

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

SELEÇÃO DE LINHAGEM DE LEVEDURA PRODUTORA
DE BIOSURFACTANTE E ESTUDO FERMENTATIVO
PARA SUA PRODUÇÃO

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

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por CRISTINE FIOR CLEMENTE DOS SANTOS e aprovada pela Comissão Julgadora em 18.02.97.

Campinas, 18 de fevereiro de 1997

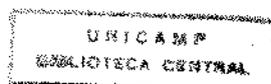
gbru
Profa. Dra. GLAUCIA MARIA PASTORE
Presidente da Banca

Cristine Fior Clemente dos Santos
Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. Gláucia M. Pastore
Orientadora

1997

740/97



UNIDADE	BC
N.º ORÇAMENTO:	
1/1 Unicap	
Sa 59s	
V.º	
30020	
PROG.	281/97
C	<input type="checkbox"/>
D	<input type="checkbox"/>
X	<input type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	06/05/97
N.º CPD	

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

Sa59s

Santos, Cristine Fior Clemente dos ^{iv}
Seleção de linhagem de levedura produtora de
biosurfactante e estudo fermentativo para sua produção /
Cristine Fior Clemente dos Santos. -- Campinas, SP: [s.n.],
1997.

Orientador: Glaucia Maria Pastore [†]
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

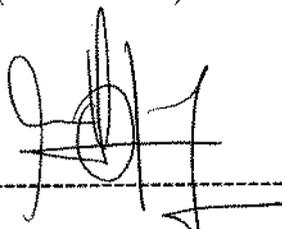
1.Levedura. 2.Fermentação. 3.Hidrocarbonetos.
4.Emulsão. I.Pastore, Glaucia Maria. II.Universidade
Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Gláucia Maria Pastore

(orientadora)



Prof. Dr. Osvair Vidal Trevisan

(membro)



Prof. Dra. Hilary Castle de Menezes

(membro)

Prof. Dr. José Luiz Pereira

(membro)

Campinas, de fevereiro de 1997.

*Aos meus pais,
a minha irmã e a
minha avó Antonieta
Dedico.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À DEUS pela força, coragem e amor,

Ao meu anjo da guarda que sempre se encontra ao meu lado me protegendo,

À Nossa Senhora Aparecida pela força a mim concedida, sem a qual não seria possível a finalização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

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

Aos Professores Osvaldo Vidal Trevisan, Hilary Castle de Menezes e José Luiz Pereira pela dedicada atenção e valioso auxílio na elaboração final deste trabalho,

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

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

Aos funcionários da Secretaria do Departamento de Ciências de Alimentos pela amizade e dedicação,

À Margareth e Débora da Secretaria de Pós-Graduação pela atenção, força e amizade

Aos funcionários da Biblioteca, Creusa, Marli, Cláudia, Geraldo, José e Toninho, pela colaboração e amizade,

Ao Arthur do Setor de Compras pela amizade e atenção,

Ao CNPq, pela ajuda financeira, sem a qual não seria possível a realização deste trabalho,

Ao Antônio Carlos da Biomeriê pela atenção e colaboração,

À Márcia, minha querida amiga, pelos ensinamentos, apoio, carinho e amizade,

À Lilian por sempre ter me ajudado com muito carinho,

À Rosinha pela ajuda,

À Alessandra, do Laboratório de Engenharia pela ajuda e atenção,

À Dora, Paulo, Bia, Gabriela, Contado, Vinícius, Massaharu, Ila Maria, Leila, Marcolino, Eliza, Carlos, Heinz, Maricy, Enilene, Roseli, Cris, Letéia e todos do laboratório de bioquímica pela amizade,

À Ana Lúcia pelo exemplo e amizade,

Às minhas queridas amigas Pitchu, Alessandra, Hamilton e Regina pelo amor, apoio e amizade,

À Alessandro da Engenharia Química pela atenção e ajuda,

E a todos aqueles que durante meu trajeto me prestaram ajuda, carinho e esperança.

