABELA 64: % de cada pico constituinte da surfactina produzida pela linhagem de *Bacillus subtilis* LB-1993B

% ISÔMERO				
PICOS	PADRÃO	FRASCOS AGITADOS	FERM/2L	FERM/80L
1	5,22	26,75	n.d.	n.d.
2	15,68	n.d.	60,24	14,32
3	12,15	n.d.	0,33	12,62
4	41,45	18,33	n.d.	6,07
5	23,14	52,13	6,19	9,09
6	2,37	2,78	4,16	8,02

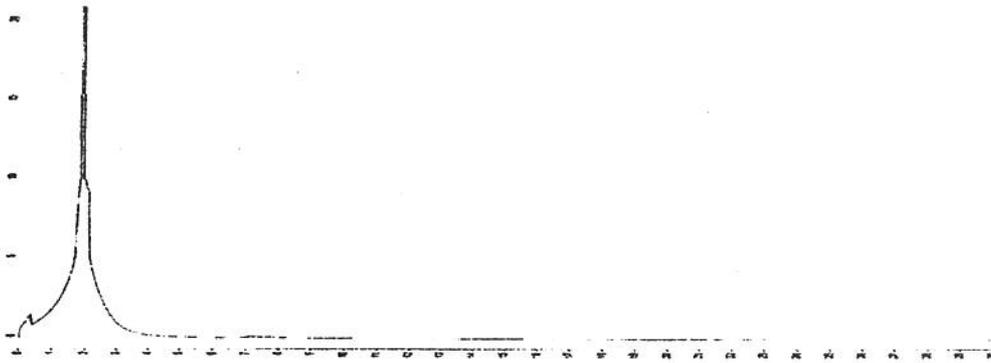


FIGURA 72: Cromatograma da análise por HPLC do meio de cultura antes do processo de fermentação

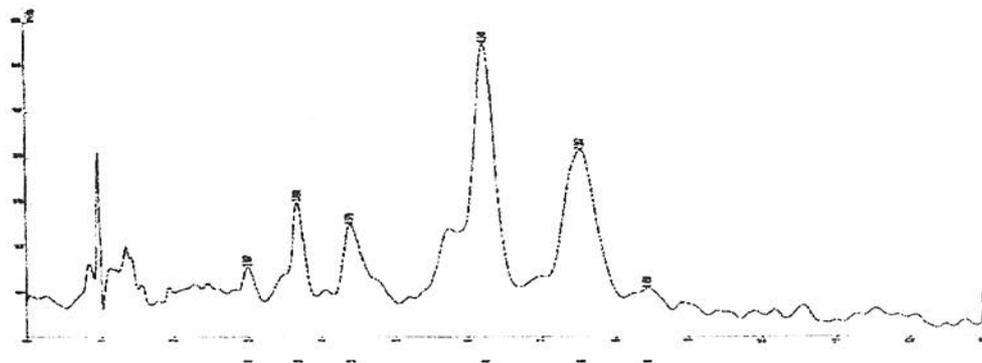


FIGURA 73: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina (Sigma) utilizada como padrão, na concentração de 0,025mg/ml.

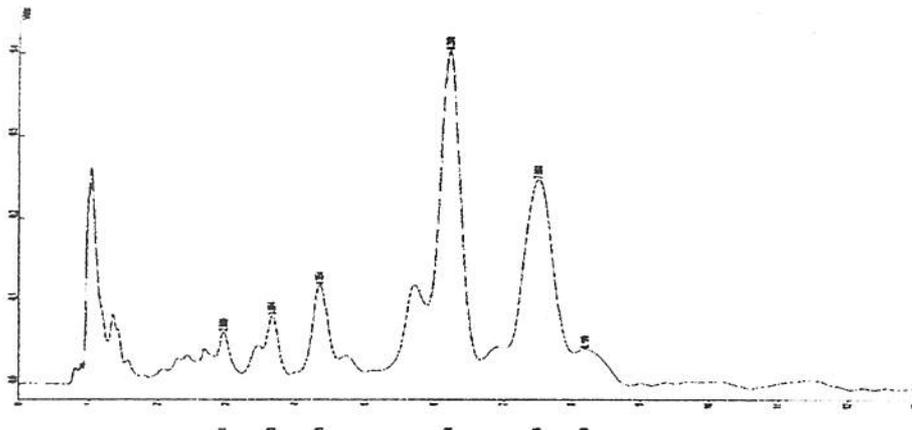


FIGURA 74: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina (Sigma) utilizada como padrão, na concentração de 0,25mg/ml.

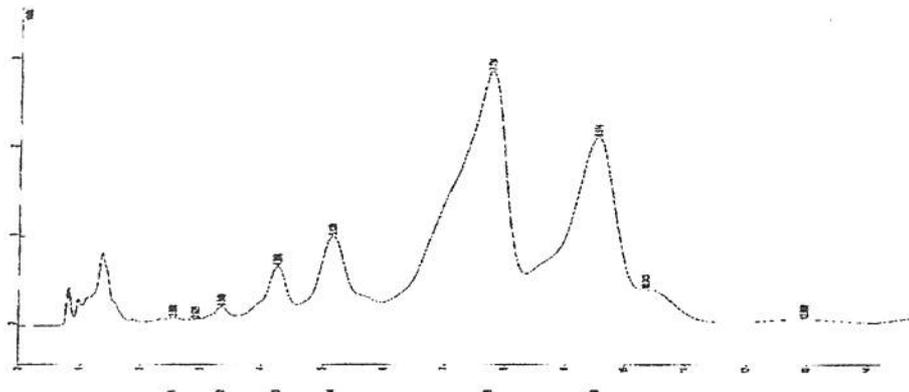


FIGURA 75: Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina (Sigma) utilizada como padrão, na concentração de 2,5mg/ml.

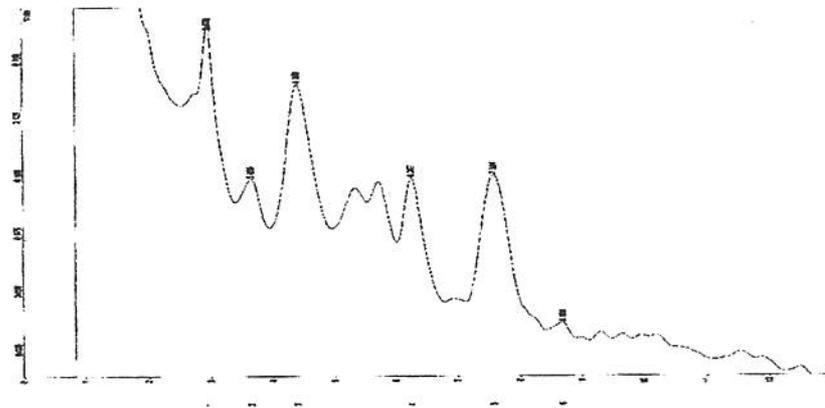


FIGURA 76:Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina produzida em frascos agitados, pela linhagem de *B. subtilis* LB-262 (pico 1: 2,959min; pico 2: 3,713min.; pico 3: 4,409 min; pico 4:6,299 min; pico 5:7,661; min; pico 6: 9,441 min)

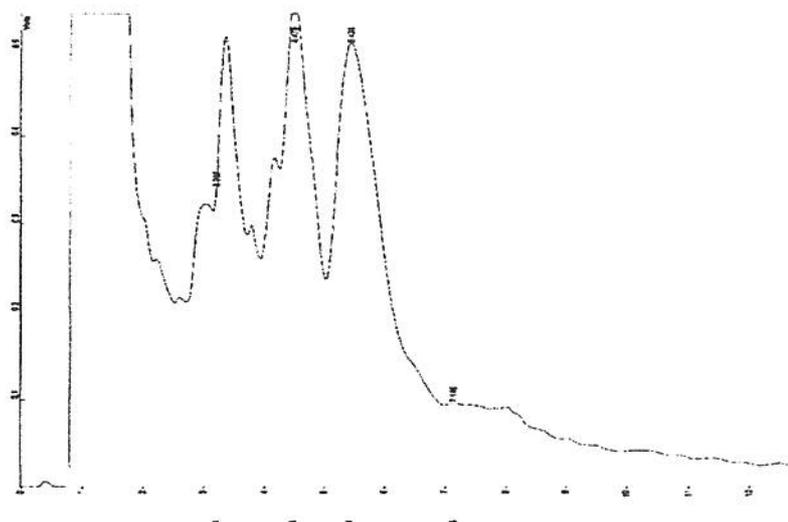


FIGURA 77:Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina produzida em fermentador de bancada de 2L, pela linhagem de *B. subtilis* LB-262(pico 1: 3,207min; pico 2: n.d.; pico 3: 4,479 min; pico 4:5,438 min; pico 5:7,146; min; pico 6:n.d)

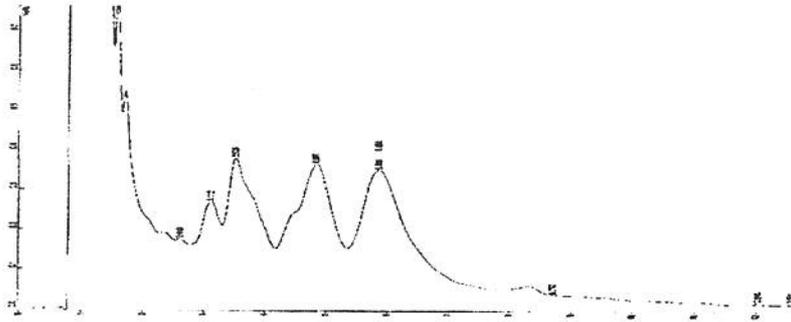


FIGURA 78:Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina produzida em fermentador de piloto de 80L, pela linhagem de *B. subtilis* LB-262 (pico 1: 3,112min; pico 2: 3,524; pico 3: 4,831 min; pico 4:5,858 min; pico 5:n.d.; min; pico 6: 8,712 min)

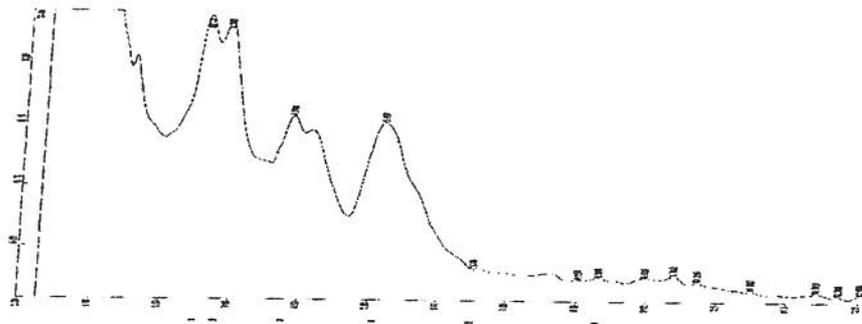


FIGURA 79:Cromatograma da análise por HPLC da Surfactina produzida em frascos agitados, pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993A (pico 1: 3,072min; pico 2: 3,369; pico 3: 4,344 min; pico 4:5,657 min; pico 5:7,049; min; pico 6: 8,836 min)

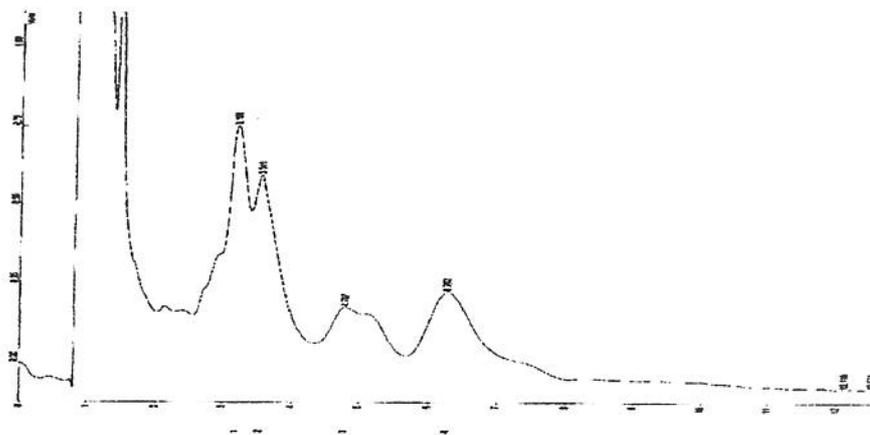


FIGURA 80:Cromatograma por HPLC da Surfactina produzida em fermentador de bancada de 2L, pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993^A (pico 1: 3,193min; pico 2:3,541.; pico 3: 4,787 min; pico 4: 6,263 min; pico 5:n.d.; min; pico 6:n.d.)

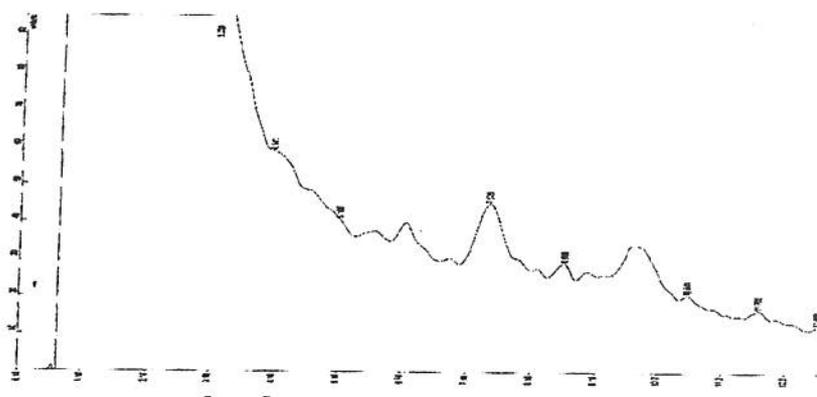


FIGURA 81:Cromatograma por HPLC da Surfactina produzida em fermentador de piloto de 80L, pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993A (pico 1: 3,223min; pico 2: n.d.;; pico 3: 4,141 min; pico 4:n.d.;; pico 5:7,503; min; pico 6: 8,686 min)

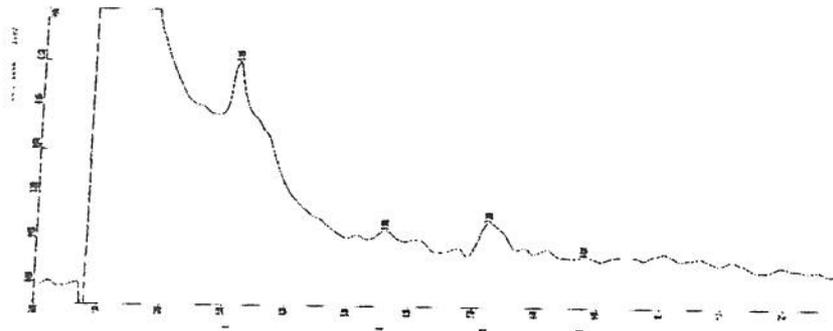


FIGURA 82: Cromatograma por HPLC da Surfactina produzida em frascos agitados, pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993B (pico 1: 3,169min; pico 2: n.d.; pico 3: n.d.; pico 4:5,633 min; pico 5:7,259; min; pico 6: 8,834 min)