Mensagem

Durante esta jornada tive grandes ensinamentos,
Aprendi a enfrentar a vida, e a incerteza,
Por horas cheguei a duvidar de mim,
Senti medo
Enquanto escrevo esta mensagem
Ainda há partes da minha tarefa a ser cumprida
Mas no momento enquanto escrevo estas palavras,
Não me falta coragem para acreditar no amanhã,
Não me falta coragem para acreditar que Deus está
de mãos dadas comigo e por sua obra conheci tantas
pessoas maravilhosas,

Muito Obrigada à todos

Vencer

“Vence aquele que amadurece com as quedas,
Perde aquele que quando cai pensa que não busca
forças para levantar”

“Vence aquele que durante a sede bebe suas próprias lágrimas,
Perde aqueles que as deixa secar”

“Vence aquele que não acredita no impossível
Perde aquele que limita seus próprios horizontes”

“Vence aquele que em algum momento já se alimentou da dor,
Perde aquele que não a deixou penetrar”

“Enfim, não há vencedor, não há perdedor,
Há aquele que acredita apenas no que os olhos vêem,
Há aquele que não precisa dos olhos para enxergar”

Cristine Fior Clemente dos Santos

SUMÁRIO

Recentes avanços da Biotecnologia na última década fizeram com que houvesse um significativo crescimento de interesse no desenvolvimento de métodos biológicos para a produção de certos compostos em escala industrial.

Pesquisas na produção de Biosurfactantes produzidos por microorganismos tem tido um grande aumento nos últimos anos, já que os biosurfactantes tem inúmeras aplicações nos mais diversos segmentos industriais, podendo ser utilizados como emulsificantes, estabilizadores de emulsão, detergentes, solubilizantes de sólidos dispersos, inibidores de corrosão, além de terem vantagens sobre os sintetizados quimicamente por serem biodegradáveis, serem mais efetivos e específicos, e usualmente não são tóxicos.

Na indústria alimentícia os biosurfactantes tem grande aplicação, já que esta é considerada uma das maiores consumidoras de emulsificantes. Eles podem ser utilizados pelas indústrias de panificação, a qual emprega os emulsificantes de tal forma que estes aumentem a aderência do amido à proteína, controlando a consistência e textura do produto, retardando o envelhecimento do produto e também podendo ser utilizados para solubilizarem “flavors” oleosos. Além das indústrias de panificação, os biosurfactantes podem atuar na limpeza de plantas de indústrias alimentícias, removendo resíduos oleosos resultantes dos processos de fabricação, sendo utilizados nas indústrias de óleos, bebidas, frutas e vegetais e nas indústrias que produzem derivados cárneos, atuando tanto na limpeza industrial como no melhoramento da textura de produtos cárneos emulsionados, produzindo uma melhor interação

com as proteínas, melhorando a textura e ajudando na formação da emulsão, como no caso das salsichas.

No entanto, a produção de biosurfactantes tem desejos a serem vencidos como a baixa concentração de produto final obtida no meio de fermentação, raramente excedendo a 10g/l.

Este trabalho teve por objetivo, a seleção de microorganismos capazes de produzirem extracelularmente biosurfactantes, bem como o estudo do processo fermentativo para a melhor linhagem selecionada (T° , pH, concentração de fonte de carbono, concentração de NaCl) e como estas influenciam tanto no crescimento do microorganismo quanto na quantidade de surfactante produzido.

SUMMARY

Recent Advances in Biotechnology in the last decade have led to a significant growth of attention to developments in biological sciences for production of a certain compounds on an industrial scale.

Research on biosurfactants produced by microorganisms has increased greatly in recent years, since such biosurfactants have many applications in several industrial sectors, being used as emulsifiers, emulsion stabilizers, detergents, water binding agents and corrosion inhibitors. They also show advantages over chemically synthesized compounds since they are biodegradable, more specific and effective and usually non-toxic.

In Food Industries, use of biosurfactants shows great applicability, being one of the major emulsifiers. These emulsifiers can be used by the Bakery Industry, which applies them to increase the adherence of starch to protein, controlling the rheology and texture of the products, delaying aging and also solubilizing flavors. Biosurfactants can also be used in the cleaning of food processing plants, removing fat residues resulting from the manufacturing processes, such as the production of vegetable oil, beverages, fruits, vegetables and meat products. In the latter case they can also modify the texture of the products, producing a better interaction with the proteins and aiding in the formation of the emulsion sausages.

However, the production of biosurfactants presents some difficulties, for example, low concentration in the final products obtained through fermentation rarely exceeding 10g/l.

The objective of this research was the selection of microorganisms producing extracellular biosurfactants and the study of the fermentative process of the best strain, establishing the optimum fermentation conditions (T°, pH, concentration of glucose, concentration of NaCl) and how these parameters influence cell growth and the variation in the amounts of surfactants produced.

ÍNDICE GERAL	i
INDICE DE TABELAS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
SUMÁRIO	xii
SUMMARY	xiv
1-INTRODUÇÃO	1
1.1 Propriedades dos Biosurfactantes.....	3
1.2 Biosurfactantes produzidos por Leveduras.....	4
1.3 Produção de Biosurfactantes.....	5
1.3.1 Introdução.....	5
1.3.2 Produção de biosurfactantes em meio contendo hidrocarbonetos.....	5
2-REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3-MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Materiais.....	25
3.1.1 Equipamentos.....	25
3.1.2 Reagentes.....	25
3.2 Métodos.....	26
3.2.1 Seleção de Microorganismos produtores de biosurfactantes.....	26
3.2.2 Seleção das Melhores Linhagens.....	26
3.2.3 Determinação de Tensão Superficial.....	27
3.2.4 Análise da Atividade Hemolítica como indicativo de produção de biosurfactante	27
3.2.5 Estudo do processo fermentativo para a Obtenção de Biosurfactante.....	28

3.2.5.1 Influência da Temperatura de incubação na produção de biosurfactantes.....	29
3.2.5.2 Influência do pH na produção de biosurfactantes.....	29
3.2.5.3 Influência da Concentração de NaCl na produção de biosurfactante.....	30
3.2.5.4 Influência da Concentração de glicose na produção de biosurfactante.....	30
3.2.5.5 Influência da Fonte de carbono na produção de biosurfactante.....	31
3.2.5.6 Influência da Fonte de nitrogênio na produção de biosurfactante.....	31
3.2.5.7 Efeito da concentração de nitrogênio na produção de biosurfactante.....	32
3.2.5.8 Influência da adição de petróleo e hidrocarbonetos com diferentes tamanhos de cadeia na produção de biosurfactantes.....	33
3.2.5.9 Influência do tempo de fermentação na produção de biosurfactantes.....	33
3.3 Produção de biosurfactantes pelo método “Resting Cells”.....	34
3.4 Determinação da Concentração Micelar Crítica.....	35
3.5 Teste de emulsificação.....	36
3.6 Identificação da melhor linhagem selecionada.....	37
3.6.1 Características Morfológicas.....	38
3.6.1.1 Morfologia em meio líquido e sólido.....	38
3.6.1.2 Formação de Pseudomicélio e Micélio verdadeiro.....	38
3.6.1.3 Características sexuais, formação de ascos e ascósporos.....	39
3.6.2 Característica fisiológicas.....	40

3.6.2.1 Teste de Assimilação de Carboidratos.....	40
3.6.2.2 Teste de Assimilação de nitrato.....	41
3.6.2.3 Fermentação de compostos de carbono.....	42
3.6.2.4 Teste de Osmotolerância.....	43
3.6.2.5 Teste de Crescimento a 37°C.....	44
3.6.2.6 Teste de atividade de uréia.....	44
3.6.2.7 Teste de atividade da arbutina.....	44
3.6.2.8 Teste de produção de ácido.....	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
4.1 Pré-Seleção de Microorg. produtores de biosurfactantes.....	46
4.2 Seleção das Melhores linhagens produtoras de biosurfactante.....	47
4.3 Teste de Atividade Hemolítica.....	50
4.4 Estudo Preliminar do processo fermentativo.....	51
4.4.1 Influência da temperatura na Tensão Superficial, e na produção de Massa Celular de de Extrato Bruto de biosurfactante pela linhagem 226.....	52
4.4.2 Influência da concentração de NaCl na Tensão Superficial, e na produção de Massa Celular de de Extrato Bruto de biosurfactante pela linhagem 226.....	53
4.4.3 Influência da concentração de glicose na Tensão Superficial, e na produção de Massa Celular de de Extrato Bruto de biosurfactante pela linhagem 226.....	54
4.4.4 Influência do pH na Tensão Superficial, e na produção de Massa Celular de de Extrato Bruto de biosurfactante pela linhagem 226.....	55