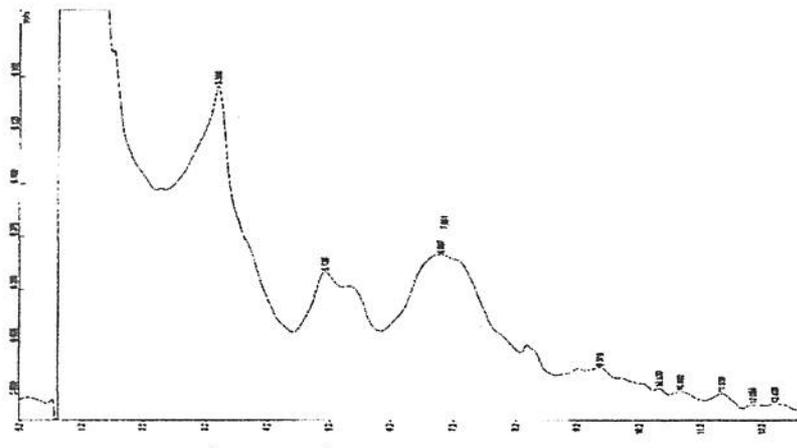


FIGURA 83: Cromatograma por HPLC da Surfactina produzida em fermentador de bancada de 2L, pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993B(pico 1: n.d.; pico 2: 3,386; pico 3: 5,128 min; pico 4:n.d.; pico 5:7,051; min; pico 6:9,578 min)

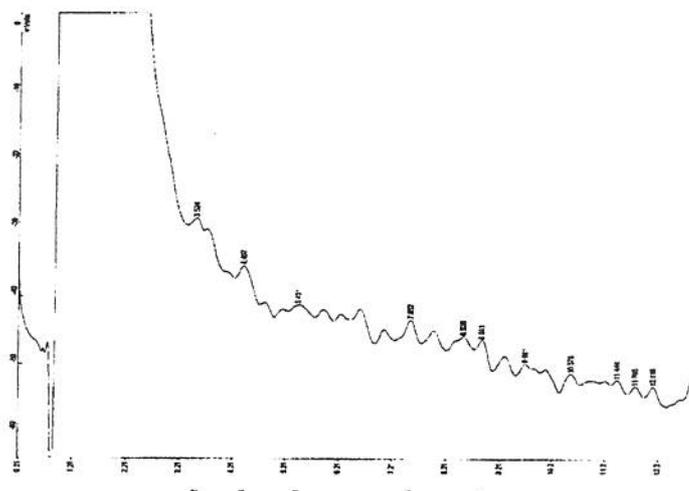


FIGURA 84: Cromatograma por HPLC da Surfactina produzida em fermentador de piloto de 80L, pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993B (pico 1: n.d.; pico 2: 3,524; pico 3: 4,407 min; pico 4:5,451 min; pico 5:7,552; min; pico 6: 8,861 min)

TABELA 65 : Quantidade de surfactina produzida pelas linhagens estudadas em diferentes processos fermentativos

Tipo de fermentação	<i>B. subtilis</i> LB-262 Surfactina (mg/mL)	<i>B. subtilis</i> LB-1993A Surfactina (mg/mL)	<i>B. subtilis</i> LB-1993B Surfactina (mg/mL)
Agitador rotativo	0,131	0,131	0,135
Fermentador de bancada	0,335	0,132	0,138
Fermentador piloto	0,44	0,131	0,131

4.9 Análise da estrutura dos biosurfactantes produzidos por FAB-MS

Este experimento teve por objetivo analisar a estrutura da surfactina produzida pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B pelo método FAB-MS, comparando os resultados das amostras com os da surfactina da Sigma utilizada como padrão.

Conforme podemos observar o espectro de massa obtido para o padrão Sigma com 98% de pureza, figura 85, observamos que os principais picos m/z da surfactina padrão com 98% de pureza, estão na faixa de 1036, o qual constitui o íon molecular, seguido dos picos principais 1022 e 1043,7. Podemos concluir que o peso molecular da surfactina é dado como 1036. Estes resultados são confirmados por Mulligan *et alii* (1989), onde os autores estudaram a estrutura da surfactina produzida pela linhagem de *B. subtilis* ATCC 21332 e por uma linhagem mutante. Os autores observaram que a estrutura da surfactina produzida pelas duas linhagens foram bastante semelhantes, e o íon molecular da surfactina produzida pela linhagem controle foi de 1023, seguido dos picos 1009 e 1036. A linhagem mutante produziu uma surfactina cujo espectro de massa teve um íon molecular de 1036, seguido dos picos 1023 e 1046. Carrera *et alii* (1993a), obtiveram resultados semelhantes aos de Mulligan *et alii* (1989), onde o espectro obtido pela surfactina purificada pelo método da espuma teve como picos principais 1008, 1022,7 e 1036,8. O pico de 1022,7 foi constatado como o responsável pelo peso molecular do biosurfactante produzido.

Neste trabalho analisamos a surfactina purificada produzida pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B, através da metodologia FAB-MS (MULLIGAN *et alii*, 1989; CARRERA *et alii*, 1990). Foi utilizado como matriz, o glicerol ou o 3-para nitrobenzilálcool, conforme a solubilidade das amostras. Quantas às amostras purificadas, estas apresentaram espectros semelhantes ao espectro padrão, e os picos principais confirmaram ser a surfactina o biosurfactante produzido pelas linhagens estudadas.

Conforme podemos observar a figura 86, o biosurfactante produzido pela linhagem LB-262 foi o que teve o espectro de massa mais próximo ao do padrão. Já os biosurfactantes produzidos pelas linhagens LB-1993A e LB-1993B, apresentaram espectros de massa apenas com algumas variações, figura 87 e 88. Até o presente, já foram caracterizadas 11 estruturas diferentes da surfactinas,

sendo elas todas isômeras. Peypoux *et alii* (1994) utilizaram a mesma metodologia deste trabalho elucidou a estrutura de um dos isômeros da surfactina, a [Ala4] surfactina cujo peso molecular determinado foi 1030.

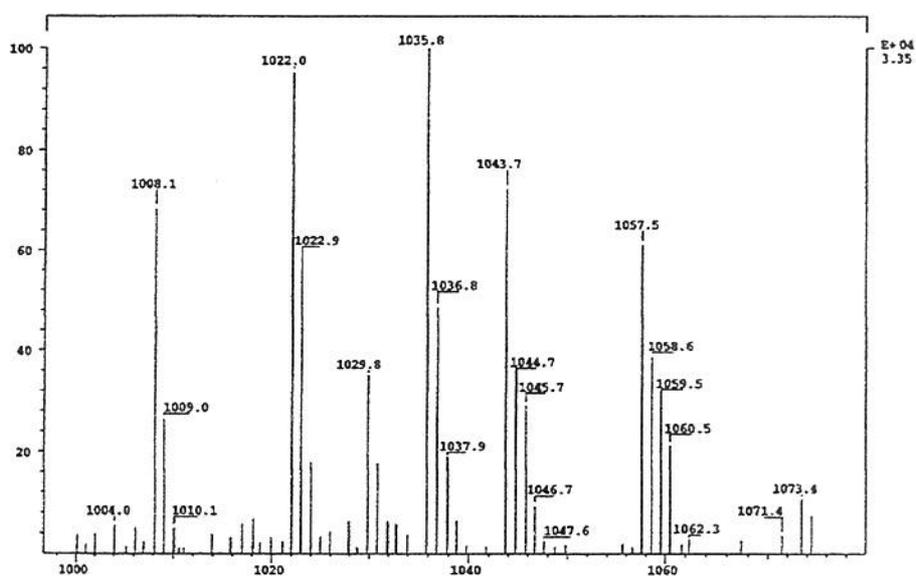


FIGURA 85: Espectro de massa da surfactina padrão Sigma (m/z = 1035,8)

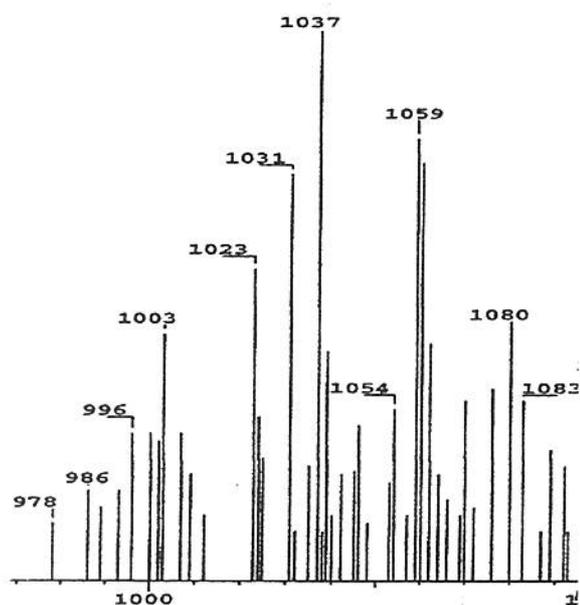


FIGURA 86: Espectro de massa da surfactina purificada produzida pela linhagem de *B. subtilis* LB-262 ($m/z = 1037$)

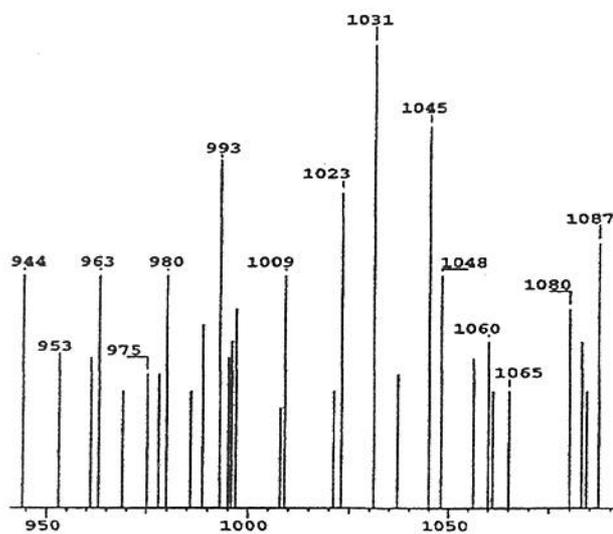


FIGURA 87: Espectro de massa da surfactina purificada produzida pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993A ($m/z = 1031$)

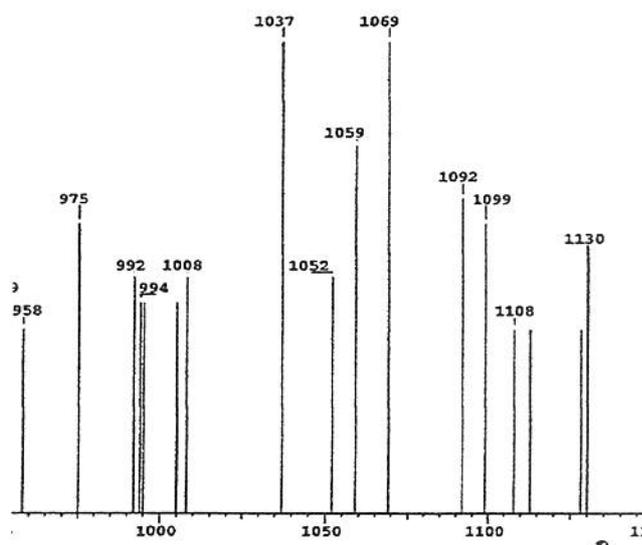


FIGURA 88: Espectro de massa da surfactina purificada produzida pela linhagem de *B. subtilis* LB-1993B ($m/z = 1037$)

4.10 Influência da Surfactina na Produção de α -Amilase por Linhagens de *Bacillus*

4.10.1 Produção de α -amilases por linhagens do gênero *Bacillus*

Este teste teve por objetivo avaliar a capacidade de surfactantes biológicos, no caso a surfactina produzida pelas linhagens estudadas, bem como de surfactantes sintéticos, no caso Tween 20 e Tween 80 em estimular o aumento da produção de enzimas por uma linhagem de *Bacillus* sp., previamente isolada como produtora de α -amilase. Foi adicionado ao meio de cultura, os surfactantes citados e avaliou-se qual a influência destes na excreção da enzima. Dois testes foram realizados, figuras 90 e 91, sendo que no primeiro uma quantidade de 0,033% dos surfactantes foram adicionados no início da fermentação, e também

após 24h de cultivo da linhagem. A seguir foi medida a atividade do extrato enzimático para cada teste. Já no outro teste, três concentrações diferentes de biosurfactantes, 0,033%, 0,33% e 0,66% foram adicionados ao meio de cultura e avaliou-se a influência das diferentes concentrações de surfactante na produção da enzima de α -amilase pela linhagem estudada. Como resultado do primeiro teste, conforme observamos na Figura 89, não houve influência significativa na atividade enzimática quando as surfactinas produzidas pelas linhagens LB-262 e LB-1993A foram adicionadas no início da fermentação, 0h, ou após 24h de fermentação. Já a surfactina produzida pela linhagem LB-1993B, inibiu parcialmente a produção da enzima quando adicionada após 24h de fermentação. Com o surfactante sintético Tween 20, ocorreu o inverso dos resultados obtidos com a surfactina produzida pela linhagem LB-1993B, onde a adição do surfactante no início da fermentação inibiu parcialmente a produção enzimática.

Quanto aos resultados da adição do surfactante sintético Tween 80, este não inibiu a produção da enzima pela linhagem estudada, e ao contrário, houve um pequeno aumento na atividade quando o surfactante foi adicionado no início da fermentação. No segundo teste, resultados significativos quanto ao estímulo no aumento da produção da enzima foram obtidos quando a surfactina produzida pela linhagem LB-262 foi utilizada na concentração de 0,66%. Resultados semelhantes ocorreram com a adição da surfactina produzida pela linhagem LB-1993A. Reese & Maguire (1969) estudaram a influência da adição de 0,1% de Tween 80, como estimulante na produção de enzimas como salicinase, celobiase, α -amilase e β -amilase produzidas por diversas linhagens de fungos, como *Aspergillus luchuensis* QM873, *Aspergillus terreus* QM 72f, *Aspergillus terreus* QM 442, *Basidiomiceto* QM806, *Penicilium brasilianum* QM6947, *P. funiculosum* QM474, *P. ochrochloron* QM477, *P. parvum* QM1878, *P. pusillum* QM 137g e *Trichoderma viride* QM6a. Como resultado os autores observaram

que um aumento significativo da produção da enzima α -amilase ocorreu para as linhagens de *Aspergillus luchuensis* QM873, *Aspergillus terreus* QM72f, *Aspergillus terreus* QM 442, *Basidiomiceto* QM806, *P. ochrochloron* QM477 e *P. pusillum* QM 137g. Quanto ao efeito da adição de Tween 80 nas produção da enzima α -amilase , houve diminuição na produção pelas linhagens *Penicilium brasilianum* QM6947, *P.parvum* QM1878 e pela linhagem *Trichoderma viride* QM6a. Quanto à linhagem *P. funiculosum* QM474, não houve influência na produção da enzima quando adicionou-se Tween 80 ao meio de cultura.

Goes & Sheppard (1999) estudaram a influência da adição de diversas concentrações da surfactina (0,003%, 0,007%, 0,013% e 0,03%), produzida pela linhagem de *B. subtilis* ATCC 21332, comparando com a influência da adição de 0,05% e 0,1% dos surfactantes sintéticos SDS, Tween 20 e Tween 80 na produção da enzima α -amilase produzida pela linhagem de *Bacillus subtilis* ATCC 21556 em fermentação sólida utilizando casca de batata como substrato. Os autores observaram que a maior produção enzimática ocorreu quando a surfactina foi adicionada na concentração de 0,013%. Quanto aos surfactantes sintéticos, o surfactante Tween 80 na concentração de 0,1% proporcionou uma maior produção enzimática em relação aos outros dois surfactantes sintéticos Tween 20 e SDS, no entanto a produção enzimática utilizando 0,013% de surfactina foi duas vezes maior em relação aos surfactantes sintéticos.

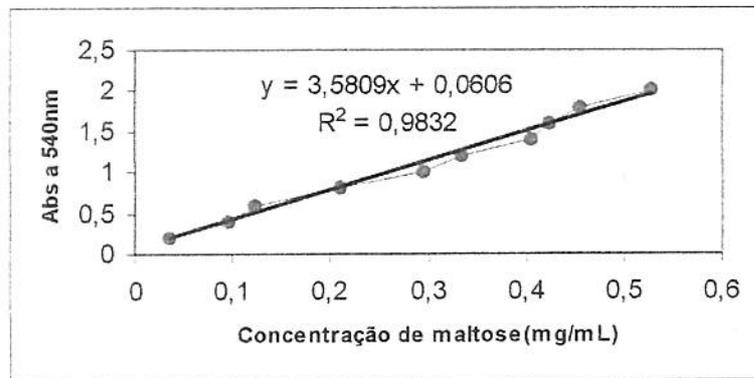


FIGURA 89: Curva padrão da maltose em relação a absorvância a 540nm para o cálculo da atividade enzimática (onde a atividade enzimática é expressa em miligramas de maltose liberada em 3min por mL de extrato enzimático)

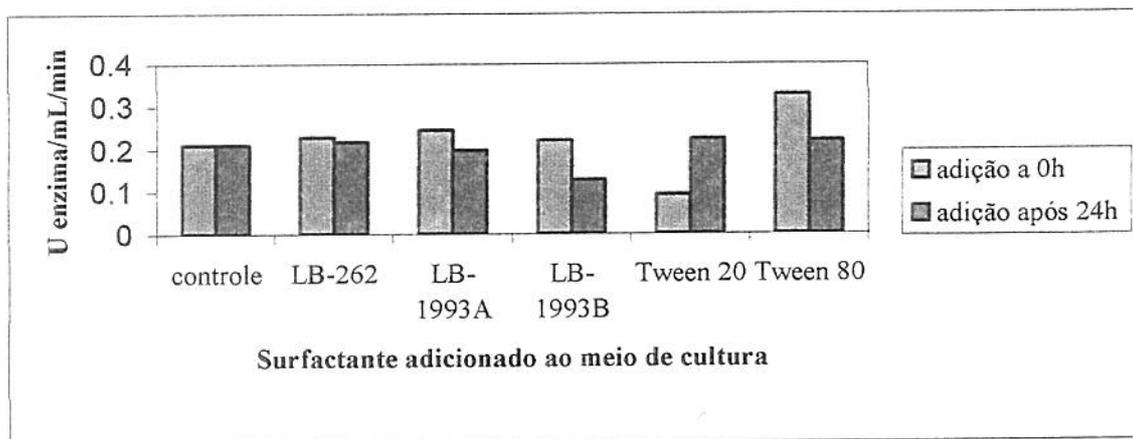


FIGURA 90: Influência da adição de surfactante biológico (surfactina produzida pelas linhagens LB-262, LB-1993A e LB-1993B) e sintético (Tween 20 e Tween 80) na concentração de 0,033% em diferentes tempos de fermentação, 0 e 24h.

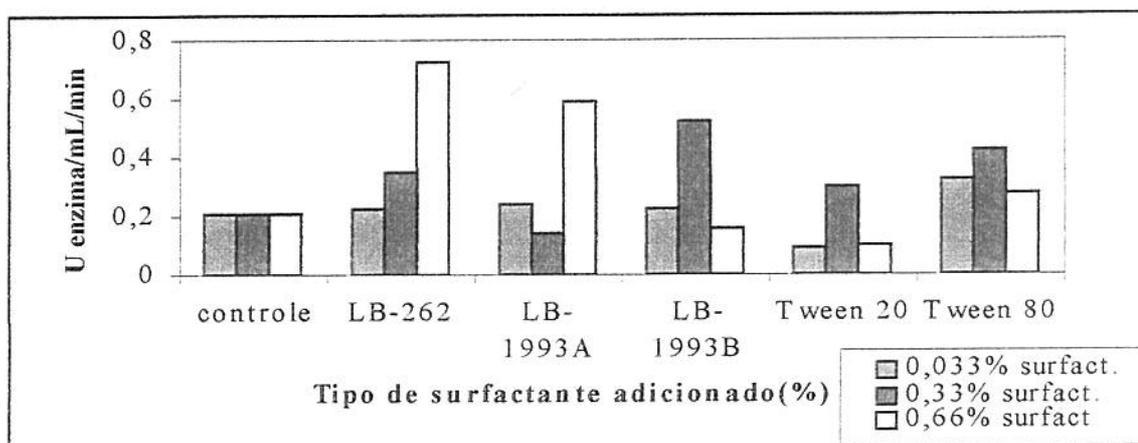


FIGURA 91: Influência da adição de surfactante biológico (surfactina produzida pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B) e sintético (Tween 20 e Tween 80) em ao meio de cultura em diferentes concentrações 0,033%, 0,33% e 0,66% .

4.11 Análise de aminoácidos do biosurfactante bruto produzido pelas linhagens de *B. subtilis* produtoras de biosurfactante

A surfactina é um lipopeptídeo formado por ácidos β -hidroxílicos e de cadeias que variam de 13 a 17 carbonos. Quanto à sua composição proteica, acredita-se que a surfactina é formada por 5 tipos de aminoácidos diferentes, os quais se repetem na estrutura, a qual geralmente possui três resíduos da L-leucina, um de ácido glutâmico, um de valina e um de ácido aspártico, cujas quantidade e posição na cadeia podem variar conforme a linhagem produtora (VATER *et alii*, 1987). No entanto linhagens de *B. subtilis* são capazes de, juntamente com a surfactina, produzir antibióticos durante o processo fermentativo, e suas estruturas podem ter outros aminoácidos além dos presentes nas estruturas da surfactina, como a iturina, a micosubutilina, a bacilomicina L e outros (VATER *et alii*, 1987). Neste experimento, realizamos análises preliminares do biosurfactante bruto produzido para cada uma das linhagens estudadas, em meio basal e manipulada, a fim de comparar a composição em aminoácidos de biosurfactantes das diferentes

linhagens produtoras, e comparando entre elas os resultados entre o meio basal e a manipueira. De acordo com os dados da tabela 63, observamos que além dos aminoácidos que compõe a surfactina (grifados em vermelho), encontramos pequenas quantidades de outros aminoácidos que podem fazer parte de outros compostos produzidos pelas linhagens e que podem ter estrutura semelhante à da surfactina. Na tabela 66 e nos cromatogramas mostrados nas Figuras 92 a 97, observamos que a composição em aminoácidos produzidos em meio basal e manipueira são semelhantes, com pequenas variações conforme podemos observar na tabela 63.

TABELA 66 : Composição em aminoácidos presentes no extrato bruto de biosurfactante produzidos em meio basal e manipueira após fermentação (mg aa/mg proteína)

Aminoácidos	LB-262	LB-1993A	LB-1993B	LB-262	LB-1993A	LB-1993B
Aspártico	14,114	5,916	12,110	13,46	11,28	11,73
Treonina	2,435	1,833	2,556	2,43	4,14	4,11
Serina	3,053	2,406	2,008	3,73	5,61	4,87
Ác.glutâmico	22,473	50,985	15,391	17,49	21,14	19,72
Prolina	0,0	0,859	1,160	2,33	2,67	3,05
Glicina	2,776	2,175	3,282	3,49	5,11	3,78
Alanina	4,022	3,022	3,284	3,46	5,31	4,16
Cistina	0,607	0,667	0,0	0,63	0,81	0,5
Valina	9,408	9,738	10,008	5,94	3,43	3,99
Metionina	0,670	0,894	0,0	0,1	0,37	0,25
Isoleucina	2,336	2,500	3,801	1,73	2,72	3,68
Leucina	26,595	7,193	31,355	32,33	7,34	21,76
Tirosina	3,887	2,160	2,278	2,74	3,42	3,03
Fenilalanina	2,213	1,011	1,316	1,69	3,47	3,42
Lisina	1,138	0,185	1,930	0	2,94	2,72
Amônia	1,500	6,680	7,359	2,24	6,83	3,86
Histidina	2,774	1,777	2,162	3,01	7,35	2,54
Arginina	0,0	0,0	0,0	3,13	5,99	2,78

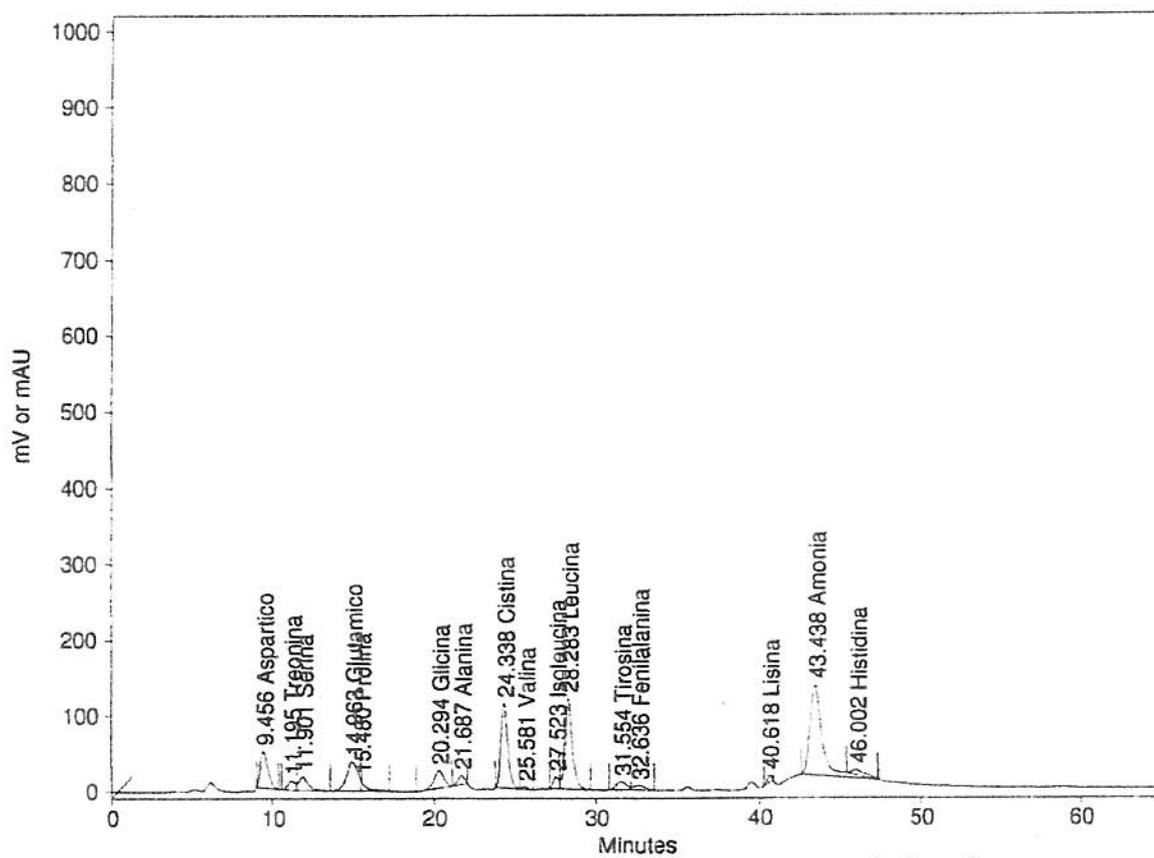


FIGURA 92: Aminograma do biosurfactante produzido em meio basal por *B. subtilis* LB-262

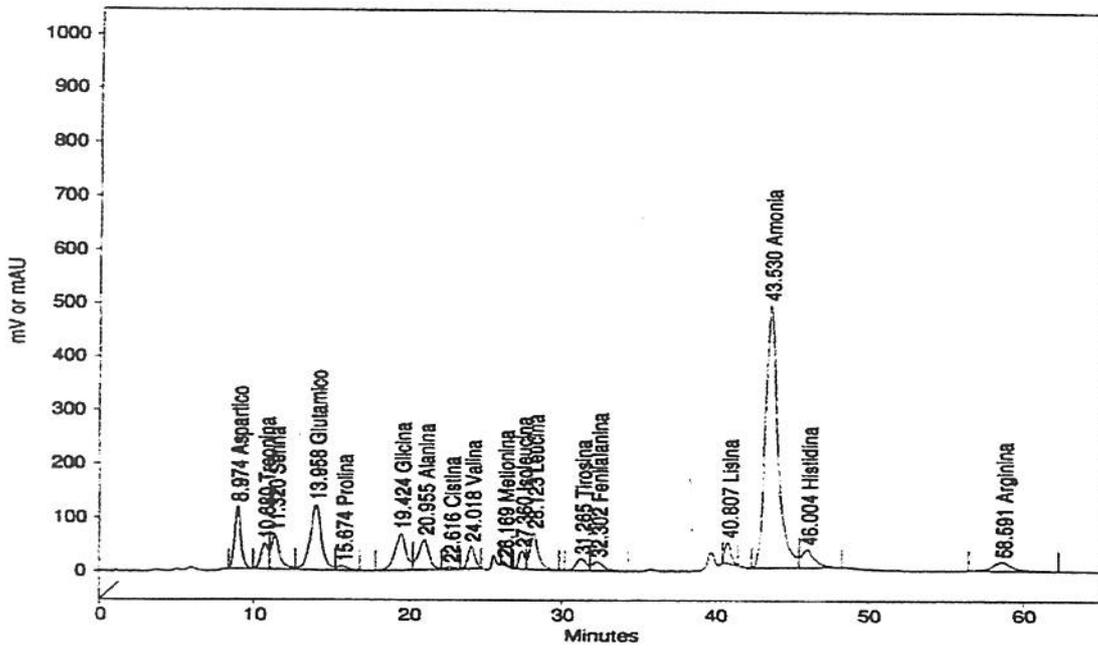


FIGURA 93: Aminograma do biosurfactante produzido em meio basal por *B. subtilis* LB-1993A