4.4.5 Influência do tempo de fermentação na Tensão Superficial, e na produção de Massa Celular de Extrato Bruto de biosurfactante pela linhagem 226	56
4.4.6 Estudo da Influência de diferentes fontes de carboidratos hidrofílicos na produção de Massa celular pela linhagem 226.....	57
4.4.7 Estudo da Influência de diferentes fontes de carboidratos hidrofílicos na produção de Extrato Bruto de Biosurfactante pela linhagem 226.....	58
4.4.8 Estudo da Influência de diferentes fontes de carboidratos hidrofílicos na Tensão Superficial de Biosurfactante pela linhagem 226.....	59
4.4.9 Estudo da Influência da adição de hidrocarbonetos no meio basal na produção de massa celular.....	60
4.4.10 Estudo da Influência da adição de hidrocarbonetos no meio basal na produção de extrato bruto de biosurfactante	62
4.4.11 Estudo da Influência da adição de hidrocarbonetos no meio basal na tensão superficial produção biosurfactante	64
4.4.12 Estudo da Influência da adição de diferentes fontes de nitrogênio na massa celular.....	65
4.4.13 Estudo da Influência da adição de diferentes fontes de nitrogênio na produção de extrato bruto	66
4.4.14 Estudo da Influência da adição de diferentes fontes de nitrogênio na tensão superficial.....	67
4.4.15 Estudo da Influência da adição de diferentes combinações de fontes de nitrogênio na massa celular.....	68
4.4.16 Estudo da Influência da adição de diferentes combinações fontes de nitrogênio na produção de extrato bruto de biosurfactantes.....	70

4.4.16 Estudo da Influência da adição de diferentes combinações fontes de nitrogênio na produção de extrato bruto de biosurfactantes.....	70
4.4.17 Estudo da Influência da adição de diferentes combinações fontes de nitrogênio na tensão superficial.....	71
4.4.18 Estudo da influência da utilização de ácidos graxos como fonte de carbono na tensão superficial, massa celular e produção de extrato bruto de biosurfactante.....	71
4.4.19 Estudo da influência da adição de minerais da tensão superficial e produção de extrato bruto de biosurfactante.....	73
4.4.20 Estudo da influência da concentração de extrato de levedura como fonte de nitrogênio na massa celular pela linhagem 226.....	74
4.4.21 Estudo da influência da concentração de extrato de levedura como fonte de nitrogênio na produção de extrato bruto de biosurfactante pela linhagem 226.....	75
4.4.22 Estudo da influência da concentração de extrato de levedura como fonte de nitrogênio na tensão superficial pela linhagem 226.....	76
4.4.23 Estudo da influência da concentração de peptona como fonte de nitrogênio na massa celular pela linhagem 226.....	77
4.4.24 Estudo da influência da concentração de peptona como fonte de nitrogênio na produção de extrato bruto de biosurfactante pela linhagem 226.....	79
4.4.25 Estudo da influência da concentração de peptona como fonte de nitrogênio na tensão superficial pela linhagem 226.....	80
4.5 “Resting Cells”.....	82
4.6 Atividade Bioemulsificante do biosurfactante produzido.....	84