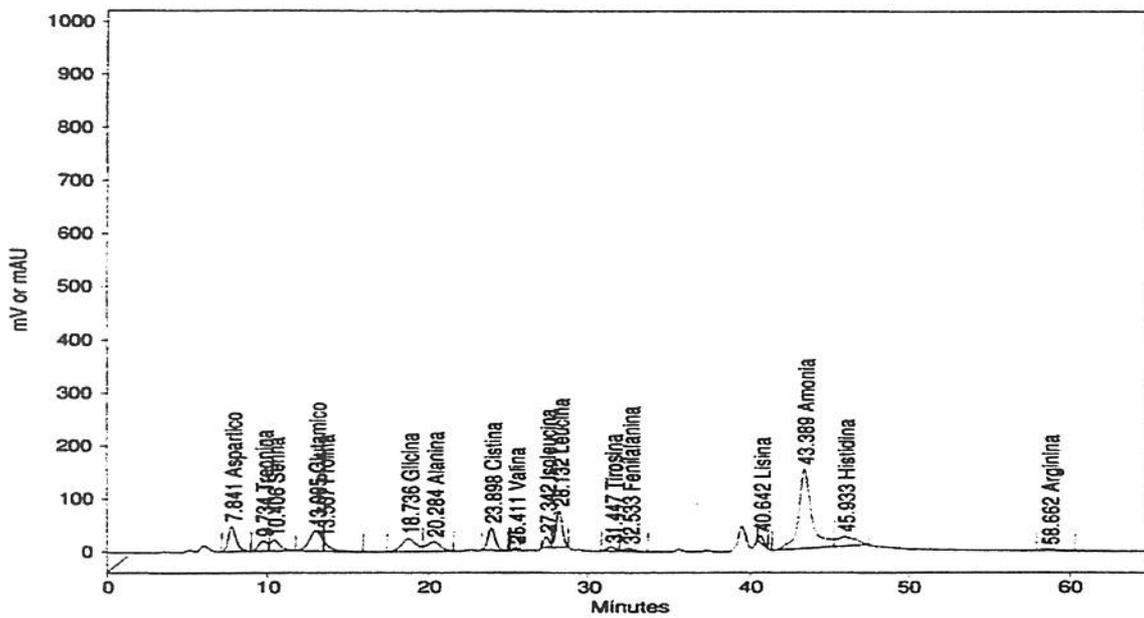


FIGURA 94: Aminograma do biosurfactante produzido em meio basal por *B. subtilis* LB-1993B

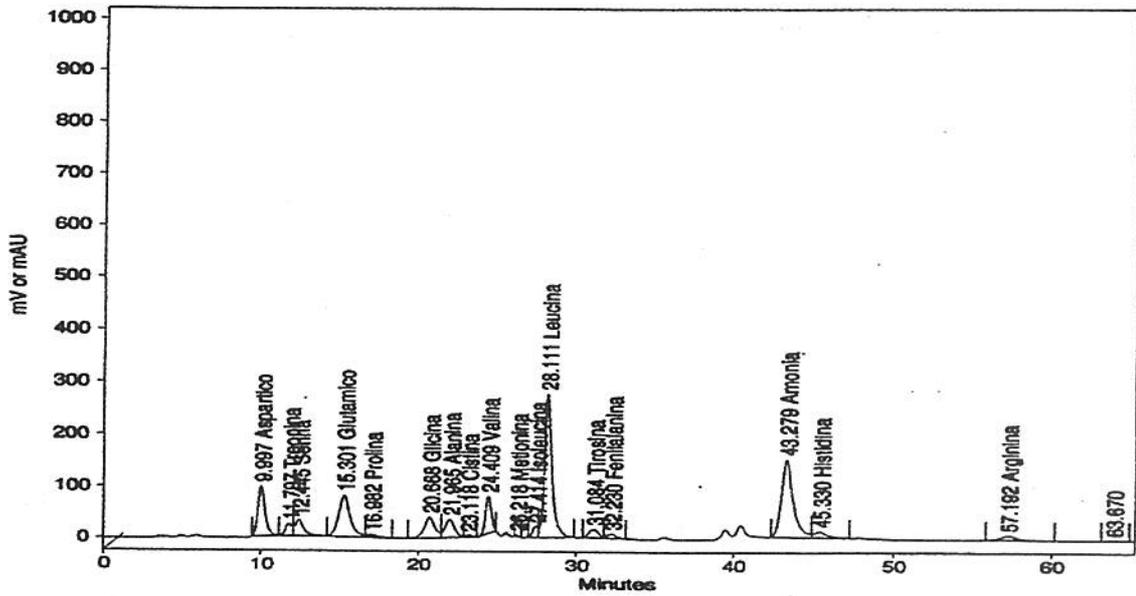


FIGURA 95: Aminograma do biosurfactante produzido em manipueira por *B. subtilis* LB-262

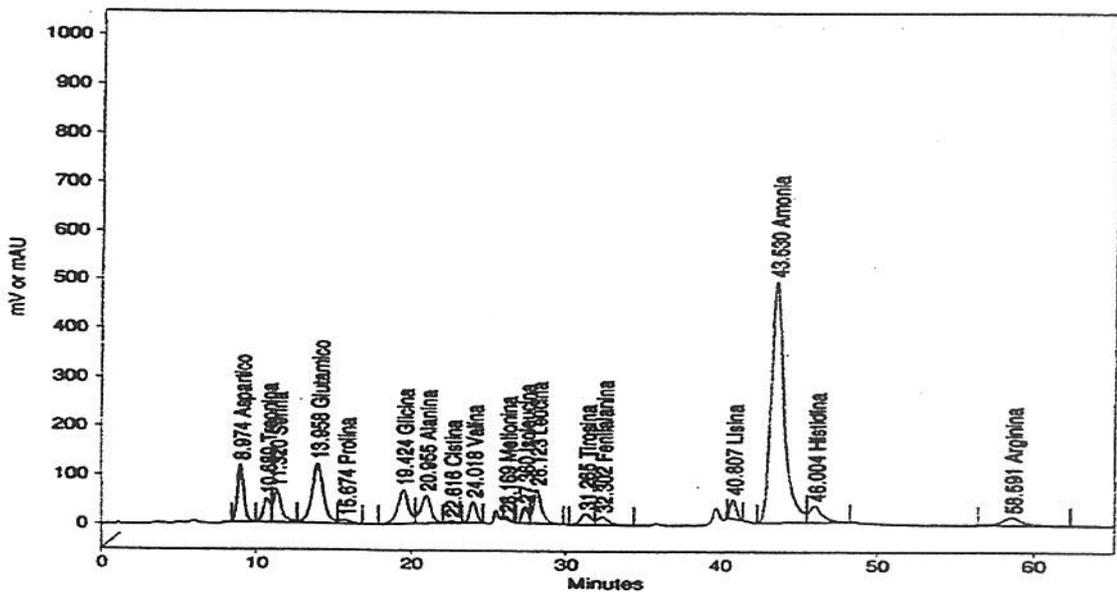


FIGURA 96: Aminograma do biosurfactante produzido em manipueira por *B. subtilis* LB-1993A

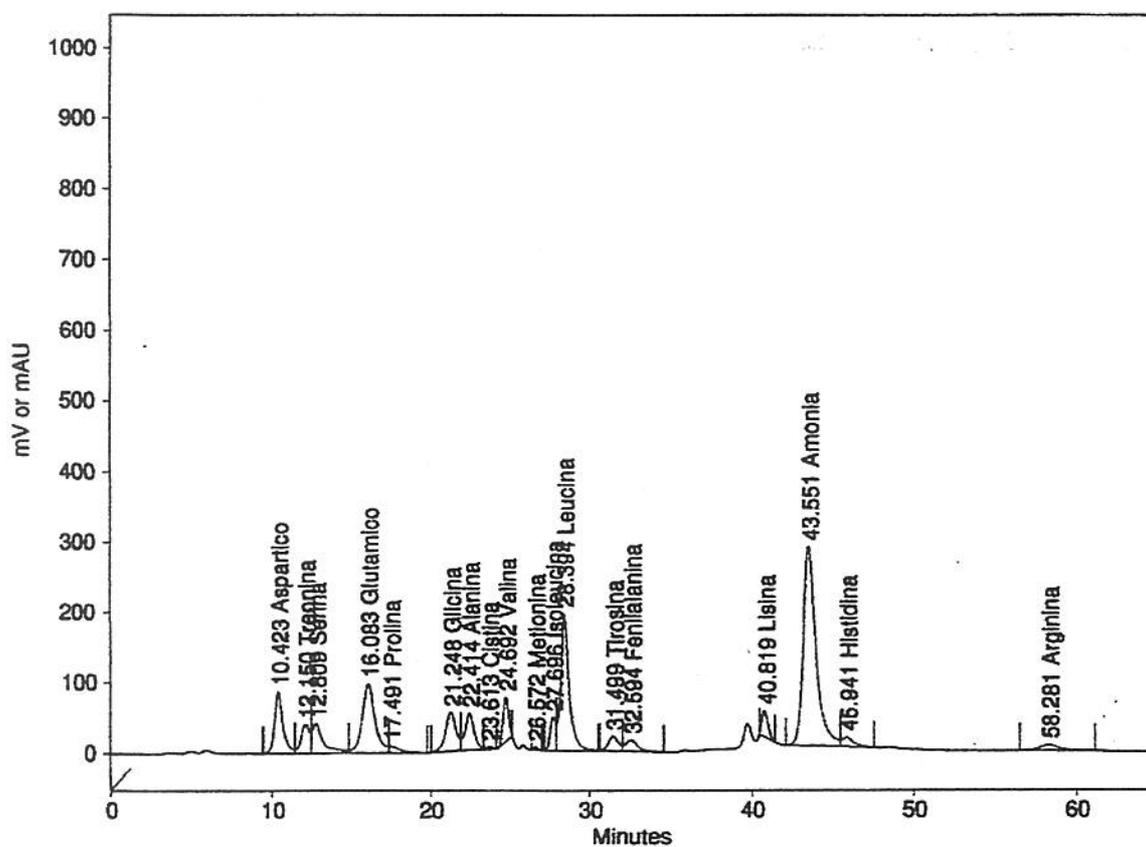


FIGURA 97: Aminograma do biosurfactante produzido em manipueira por *B. subtilis* LB-1993B

4.12 Estabilidade do biosurfactante bruto produzidos pelas linhagens estudadas

4.12.1.TERMOESTABILIDADE

De acordo com os dados das tabelas 67, 68 e 69 podemos observar que o tratamento térmico a 50°C, 70°C e 90°C, de soluções de tampão fosfato pH 6,0 contendo 0,1mL do biosurfactante produzido em meio de cultura basal e de manipueira por cada uma das linhagens de *B. subtilis*, quando tratados por até 120min. não mostraram nenhuma perda da atividade tensoativa.

Horowitz *et alii* (1990) observaram que o tratamento térmico por 20min, de uma solução contendo 1mg de surfactante produzido por uma linhagem de *Bacillus licheniformis* BL86, em 15ml de água alcalina de biosurfactante produzido, com estrutura semelhante à da surfactina produzida por linhagens de *B. subtilis*, não sofreu alteração da tensão superficial quando o tratamento foi realizado a 50°C, cuja tensão superficial de 27dynes/cm a 25°C se manteve-se constante. Porém quando a solução foi tratada à 75°C e 100°C a tensão superficial subiu de 27dynes/cm para 29dynes/cm, e quando tratada à 120°C, a tensão aumentou para 33dynes/cm.

Tabela 67: Estabilidade do biosurfactantes bruto em tampão fosfato pH 6,0 produzidos pelas linhagens estudadas após tratamento térmico em banho de 50°C

LB-262	0	15 min	30 min.	60 min	120 min
Meio basal	31,05	30,35	31,28	29,66	29,89
Manipueira	29,04	28,63	28,89	29,01	28,54
LB-199A	0	15 min	30 min	60 min	120 min
Meio basal	45,06	47,47	41,47	43,68	44,06
Manipueira	38,67	39,21	37,34	37,01	36,38
LB-199B	0	15 min	30 min	60 min	120 min
Meio basal	43,67	45,49	44,09	37,26	40,36
Manipueira	30,05	30,12	29,98	30,32	31,67

Tabela 68: Estabilidade do biosurfactantes bruto em tampão fosfato pH 6,0 produzidos pelas linhagens estudadas após tratamento térmico em banho de 70°C

LB-262	0	15 min	30 min	60 min	120 min
Meio basal	32,06	31,79	30,77	35,28	29,78
Manipueira	29,12	28,75	29,00	28,45	28,72
LB-199A	0	15 min	30 min	60 min	120 min
Meio basal	47,96	48,17	49,87	50,29	51,92
Manipueira	38,67	39,39	37,96	36,56	36,61
LB-199B	0	15 min	30 min	60 min	120 min
Meio basal	40,01	39,18	39,87	38,47	37,16
Manipueira	29,98	30,54	30,11	30,30	31,36

Tabela 69: Estabilidade do biosurfactantes bruto em tampão fosfato pH 6,0 produzidos pelas linhagens estudadas após tratamento térmico em banho de 90°C

LB-262	0	15min	30min	60min	120 min.
Meio basal	33,95	31,92	33,74	33,60	32,95
Manipueira	28,97	29,18	27,99	28,77	27,96
LB-199A	0	15min	30min	60min	120min.
Meio basal	51,99	49,85	53,82	47,94	48,03
Manipueira	39,48	42,05	39,34	33,28	39,65
LB-199B	0	15min	30min	60min	120min.
Meio basal	38,64	37,23	37,1	37,66	37,05
Manipueira	30,20	31,92	30,64	30,35	31,69

4.13. Estabilidade da propriedades tensoativas dos biosurfactantes diluídos em tampões de diferentes pHs.

De acordo com os dados das tabelas 70, 71 e 72 podemos observar que os biosurfactantes produzidos pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B apresentaram menor capacidade tensoativa quando diluídos em soluções tampão muito ácidas, no teste realizado pH 2,6, ou muito alcalinas, pH 12,5. Conforme observamos na tabela 67, o pH 12,5 causou maior inibição da capacidade tensoativa do biosurfactante produzido pela linhagem LB-262, cuja tensão superficial média dos tampões de 70mN/m abaixaram para 27,45mN/m no pH 5,75 e apenas para 49,14 quando em pH de 12,5. O biosurfactante produzido pela linhagem LB-262 em manipueira apresentou um comportamento semelhante, com a diferença que os biosurfactantes. Produzidos em manipueira possuem menor CMC, ou seja, são capazes de provocar um maior abaixamento de tensão superficial quando comparados com os produzidos em meio basal, pelas mesmas linhagens produtoras. Os biosurfactantes produzidos pelas linhagens LB-1993A e LB-1993B, conforme podemos observar as tabelas 67, 68 e 69, estes apresentaram

comportamentos semelhantes aos produzidos pela linhagem LB-262, com a diferença de que além dos pHs 2,6 e 12,5. O pH 4,0 também pareceu afetar significativamente a atividade tensoativa dos biosurfactantes, tanto para os produzidos em meio basal como em manipueira.

Horowitz *et alii* (1990) observaram que a diluição de 1mg de surfactante em 15ml de soluções em diferentes pHs (12,91, 11,97, 11,08, 10,18, 8,96, 7,03, 6,06, 5,11, 4,02, 3,03 e 2,01) de biosurfactant produzido por uma linhagem de *B. licheniformis* BL86, com estrutura semelhante à da surfactina produzida por linhagens de *B.subtilis*, apresentaram um valor de 27 dynes/cm quando diluídos em pHs de 12,91 a 8,96, e para 28 dynes/cm quando em pHs 7,03 a 5,11. Quanto aos pHs menores que 5,11, a tensão superficial aumentou para 30dynes em pH 4,02 e para 34dynes/cm quando em pHs 2,01 e 3,03.

Tabela 70: Propriedades tensoativas dos biosurfactante produzido pela linhagem LB-262 diluídos em tampões de diferentes pHs

pH	PADRÃO	Meio Basal	Manipueira
2,6	70,5	37,22	35,38
4,0	69,54	43,48	31,86
5,75	73,04	27,45	27,16
6,0	65,13	33,95	28,97
6,5	73,06	29,24	28,36
8,0	71,71	34,82	30,99
12,5	71,21	49,14	44,83

Tabela 71: Propriedades tensoativas dos biosurfactante produzido pela linhagem LB-1993A diluídos em tampões de diferentes pHs

pH	PADRÃO	Meio Basal	Manipueira
2,6	70,5	46,93	36,93
4,0	69,54	57,59	43,87
5,75	73,04	49,21	38,49
6,0	65,13	55,99	39,48
6,5	73,06	54,74	38,49
8,0	71,71	52,48	32,97
12,5	71,21	58,68	45,63

Tabela 72: Propriedades tensoativas dos biosurfactante produzido pela linhagem LB-1993B diluídos em tampões de diferentes pHs

pH	PADRÃO	Meio Basal	Manipueira
2,6	70,5	49,66	38,33
4,0	69,54	52,34	35,16
5,75	73,04	34,44	27,15
6,0	65,13	38,64	30,2
6,5	73,06	31,64	29,44
8,0	71,71	37,28	35,97
12,5	71,21	47,21	43,87

4.14. Influência de diferentes concentrações de NaCl nas propriedades tensoativas dos biosurfactantes pelas linhagens de *B.subtilis* estudadas

Este teste teve por objetivo avaliar a influência de diversas concentrações de NaCl sobre as propriedades dos biosurfactantes produzidos em meio basal e em manipueira. Conforme podemos observar os dados da tabela 73, soluções contendo o biosurfactante produzido pela linhagem LB-262, quando em soluções com concentrações de NaCl maiores que 6%, tiveram valores de tensão superficial mais altos que em soluções com concentrações de até 4% de NaCl. Já os biosurfactante produzidos pelas linhagens LB-199A e LB-1993B, tabelas 74 e 75, não tiveram as propriedades tensoativas influenciadas pela adição de até 8% de NaCl. Já a adição de 12% de NaCl aumentou a tensão superficial das soluções contendo os biosurfactantes produzidos em meio basal e manipueira, pelas linhagens LB-262, LB-1993A e LB-1993B, onde podemos concluir que soluções com altos teores de NaCl, concentrações em torno de 10%, podem influenciar negativamente na capacidade tensoativa dos biosurfactantes produzidos.

Tabela 73: Influência de diferentes concentrações de NaCl nas propriedades tensoativas dos biosurfactantes produzidos pelas linhagens de *Bacillus subtilis* LB- 262

NaCl (%)	Meio Basal (TS mN/m)	Manipueira (TS mN/m)
0	36,49	30,03
2,0	37,58	31,78
4,0	37,27	28,40
6,0	41,35	29,49
8,0	49,51	30,39
12	55,30	33,86

Tabela 74: Influência de diferentes concentrações de NaCl nas propriedades tensoativas dos biosurfactantes produzidos pelas linhagens de *Bacillus subtilis* LB-199A

NaCl(%)	Meio Basal (TS mN/m)	Manipueira(TS mN/m)
0	49,04	40,51
2,0	40,7	40,58
4,0	41,83	43,13
6,0	45,04	41,70
8,0	52,81	51,85
12	51,43	51,95

Tabela 75: Influência de diferentes concentrações de NaCl nas propriedades tensoativas dos biosurfactantes produzidos pelas linhagens de *Bacillus subtilis* LB-199B

NaCl(%)	Meio Basal (TS mN/m)	Manipueira (TS mN/m)
0	43,66	28,02
2,0	46,46	28,94
4,0	46,88	27,42
6,0	50,6	28,67
8,0	59,93	28,65
12	60,33	57,98

4.15 Condições de inativação da capacidade tensoativa dos biosurfactantes produzidos - Autoclavagem do meio de cultura contendo biosurfactante

Neste teste, meios de culturas basal e manipueira fermentados pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B foram submetidos a processos de autoclavagem com a finalidade de avaliarmos a capacidade tensoativa dos biosurfactantes quanto submetidos a tratamentos bruscos de temperatura. Para isso, amostras submetidas ao tratamento tiveram antes a tensão superficial determinada antes do pré-tratamento, com a finalidade de a compararmos com a tensão pós-tratamento.

Conforme podemos observar na tabela 76, o tratamento térmico aplicado às amostras não afetou a capacidade tensoativa, pois aumentos de tensão superficial inferiores a 1mN/m são praticamente desprezíveis.

Horowitz *et alii* (1990) observaram que o tratamento por 20min à 120°C de uma solução contendo 1mg de biosurfactante produzido por uma linhagem de *Bacillus licheniformis* BL86, em 15ml de água alcalina teve a tensão superficial antes do tratamento aumentada de 27dynes/cm para 33dynes/cm.

TABELA 76: Condições de inativação da capacidade tensoativa dos biosurfactantes produzidos - Autoclavagem do meio de cultura contendo biosurfactante

Tratamento térmico	Meio basal		Manipueira	
	antes	depois	Antes	Depois
LB-262	26,37	26,42	26,25	26,78
LB-1993A	29,96	31,34	28,78	28,66
LB-1993B	27,74	28,24	26,66	27,01

4.13 Atividade microbiológica dos biosurfactantes e antibióticos produzidos pelas linhagens estudadas

Este teste teve por objetivo avaliar a atividade microbiológica da surfactina, e de um antibiótico produzido simultaneamente por linhagens de *B.subtilis*, durante o processo fermentativo(VATER,1989).

4.13.1 Atividade Anti-microbiana da Surfactina

A surfactina é um antibiótico geralmente efetivo contra bactérias gram (+) e contra fungos, e linhagens de *B.subtilis* produtoras de surfactina são conhecidas por produzirem também antibióticos como Iturinas (VATER,1989; OHNO *et alii*, 1995), a plipastina B1(TSUGE *et alii*, 1996) e outros lipopeptídeos antibióticos conjuntamente com a surfactina. Esses antibióticos produzidos teriam ação anti-microbiana mais efetiva que a surfactina, porém baixa propriedade surfactante. Além disso a solubilidade desses antibióticos difere da solubilidade da surfactina o que facilitaria a separação. Portanto, extratos puros de biosurfactante foram testados contra diversos microorganismos conforme metodologia descrita em 3.15. Neste teste, a surfactina produzida pelas três linhagens de *B. subtilis*, LB-262, LB-1993A e LB-1993B, preparada conforme item 3.15.1, tiveram avaliada suas atividades microbiológicas. A extração da surfactina pura foi feita através da coleta da espuma expulsa do fermentador durante o processo fermentativo (CARRERA *et alii*, 1993).

Conforme podemos observar pelas figuras 99 a 103, a presença da coloração rosa nas placas indica crescimento celular, conferida pelo corante adicionado ao meio. As regiões não coloridas indicam a inibição do crescimento microbiano. Conforme podemos observar as figuras 100 e 102, as linhagens de *S. aureus* e *S. choratesius* sofreram total inibição tanto com o padrão como com as amostras de biosurfactantes aplicadas. Quanto as linhagens de *P. aeruginosa* e *C. albicans* testadas, figuras 98 e 101, estas mostraram maior resistência às concentrações de surfactina testadas, havendo inibição apenas com a surfactina padrão aplicada em concentrações de 265µg/mL até 2,65µg/mL, e com as amostras de biosurfactante produzido pela linhagem LB-262. Quanto à linhagem de *E. coli* testada, figura 103, esta se mostrou sensível a ambas as concentrações do padrão, as amostras 262(1), 262(2), às duas diluições das amostras 199-3A e a primeira concentração da amostra 199-3B, não sofrendo inibição às amostras 1993B(2) e 262(3). Já a linhagem de bactéria *R. equi*, figura 99, esta foi inibida de maneira semelhante à ocorrida com a linhagem de *E.coli*, porém os halos obtidos com as amostras 262(1) e 262(2) foram mais evidentes.

Arima (1968) observou ser a surfactina um potente agente microbiano contra bactérias do gênero *Mycobacterium*, responsáveis por várias doenças no homem e em pessoas portadoras da Síndrome Imunodeficiência Adquirida. Além disso o autor cita ser a surfactina eficiente contra linhagem de *P. aeruginosa*, *S.aureus*, *B.subtilis*, e *E.coli* em concentrações superiores a 500µg/mL.

Yakimov *et alii* (1995) compararam a atividade anti-microbiana da surfactina com o biosurfactante produzido por linhagens de *B. licheniformis*, que produz a lichesina, um biosurfactante com estrutura e propriedades anti-microbianas semelhantes à da surfactina. Em seu estudo, os autores também utilizaram o método de difusão em placa, e a surfactina foi capaz de inibir o crescimento de microrganismos como *S. aureus*, *B. licheniformis*, *Rhodococcus*

globerulus, *P. fluorescens*, *E. coli* entre outros, sendo que o *S. aureus* foi a linhagem que apresentou maior sensibilidade, no entanto os autores não citaram a concentração aplicada. No caso da lichesina,, foi necessária a aplicação de 500-1000 μ g/mL.

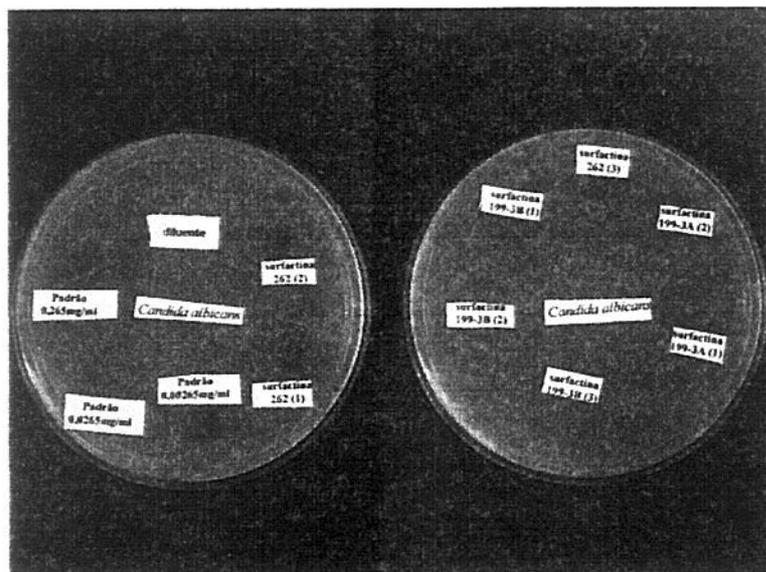


FIGURA 98: Atividade anti-microbiana da surfactina contra a linhagem uma *C. albicans* (pequena inibição apenas com o padrão de Surfactina Sigma nas concentrações testadas e pelos extratos da linhagem LB-262)

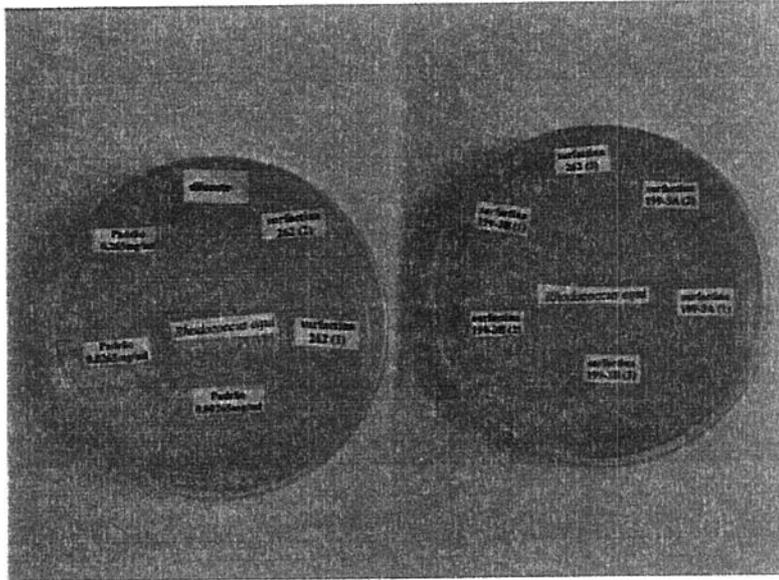


FIGURA 99: Atividade anti-microbiana da surfactina contra *R. equi* (pequena inibição apenas com o padrão de Surfactina Sigma nas concentrações testadas e pelos extratos da linhagem LB-262)

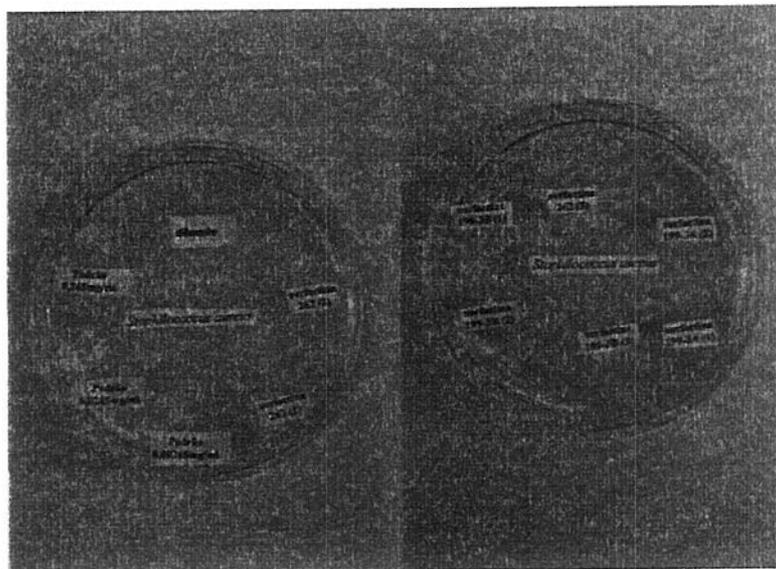


FIGURA 100: Atividade anti-microbiana da surfactina contra *S. aureus* (inibição total nas concentrações testadas, tanto para os extratos como para o padrão nas diversas concentrações testadas)