4.7 Cálculo da Concentração Micelar Crítica em diluições do meio de cultivo em água destilada.....	89
4.8 Identificação do gênero da linhagem 226.....	94
4.8.1 Característica Morfológicas.....	94
4.8.1.1.Crescimento em meio líquido	94
4.8.1. 2. Crescimento em meio sólido	95
4.8.1.3. Formação de Pseudomicélio e Micélio verdadeiro.....	95
4.8.1.4 Características sexuais, formação de ascos e ascopóros.....	95
4.8.2 Características Fisiológicas.....	98
4.8.2.1. Teste de Assimilação de Carboidratos.....	98
4.8.2.2. Fermentação de compostos de carbono.....	98
4.8.2.3. Teste de Assimilação de nitrato.....	100
4.8.2.4. Teste de Osmotolerância.....	100
4.8.2.5. Teste de Crescimento a 37C.....	101
4.8.2.6. Teste de atividade de uréia.....	101
4.8.2.7. Teste de atividade da arbutina.....	102
4.8.2. 8 Teste de produção de ácido.....	102
5.CONCLUSÃO.....	103
6.BIBLIOGRAFIA.....	105

INDICE DE TABELAS

Tabela I - Microorganismos Produtores de Biosurfactante e tipos de composto produzido.....	2
Tabela II - Exemplos de propriedades de Surfactantes produzidos por microorganismos.....	3
Tabela III - Medida de Tensão Superficial dos meios de cultura das linhagens pré-selecionadas.....	46
Tabela IV - Presença de floculação do biosurfactante após adição de HCl.....	47
Tabela V - Medida de Tensão Superficial dos meios de cultura das linhagens com floculação por precipitação ácida.....	48
Tabela VI - Atividade bioemulsificante utilizando tetradecano e óleo de soja.....	85
Tabela VII- Carboidratos fermentados pela linhagem 226 utilizando o kit API 20C.....	98
Tabela VIII - Tabela de Assimilação de carboidratos.....	99

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Determinação da Concentração Micelar de uma Solução.....	36
Figura 2 - Fotografia das Linhagens 18 e 226 em placas de Petri contendo ágar sangue após 48h. de incubação.....	50
Figura 3 - Estudo do efeito da Temperatura na Tensão Superficial, na produção de Massa Celular e de Extrato Bruto de biosurfactante.....	52
Figura 4 - Estudo do efeito da Concentração de NaCl na Tensão Superficial, na produção de Massa Celular e de Extrato Bruto de biosurfactante.....	53
Figura 5 - Estudo do efeito da Concentração de glicose na Tensão Superficial, na produção de Massa Celular e de Extrato Bruto de biosurfactante.....	54
Figura 6 - Estudo do efeito do pH na Tensão Superficial, na produção de Massa Celular e de Extrato Bruto de biosurfactante.....	55
Figura 7 - Estudo do efeito do tempo de fermentação na Tensão Superficial, na produção de Massa Celular e de Extrato Bruto de biosurfactante.....	56
Figura 8 - Influência da Utilização de diferentes carboidratos na produção de Massa Celular.....	58
Figura 9 - Influência da Utilização de diferentes carboidratos na produção de Extrato Bruto de biosurfactante.....	59
Figura 10 - Influência da Utilização de diferentes carboidratos na Tensão Superficial	60
Figura 11 - Influência da adição de diferentes hidrocarbonetos na produção de Massa Celular.....	61

Figura 12 - Influência da adição de diferentes hidrocarbonetos na produção de Extrato Bruto de biosurfactante.....	63
Figura 13 - Influência da adição de diferentes hidrocarbonetos na Tensão Superficial.....	64
Figura 14 - Influência de adição diferentes fonte de nitrogênio na produção de Massa Celular.....	65
Figura 15 - Influência da adição de diferentes fontes de nitrogênio na produção de Extrato Bruto de biosurfactante.....	67
Figura 16 - Influência da adição de diferentes fontes de nitrogênio na Tensão Superficial.....	68
Figura 17 - Estudo da influência de diferentes combinações de fonte de nitrogênio na produção de Massa Celular.....	69
Figura 18 - Estudo da influência de diferentes combinações de fonte de nitrogênio na produção de Extrato Bruto de biosurfactante.....	70
Figura 19 - Estudo da influência de diferentes combinações de fonte de nitrogênio na Tensão Superficial.....	71
Figura 20 - Influência da Utilização de Ácidos Graxos como fonte de carbono.....	72
Figura 21 - Influência da adição de solução de minerais na Tensão Superficial, na produção de Massa Celular e de Extrato Bruto de biosurfactante.....	73
Figura 22 - Influência da Concentração de extrato de levedura na produção de Massa Celular.....	75
Figura 23 - Influência da Concentração de extrato de levedura na produção de Extrato Bruto de biosurfactante.....	76