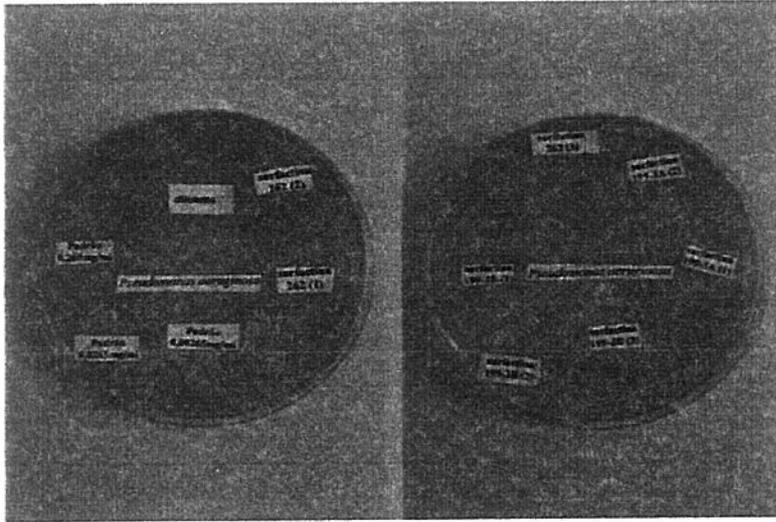


FIGURA 101: Atividade anti-microbiana da surfactina contra *P. aeruginosa* (inibição apenas com o padrão de Surfactina Sigma nas concentrações testadas e pelos extratos da linhagem LB-262)

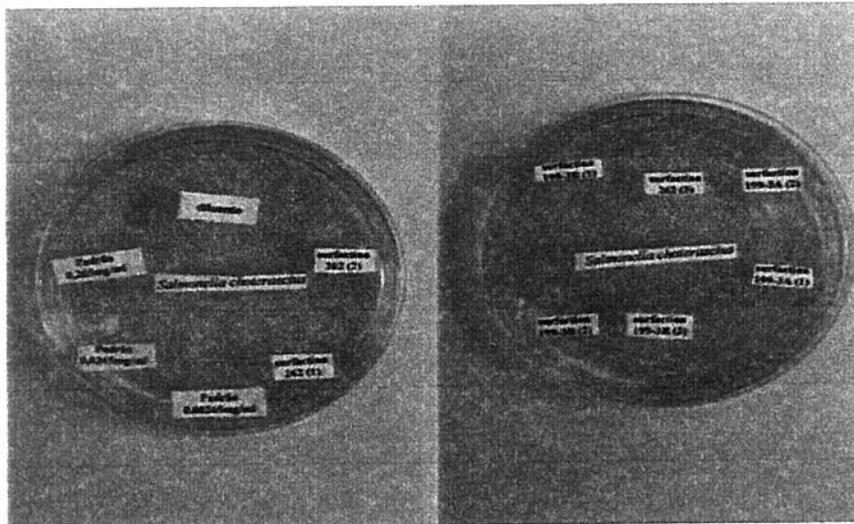


FIGURA 102: Atividade anti-microbiana da surfactina contra *S. choleraesuis* (inibição total nas concentrações testadas, tanto para os extratos como para o padrão nas diversas concentrações testadas)

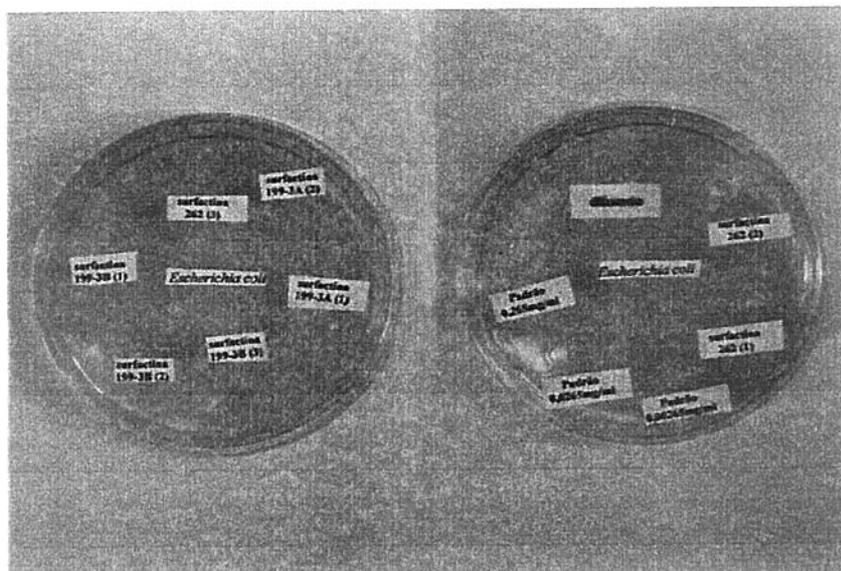


FIGURA 103: Atividade anti-microbiana da surfactina contra *E. coli* (inibição apenas com o padrão de Surfactina Sigma nas concentrações testadas e pelos extratos da linhagem LB-262 e LB-1993A)

4.17.2 Antibiótico produzido pelas linhagens de *B. subtilis*

Este teste teve por objetivo avaliar a atividade anti-microbiana do antibiótico produzido pelas linhagens de *B. subtilis* produtoras de surfactina. Este antibiótico foi isolado conforme item 3.15.1.2 e sua atividade se mostrou bastante efetiva contra microrganismo gram (-) como *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*. Neste teste, utilizamos a mesma metodologia aplicada para a análise da atividade anti-microbiana da surfactina, conforme descrito no item anterior, 3.15.1.4, e os mesmos microrganismo foram testado. Não foi possível determinarmos as concentrações do antibiótico testados, uma vez que linhagens de *B. subtilis* são capazes de produzirem uma vasta quantidade de antibióticos. No entanto, através deste estudo preliminar pudemos apresentar a alta potencialidade deste

antibiótico, uma vez que as fermentações para a produção da surfactina pelo método de coleta de espuma espunha a fermentação constatemente ao meio ambiente, onde em outros tipos de fermentação, uma contaminação poderia ser muito provável. Goes & Sheppard (1999) evidenciaram constante contaminação em um processo de fermentação sólida para a produção de α -amilase por uma linhagem de *B. subtilis* ATCC 21556. A fim de solucionar o problema, os autores passaram a adicionar o caldo fermentado de uma linhagem de *B. subtilis* ATCC 21332 conhecida como produtora de surfactina. Como resultado, não só as contaminações cessaram como houve um aumento na produção da enzima produzida. Podemos observar através da figura 104, que a linhagem de levedura *C. albicans* foi a que mostrou maior resistência ao antibiótico testado, sendo apenas parcialmente sensível às amostras produzidas pela linhagem de *B. subtilis* LB-262. Quanto às demais linhagens testadas, figuras 105 a 109, todas apresentaram sensibilidade significativa as amostras testadas. Os antibióticos produzidos pelas linhagem de *B. subtilis* LB-262 provocaram uma maior sensibilidade às linhagens testadas. Rossall (1991) isolou um antibiótico produzido por linhagens de *B. subtilis*, o qual apresentou potente atividade contra fungos e bactérias gram(-), não apresentando atividade contra bactérias gram(-), no entanto o isolamento do antibiótico foi feito com tampão fosfato de sódio, pH 7,0, de maneira similar a que foi isolado o antibiótico produzido pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B.

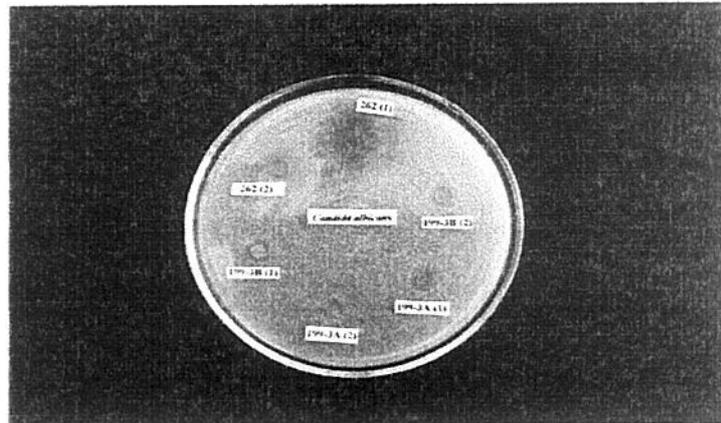


FIGURA 104: Antibiograma obtido para o antibiótico produzido pela linhagem de *B. subtilis* LB-262, LB1993A e LB-1993B, contra uma linhagem de *C. albicans*

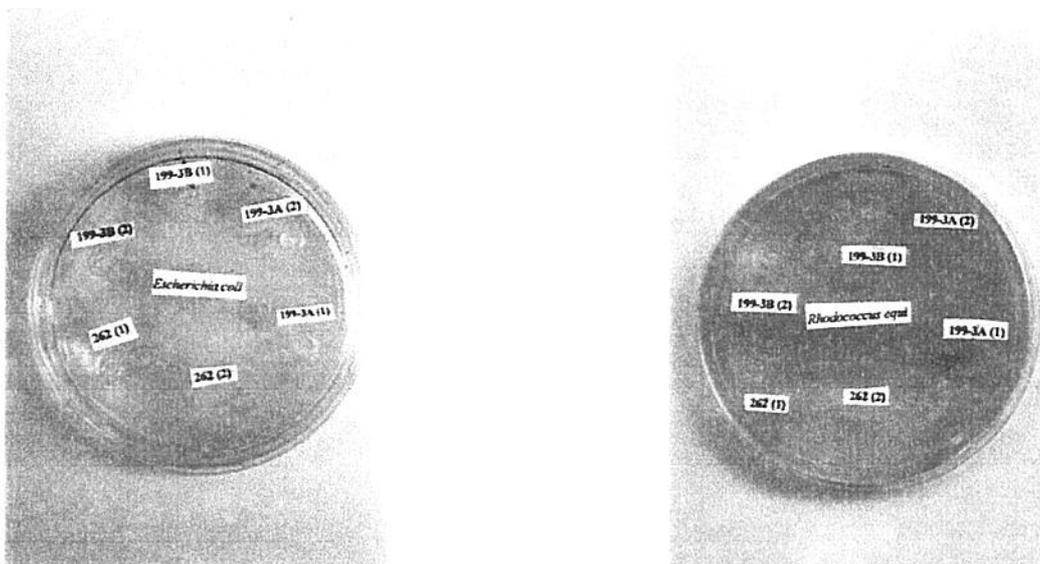


FIGURA 105 e FIGURA 106: Antibiograma obtido para o antibiótico produzido pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB1993A e LB-1993B contra uma linhagem de *E. coli* (à esquerda) e de *Rhodococcus equi* (à direita)

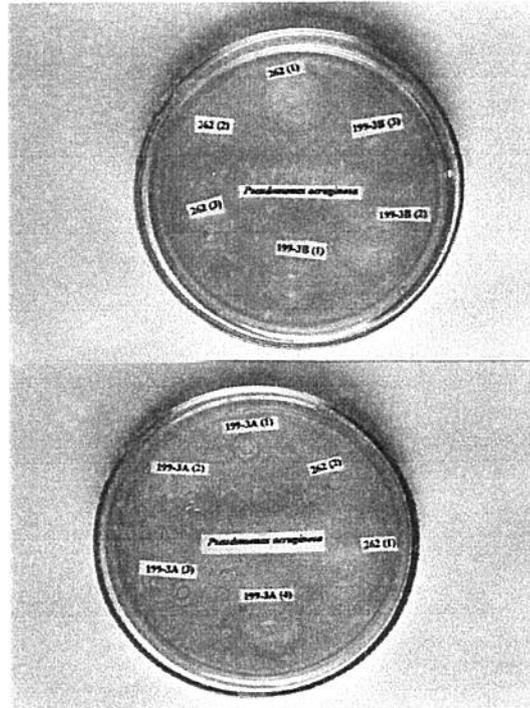


FIGURA 107: Antibiograma obtido para os antibióticos produzidos pela linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB1993A e LB-1993B contra uma linhagem de *P. aeruginosa*

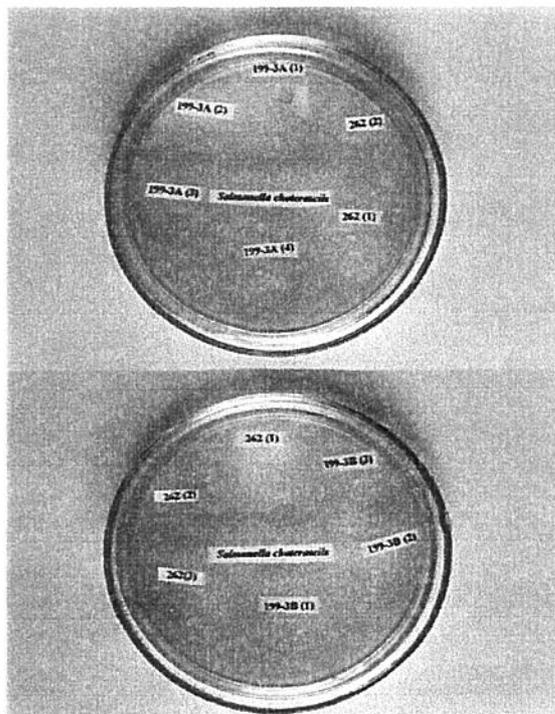


FIGURA 108: Antibiograma obtido para os antibióticos produzidos pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB1993A e LB-1993B contra uma linhagem de *S. choratecius*

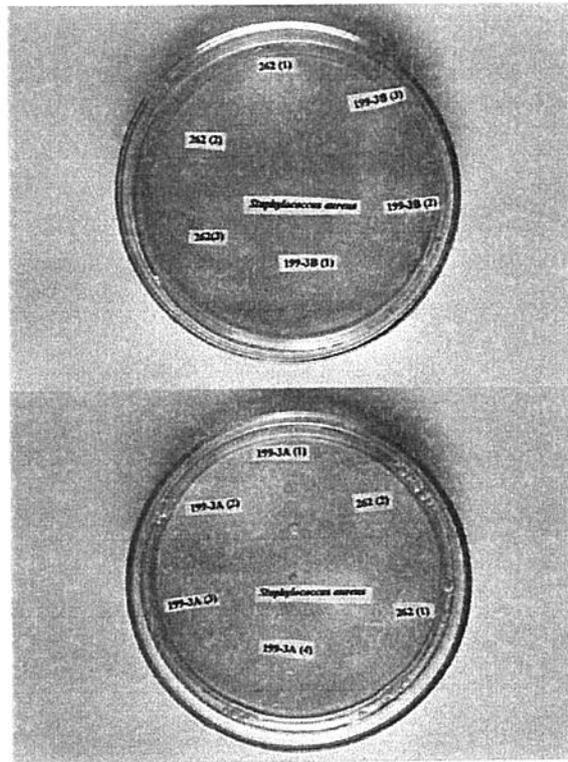


FIGURA 109: Antibiograma de antibiótico produzido pela linhagem de *B. subtilis* LB-262, LB1993A e LB-1993B contra uma linhagem de *S. aureus*

5. CONCLUSÃO

1. De acordo com as análises microscópicas e com os testes fisiológicos e bioquímicos realizados, concluímos que as três linhagens, LB-262, LB-199-3A e LB-199-3B pertencem ao gênero *Bacillus*, e também à mesma espécie, sendo identificadas como *Bacillus subtilis*.

2. As melhores condições de fermentação em relação à temperatura, pH e concentração de NaCl para as linhagens produtoras de biosurfactante foram temperatura de 30°C, pH de 6,5 e 3% de NaCl para as linhagens LB-262 e LB-199-3A e 0% de NaCl para linhagem LB-199-3B

3. Todas as linhagens estudadas necessitaram de uma fonte orgânica para seu crescimento celular e conseqüente produção de biosurfactante. A associação de apenas uma fonte de nitrogênio inorgânica com a fonte de carbono não foram suficientes para o crescimento das linhagens.

4. De acordo com os dados obtidos quando utilizamos diferentes fontes de carbono como glicose, maltose, sacarose, frutose e amido, observamos que houve crescimento celular e produção de biosurfactante nas diferentes fontes testadas, para as três linhagens estudadas, LB-262, LB-1993A e LB-1993B. No entanto, quando a galactose e a lactose foram utilizadas como fonte de carbono, ambas induziram uma pequena produção de biosurfactante, ao passo que com amido, maltose e glicerol, tomando-se a glicose como referência, houve aumento na massa celular e produção de biosurfactante.

5. Quanto à relação C/N, o meio basal utilizado rotineiramente continha uma relação C/N igual a 40, observamos que o aumento da quantidade de nitrogênio, influenciou diretamente no crescimento celular.

6. A adição de hidrocarbonetos ao meio basal apenas induziu um aumento na produção de biosurfactante para a linhagem LB-262, quando adicionou-se 1% de hexadecano ao meio. Quanto às outras linhagens estudadas, a linhagem LB-1993A e a linhagem LB-1993B, a adição de hidrocarbonetos não provocou aumento de produção, onde no caso da linhagem LB-1993B, houve uma diminuição de produção.

7. Quanto ao teste de emulsificação, o biosurfactante produzido pelas linhagens estudadas produziu emulsões bastante estáveis com óleos vegetais, o que não aconteceu com tanta eficácia quando adicionou-se tetradecano, hexadecano e squaleno ao meio de cultura.

8. A manipueira mostrou-se um excelente substrato para produção de biosurfactante pelas linhagens de *B. subtilis* estudadas, onde a produção de biosurfactante em relação ao meio basal foi duas vezes maior para as três linhagens. Além disso os biosurfactantes produzidos em manipueira apresentaram menor concentração micelar crítica e maior capacidade tensoativa que os biosurfactantes produzidos em meio basal.

9. As linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B apresentaram um consumo de glicose mais acelerado quando inoculados em manipueira do que em meio basal. A linhagem LB-262 foi a que apresentou o consumo mais lento de glicose em meio basal e manipueira enquanto que as linhagens LB1993A e LB-1993B apresentaram um consumo mais rápido de glicose .

10. De acordo com os dados obtidos quando soluções de minerais de $MnSO_4$, $FeSO_4$ (sulfato ferroso) e $Fe_2(SO_4)_3$ (sulfato férrico) foram adicionados ao meio basal, a adição de 66,7 $\mu l/ml$ de sulfato férrico e ferroso prejudicaram a produção de biosurfactante com elevação dos valores de tensão superficial obtidos. A

suplementação de minerais nas concentrações de 3,33 µl/ml e 13,33µl/ml não afetou significativamente o aumento da quantidade de biosurfactante produzida pelas linhagens LB-262, LB-1993A e LB-1993B.

11. A purificação dos biosurfactantes produzidos através do método de ultrafiltração, se mostrou eficiente e rápida, onde todas as membranas utilizadas, PM10, YM30 e XM50, foram capazes de reter a maior quantidade de micelas dos biosurfactantes produzidos, onde apenas a membrana XM50, para a linhagem LB-262, indicou uma maior perda .

12. A tensão interfacial entre o hexadecano meio basal e a manipueira fermentadas pelas linhagens estudadas mostrou-se extremamente baixa em relação a tensão interfacial entre a água e o hexadecano, comprovando mais uma vez a alta eficiência dos biosurfactantes produzidos

13. Os valores de CMC (concentração micelar crítica) dos biosurfactantes produzidos em manipueira mostraram-se mais baixos em relação aos produzidos em meio basal, sendo o biosurfactante da linhagem de *B. subtilis* LB-1993B o que apresentou menores valores de CMC.

14. O aumento de escala da produção de biosurfactante para a produção em escala piloto apresentou diversas dificuldade em termos de coleta da espuma, onde não foi possível acoplar uma saída lateral para sua coleta, oque acabou prejudicando a fermentação, onde apenas a linhagem LB-262 apresentou resultados satisfatórios e promissores. As outras duas linhagens produtoras, LB-1993A e LB-1993B apresentaram melhor produção em fermentador de bancada, merecendo portanto futuros estudos.

15. Quanto à transferência de oxigênio dissolvido no meio de cultura para dentro das células, esta se mostrou maior durante a fase log de crescimento microbiano, principalmente quando a produção de biosurfactante foi realizada em fermentador de bancada. Já a produção de biosurfactante em fermentador piloto teve comportamento semelhante à transferência de oxigênio em fermentador de bancada..

16. Nas análises de composição de aminoácidos das amostras de biosurfactante podemos observar que os aminoácidos constituintes da surfactina apresentaram-se em maiores quantidades e com pequenas diferenças entre as amostras produzidas em meio basal e manipulada.

17. As análises utilizando HPLC e FAB-MS do biosurfactante produzido pelas linhagens de *B. subtilis* LB-262, LB-1993A e LB-1993B, utilizando a Surfactina da sigma como padrão, foram bastante satisfatórias, onde os cromatogramas e os espectro de massa confirmaram ser a surfactina o biosurfactante produzido e confirmaram a eficiência dos diferentes processos de produção, comprovando mais uma vez que a linhagem LB-262 foi a que apresentou resultados mais satisfatórios e mais próximos ao padrão.

18. Quanto à adição de surfactina como indutor do aumento de produção de α -amilase, os melhores resultados foram obtidos quando a surfactina produzida pela linhagem LB-262 foi adicionada na concentração de 0,66%.

19. A exposição dos biosurfactantes produzidos em meio basal e manipulada pelas linhagens estudadas a diversas condições de pH, concentrações de NaCl e temperaturas mostraram a alta estabilidade destes compostos, não havendo perda de atividade tensoativa nos testes de estabilidade realizados.

20. Os biosurfactantes produzidos pelas linhagens estudadas, e caracterizados como surfactina apresentaram potente atividade anti-microbiana contra linhagens de *S.aureus* e *S. choratesius*, além de outras bactérias testadas. Baixa inibição foi detectada contra a linhagem de levedura *C. albicans*.

21. Neste trabalho foi possível o isolamento de extratos antibióticos produzidos pelas linhagens estudadas, cuja produção ocorreu simultaneamente à surfactina durante o processo de fermentação. No entanto estes não apresentaram propriedades tensoativas e sua forma de extração diferiram por completo da forma de extração de surfactina. Estes extratos antibióticos apresentaram importante ação contra bactérias gram (-) como *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S.choratesius*, cuja propriedade não é comumente encontrada entre antibióticos produzidos por linhagens de *B. subtilis*, merecendo portanto estudos futuros.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

-Produção de biosurfactante pelas linhagens estudadas neste trabalho utilizando imobilização celular

-Caracterização estrutural e maior exploração do biosurfactante produzido em manipueira

-Maior exploração do antibiótico produzido pelas linhagens estudadas

7.BIBLIOGRAFIA

- ASHTAPUTRE,A.A.;SHAH,A.K. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 11 : 219 - 222, 1995.
- ASMER, H.J. ; WAGNER, F. e WRAY, V. Microbial Production, Structure Elucidation and Bioconversion of Sophorose Lipids. **Journal American Oil Chemistry Society**, 65(9) : 1460 - 1466, 1988.
- ARIMA, K.; GAKUZO,T. ; KAKINUMA, A. SURFACTIN **US Patent 3,687,926**, 1968.
- ARINO, S. ; MARCHAL, R. ;VANDECASTEELE, J.P. Production of new extracellular glycolipids by a strain of *Cellulomonas cellulans* (*Oerskovia xanthineolytica*) and their structural. **Canadian Journal of Microbiology**, 44 : 238-243, 1998.
- BANAT, I.M. Characterization of Biosurfactants and their Use in Pollution Removal - State of the Art (Review). **Acta Biotechnology**, 15(3) : 251-267, 1995.
- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 53 : 495-508, 2000.
- BECHARD, J. ; EASTWELL, K.C. ; SHOLBERG, P.L.; MAZZA, G. ; SKURA, B. Isolation and Partial Chemical Characterization of an Antimicrobial Peptide Produced by a Strain of *Bacillus subtilis*. **Journal Agricultural Food Chemistry.**, 46 : 5355-5361, 1998.
- BEEBA, J.L.; UMBREIT, W.W. Extracellular lipid of *Thiobacillus thiooxidans*. **Journal of Bacteriology**, 108 : 612, 1971.

- BERGMEYER, H.U. ; BERNT, E. Methods of Enzymatic Analysis, H.U. Bergmeyer, Ed. New York, Academic Press, 2nd edition, p.1205-1212, 1974.
- BERNFELD, P. Amylases, α and β . **Methods in Enzimology** 1:149-159, 1951.
- BESSION, F.; MICHEL, G. Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis* : Evidence for amino acid activating enzymes. **Biotechnology Letters**, 14(11) : 1013-1018,1992.
- BESSION, F. Characterization of the surfactin synthetase isolated from by *Bacillus subtilis* strain producing iturin. **Biotechnology Letters**, 16(12) : 1269-1274,1994.
- BRYANT, F.O. Improved Method for the Isolation of Biosurfactant Glycolipid from *Rhodococcus* sp. Strain H13A. **Applied and Environmental Microbiology**, 56(5) : 1494-1496, 1990.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Synthesis of biosurfactant in extreme conditions- a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 50 : 520-529,1998.
- CARRERA, P.;COSMINA,P.;GUIDE,G. Method of Producing surfactin with the use of mutant of *Bacillus subtilis*. **US Patent 5,227,294**, 1993 (a).
- CARRERA, P.;COSMINA,P.;GUIDE,G. Mutant of *Bacillus subtilis*. **US Patent 5,264,363**, 1993.(b)
- CARRILLO, P.G. ; Mardaraz, C. ; PITTA - ALVAREZ, S.I. ; GIULIETTI, A.M. Isolation and Selection of Biosurfactant - producing bacteria. **World journal of Microbiology & Biotechnology**, 12 : 82-84,1996.
- CIRIGLIANO, M.C.; CARMAN, G.M. Isolation of a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, 48 : 747-750, 1984.
- CIRIGLIANO, M.C.; CARMAN, G.M. Purification and Characterization of Liposan, a Bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied and Environmental Microbiology**, 50(4) : 846-850, 1985.

- COOPER, D.G. ; ZAJIC, J.E. ; GERSON, D.F. Production of Surface - Active Lipids by *Corynebacterium lepus*. **Applied and Environmental Microbiology**, 4-10, jan. 1979.
- COOPER D.G. ; MACDONALD, C.R.; DUFF, S.J.B. ; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied Environmental and Microbiology** 42(1) :408-412, 1981.
- COOPER, D.G. ; PADDOCK,D.A. *Torulopsis petrophilum* and Surface Activity. **Applied and Env. Microbiology**, 46(6) : 1426 - 1429, dec.1983.
- COOPER, D.G. ; PADDOCK,D.A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis Bombicola*. **Applied and Env. Microbiology**, .47(1) : 173-176, 1984.
- COOPER,D.G. ; GOLDENBERG, B.G. Surface - Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Applied and Env. Microbiology**, 53(2) : 224-229, 1987.
- DAMASCENO, SIMONE Cultivo de *Geotrichum fragrans* em Manipueira. Dissertação de tese de Doutorado. UNESP, Botucatu, 69p., fevereiro 1999
- DANIEL, H.J. ; OTTO, R.T. ; REUSS, M. ; SYLDATK,C. Sophorolipid production with high yields on whey concentrate and rapessed oil without consumption of lactose. **Biotechnology Letters**, 20 (8) : 805-807, 1998.
- DAVILA, A.M.; MARCHAL,R.; VANDECASTEELE,J.P. Sophorose lipid production from lipidic precursors: predictive evaluation of industrial substrate. **Journal of Industrial Microbiology**, 13 : 249 - 257, 1994.
- DAVIS, D.A ; LYNCH,H.C. ; VARLEY,J. The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, 25 : 322-329, 1999.
- DELEU, M. ; RAZAFINDRALAMBRO, H. ; POPINEAU, Y ; JACQUES, P. ; THONART,P. ; PAQUOT, M. Interfacial and emulsifying properties of

- lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Coloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects** 152 : 3-10, 1999.
- DESAI, J.D. ; BANAT, I.M. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 47-64,1997.
- DESAI,J.D. ; DESAI,A. Production of Biosurfactants In:. KOSARIC,N. Biosurfactants: Production, Properties and Applications. **Surfactant Science Series**, Edited by Naim Kosaric, New York, vol.48, cap.2 : 65-92,1990.
- DESHPANDE, M. ; DANIELS,L. Evaluation of Sophorolipids Biosurfactan Production by *Candida Bombicola* using Animal Fat. **Bioresource Technology**, 54 : 143-150, 1996.
- DUVNJAK, Z.; COOPER, D.G.; Production of Surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558. **Biotechnology and Bioengineering**, XXI : 165 - 175, 1982.
- FIETCHER,A. Biosurfactants: Moving towards industrial application. **TIBTECH**, 10 : 208-217, 1992.
- GOES, A.P. ; SHEPPARD, J.D. Research note: Effect of surfactants on α -amylase production in a solid substrate fermentation process. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, 74 : 709-712, 1999.
- GREEK, B.F. Detergent industry ponders product for new decade. **Chemical Engineering News**, 68: 37-38, 1990,
- HABA,E.; ESPUNY,M.J. ; BUSQUETS, M. ,MANRESA, A Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology** .88: 379-387,2000.
- HBID, C. ; JACQUES, P. Influence of the Production of two Lipopeptides Iturin A and Surfactin S1, on Oxygen Transfer During *Bacillus subtilis*

- Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 57/58: 571-578, 1996.
- HOMMEL,R. ; STUWER, O ; STUBER, W. ; HAFERBURG D. ; KLEBER, H.P. Production of water soluble surface - active exolipids by *Torulopsis bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, 26: 199-205, 1987.
- HOMMEL,R. Formation and Physiological Role of Biosurfactants Produced by Hydrocarbon - Utilizing Microorganisms. **Biodegradation**, 1:107-109,1990.
- HOMMEL,R. ; HUSE, K. Regulation of Sophorose lipids Production by *Candida Apicola*. **Biotechnology Letters**, 15(8) : 853-858, 1993.
- HOMMEL,R. ; RATLEDGE, C. Biosynthetic Mechanism of Low Molecular Surfactants and their Precursor Molecules. In: KOSARIC,N. Biosurfactants: Production, Properties and Applications. **Surfactant Science Series**, Edited by Naim Kosaric, New York, vol.48, cap.1 : 4-36,1990
- HOROWITZ, S. ; GILBERT, J.N. ; GRIFFIN, W.M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of Microbiology**, 6: 243 - 248, 1990.
- HOROWITZ, S. ; GILBERT, J.N. ; GRIFFIN, W.M. Structural analysis of *Bacillus licheniformis* 86 surfactant. **Journal of Microbiology**, 6: 243 - 248, 1991.
- INOUE,S.; ITO,S. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactant in alkane fermentation. **Biotechnology Letters**. 4(1) : 3-8,1982.
- ITO, S.; INOUE, S. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: Possible Relation to Alkane Uptake. **Applied and Env. Microbiology**, 43(6) : 1278 - 1283, jun.1982.
- JAVAHERI, M. ;JENNEMAN, G.E.; McINERNEY,J.; KNAPP R.M. Anaerobic Production of a Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied and Environmental Microbiology**, 50(3) : 698-700, 1985.

- JENNEMAN,G.E. ; MCINERNEY, M.J. ; KNAPP, R.M. , CLARK, J.B. ; FEERO, J.M. ; REVUS, D.E. ; MENZIE, D.E. A halotolerant, biosurfactant-producing *Bacillus* species potentially useful for enhanced oil recovery. **Dev. Industrial Microbiology** .24 : 485-492, 1983.
- JENNY, K.; KAPPELI,O.; FIECHTER, A. Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: structural analysis and characterization. **Applied Microbiology Biotechnology**, 36, 5 - 13, 1991.
- JOHNSON,V.; SINGH, M.; SAINI,V.S. Bioemulsifier Production by an Oleaginous Yeast *Rhodotorula glutinis* IIP - 30. **Biotechnology Letters**, 14(6), 487 - 490, jun. 1992.
- KITAMOTO, D. ; AKIBA, S. ; HIOKI, C. ; TABUCHI, T. Extracellular Accumulation of Mannosylerythritol Lipids by a Strain of *Candida Antarctica*. **Agricultural Biologic Chemistry**, 54(1), 31-36, 1990(a)
- KITAMOTO,D. ; HANEISHI, K. ; NAKAHARA, T. ; TABUCHI, T. Production of Manosileritritol Lípides por *Candida antarctica* with Vegetable Oils. **Agricultural Biologic Chemistry**, 54(1), 37-40, 1990.(b)
- KITAMOTO, D. ; YANAGISHITA, H. ; HARAYA, K. ; KITAMOTO, H.K. Contribution of a chain-shortening pathway to the biosynthesis of the fatty acids of mannosylerythritol lipid (biosurfactant) in the yeast *Candida antarctica* : Effect of b-oxidation inhibitors on biosurfactant synthesis. **Biotechnology Letters**, 20(9) : 813-818, 1998.
- KOSARIC,N. Biosurfactants: Production, Properties and Applications. **Surfactant Science Series** vol.48, Edited by Naim Kosaric, New York, 483p.,1990.
- KRACHT, M. ; ROKOS, H. ; ÖZEL,M. ; KOWALL, M. ; PAULI, G. ;VATER, J. Antiviral and Hemolytic Activities of Surfactin Isoforms nd Their Methyl Ester Derivatives. **The Journal of Antibiotics**, 52(7) : 613-619, 1999.

- LIN, S.; JIANG, H. Recovery and purification of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus subtilis* by ultrafiltration. **Biotechnology Technics**, 11(6) : 413-416,1997.
- LIN,S ; LIN,K.; LO, C.; LIN, M. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis*. **Enzyme and Microbial Technology**, 23 : 267-273, 1998.
- LOWRY, O.H. ; ROSEBROUGHT,N.J.; FARR, A.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, 139 : 265-274, 1951.
- MAKKAR, R. S. ; CAMEOTRA, SS. Biosurfactant production by thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, vol. 18, p.37-42, 1997.
- MAKKAR, R. S. ;CAMEOTRA, SS. Utilization of Molasses for Biosurfactant production by two *Bacillus* strains at Thermophilic conditions. **Journal of the American Oil Chemists Society**, 74(7) : 887-889, 1997.
- MAKULA, R.A.; LOCKWOOD, P.J. ; FINNERTY, W.R. Comparative Analysis of the Lipids of *Acinetobacter* Species Gron on Hexadecane. **Journal of Bacteriology**, 121(1) : 250-258, 1975.
- MANZONI,M.; CAVAZZONI,V. Elementi di Biotecnologia delle Fermentazioni. **Appunti dalle lezioni del corso di Biotecnologia delle Fermentazioni**, Università degli Studi di Milano, Italia, 221p., 1998.
- MATTEI, G.; BERTRAND, J-C. Production of biosurfactantd by a mixed bacteria population grown in continuous culture on crude oil. **Biotechnology Letters**, 7(4) : 217-222, 1985.
- MOO-YOUNG, M.; SHIMIZU.T.; WHITWORTH, D. A. Hydrocarbon Fermentation using *Candida Lipolytica*. I: Basic Growth Parameters for Batch and Continuous Culture Conditions. **Biotechnology and Bioengineering**. XIII : 741-760. 1971.

- MULLIGAN, C. ; COOPER,D.G. , NEUFELD, R.J. Selection of microbes producing biosurfactants on media without hydrocarbons. **Journal of Fermentation and Technology**, 62 : 311-314, 1984.
- MULLIGAN, C. ; COOPER,D.G. Pressate from Peat Dewatering as a Substrate for Bacterial growth. **Applied and Environmental Microbiology**, 50(1) : 160-162, 1985.
- MULLIGAN, C.; GIBBS,B.F. Recovery of Biosurfactants by Ultrafiltration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, .47 : 23-29, 1990.
- MULLIGAN, C. ; YONG, R.N. ; GIBBS, B.F. On the Use of Biosurfactants for the Removal of Heavy Metals from Oil-Contaminated Soil. **Environmental Progress** 18 (1) : 50-54, 1999.
- OHNO, A .; ANO, T. ; SHODA, M. Effect of Temperature of Lipopeptide Antibiotics, Iturin A and Surfactin by Dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid Fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 80(5) : 517-519, 1995.
- PAREILLEUX, A . Hydrocarbon Assimilation by *Candida lipolytica*: Formation of a Biosurfactant.; Effects on Respiratory Activity and Growth. **Biotechnology**, 8 : 91-101, 1979.
- PEYPOUX, F. ; BONMATIN, J.M. ; LABBE, H. ; GRANGEMARD, I. ; C. DAS, B. ; PTAK, M. ; WALLACH, J. ; MICHEL, G. [Ala4] Surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by Mass and NMR spectroscopies. **European Journal Biochemistry**, 224 : 89-96, 1994.
- PEYPOUX, F. ; BONMATIN, J.M. ; LABBE, H. ; WALLACH, J. Recents trends in the biochemistry of surfactin.. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 51 : 553-563, 1999.

- PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Short Communication: Production of a biosurfactant exhibiting excellent emulsification and surface active properties by *Serratia Marcescens*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 13(1) : 133-135, 1997(a).
- PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S.S. Short Communication: Production and properties of a biosurfactant synthesized by *Arthrobacter protophormiae*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, 13(1) : 137-139, 1997(b).
- Endomycopsis lipolytica* on Hydrocarbons. **Biotechnology and Bioengineering**, XXI, : 955 - 974, 1979.
- RAZAFINDRALAMBO, H. ; POPINEAU, Y. ; DELEU, M. ; HBID, C. ; JACQUES, P. ; THORNAT, P. ; PAQUOT, M. Foaming Properties of Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis*; Effect of Lipid and Peptide Structural Attributes. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, 46 : 911-916, 1998.
- REESE, E.T. ; MAGUIRE, A. Surfactants as stimulants of enzyme production by microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 17(2) : 242-245, 1969.
- RISTAU, E.; WAGNER, F. Formation of Novel Anionic Trehaloetetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth limiting conditions. **Biotechnology Letters**, 5(2) : 95 - 100, 1983:
- ROSEN, M.J. The Relationship of Structure to Properties in Surfactants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, 49 : 293-297, 1971.
- ROSENBERG, E.; PERRY, A.; GIBSON, D.T.; GUTNICK D. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: specificity of hydrocarbon substrate. **Applied Environmental and Microbiology**, 37 : 409-413, 1979.
- ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High and low-molecular mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 52 : 154-162, 1999.

- ROSSAL, S. Antibiotic derived from *Bacillus subtilis*. **US Patent 5,061,495**, 1991.
- ROY, P.K. ; SINGH, H.D.; BHAGAT,S.D.; BARUAH, J.N. Characterization of Hydrocarbon Emulsification and Solubilization Occuring during the Growth of *Endomycopsis lipolytica* on Hydrocarbons. **Biotechnology and Bioengineering**, XXI : 955 - 974, 1979.
- ROUBIN, M.R. ; MULLIGAN, C.N. Correlation of enhanced surfactin production with decreased isocitrate dehydrogenase activity. **Canadian Journal of Microbiology** vol.35(9) : 854-859, 1989.
- SANTOS, C.F.C ; PASTORE, G.M. Seleção de Linhagem de Levedura produtora de biosurfactante e estudo fermentativo para sua produção. **Dissertação de Tese de Mestrado da Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP,110p.,1997.**
- SANTOS, C.F.C ; PASTORE, G.M. ; DAMASCENO,S. ; CEREDA,M.P. Produção de Biosurfactante por linhagens de *Bacillus subtilis* utilizando manípueira como substrato. **Boletim da SBCTA**, 33(2) : 157-161,jul/dez 1999.
- SHEPPARD, J.D.; MULLIGAN,C. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 27 : 110-116, 1987.
- SHEPPARD, J.D.; COOPER, D.G. The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 35 : 72-76, 1991.
- SIM, L.; WARD, OP. ; LI, Z-Y. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 19 : 232-238, 1997.

- SINGH,M. ; SAINI, V.S. ; ADKIHARI,D.K. Production of emulsifiers by SCP Producing of *Candida tropicalis* during hidrocarbon fermentation. **Biotechnology Letters**, 12(10) : 743 -746, 1990.
- SNEATH,P.H.A. Endospore-forming Gram Positive Rods and Cocci, Genus *Bacillus* In: **BERGEY'S Manual of Systematic Bacteriology**, Ed. Williams and Wilkins, volume 2, p.1104-1138, 1994.
- THIMON,L.; PEYPOUX,F.; DANA,R.M.;MICHEL,G. Surface-Active Properties of Antifungal Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis*. **Journal of American Oil Chemist's Society**, 69 : 92-93, 1992.
- THORNAT, P. ; PAQUOT, M. Foaming Properties of Lipopeptides Produced by *Bacillus subtilis*; Effect of Lipid and Peptide Strucutural Attributes. **J. Agric. Food. Chem.** , 46 : 911-916, 1998.
- TSUGE, K.; ANO, T.;SHODA, M. Isolation of a gene essential for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics plipastatin B1 and surfactin in *Bacillus subtilis* YB8. **Archives of Microbiology**, 165 : 243-251, 1996.
- TSUKAGOSHI, N.; TAMURA, C.; ARIMA, K. A novel protoplastbursting factor (surfactin) obtained from *Bacillus subtilis* IAM 1213. The effects on *Bacillus megaterium* KM. **Biochemistry, Biophysical Acta**, 196 : 204-210, 1970.
- THOMPSON,D.N. ; FOX,S.L. ; BALA, C.A. Biosurfactants from potato process effuents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 84(6) : 917-930,2000.
- ULLRICH,C.; KLUGE,B.; PALACZ,Z.; VATER,J. Cell-Free Biosynthesis of Surfactin, a Cyclic Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*. **Biochemistry**, 30(26) : 6504-6508, 1991.
- VENEZIA, S.N.; ZOSIM,Z.; GOTTLIEB, A.; LEGMAN,R.; CARMELI,S.; RON,E.Z.; ROSENBERG,E. Alasan, a New Bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Applied. Env. Microbiology**, 61(9) : 3240 - 3244, sept.1995.

- VOLLENBROICH, D. ; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma Properties and Application in Cell Culture of Surfactin, a Lipopeptide Antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, 63(1) : 44-49, 1997.
- VATER, J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. **Progress in Colloid & Polymer Science**, 72 : 12-18, 1986.
- VATER, J. Lipopeptides from *Bacillus subtilis* – a class of potent biosurfactants. **Proc. 4th European Congress on Biotechnology**, 3 : 266-270, 1987.
- VATER, J. Lipopeptides, an interesting class of microbial secondary metabolites. **Biologically Active Molecules**. Ed. U.P. Schlunegger, Berlin, p.27-36, 1989
- VATER, J. Cell-Free Biosynthesis of Surfactin, a Cyclic Lipopeptide Produced by *Bacillus subtilis*. **Biochemistry**, 30(26) : 6503-6508, 1991.
- YAKIMOV, M.M. ; TIMMIS, K.N. ; WRAY, V. ; FREDRICKSON, H.L. Characterization of a New Lipopeptide Surfactant Produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied and Environmental Microbiology**, 1706-1713, may 1995.
- WATKINSON, R.J.; MORGAN, P. Physiology of aliphatic hydrocarbon degrading microorganisms. **Biodegradation**, 1 : 79 - 92, 1990.
- WEI, Y.H. ; CHU, I.M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332, **Enzyme and Microbial Technology**, 22 : 724-728, 1998.
- ZHANG, Y.; MILLER, R.M. Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n- Alkanes. **Applied and Environmental Microbiology**, 2247 - 2251, jun.1995.
- ZHOU, Q. ; KOSARIC, N. Utilization of Canola Oil and Lactose to Produce Biosurfactant with *Candida Bombicola*. **Journal of American Oil Chemistry Society**, 72(1): 67-71, 1995.