Figura 24 - Influência da Concentração de extrato de levedura na Tensão Superficial.....	78
Figura 25 - Influência da Concentração de peptona na produção de Massa Celular.....	79
Figura 26 - Influência da Concentração de peptona na produção de Extrato Bruto de Biosurfactante.....	80
Figura 27 - Influência da Concentração de peptona na Tensão Superficial.....	81
Figura 28 - Influência da Quantidade de inóculo no processo - “Resting Cells”.....	82
Figura 29 - Atividade Bioemulsificante produzido em meios de cultura contendo diferentes fonte de carbono, emulsificados com 2% de óleo de soja e 2% de tetradecano separadamente.....	86
Figura 30 - Emulsão formada pela emulsificação dos meios de cultura contendo (1)glicose, (2) glicerol, (3) sacarose como fonte de carbono, com 2% de óleo de soja e 2% de tetradecano separadamente.....	87
Figura 31 - Emulsão formada pela emulsificação dos meios de cultura contendo (4)maltose, (5)petróleo, (6) n-decano como fonte de carbono, com 2% de óleo de soja e 2% de tetradecano separadamente.....	87
Figura 32 - Emulsão formada pela emulsificação dos meios de cultura contendo (7) tetradecano, (8) dodecano, (9) icosano como fonte de carbono, com 2% de óleo de soja e 2% de tetradecano separadamente.....	88
Figura 33 - Emulsão formada pela emulsificação dos meios de cultura contendo (10) octadodecano como fonte de carbono, com 2% de óleo de soja e 2% de tetradecano separadamente.....	88

Figura 34 - Obtenção da CMC do biosurfactante produzido a partir de glicerol como fontes de carbono e diluições com água.....	90
Figura 35 - Obtenção da CMC do biosurfactante produzido a partir de glicose como fonte de carbono e diluições com água.....	91
Figura 36 - Obtenção da CMC do biosurfactante produzido a partir de glicose com tetradecano como fontes de carbono e diluições com água.....	92
Figura 37 - Microfotografia tirada da linhagem 226 em YM, após 48h. de incubação, corada com azul de metileno.....	96
Figura 38 - Culturas da linhagem 226 inoculadas em placas de Petri contendo YM com 48h. de incubação.....	97
Figura 39 - Culturas da linhagem 226 inoculadas em placas de Petri contendo GYP com 48h. de incubação.....	97

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes são compostos que possuem em sua molécula duas partes funcionais: uma parte hidrofílica, polar e uma hidrofóbica, apolar, geralmente lipofílica. São chamados de biosurfactantes, quando estes compostos são produzidos por microorganismos, leveduras, bactérias e fungos durante um processo fermentativo. O biosurfactante produzido pode ser excretado no meio de cultura ou pode ser produzido intracelularmente pela célula, dependendo dos microorganismos e do meio de cultura utilizado.

Geralmente os biosurfactantes são divididos em cinco classes de compostos: glicolípides, ácidos micólicos, complexos de polissacarídeos e lipídeos, lipoproteínas - lipopeptídeos, fosfolipídeos. Também pode ocorrer modificação da parede celular do microorganismo, a qual passa a adquirir propriedades tensoativas. Tais classes de compostos são definidas de acordo com o balanço entre os componentes hidrofílicos e hidrofóbicos presentes na molécula do biosurfactante produzido. A tabela I descreve exemplos de biosurfactantes produzidos por microorganismos e o tipo de surfactante produzido .

Tabela I: Microorganismos produtores de biosurfactantes e tipo de composto produzido

Microorganismo	Tipo de Surfactante Produzido
<i>Torulopsis bombicola</i>	glicolípide (soforose lípide)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	glicolípide (ramnose lípide)
<i>Bacillus licheniformis</i>	lipoproteína (surfactina)
<i>Bacillus subtilis</i>	lipoproteína (surfactina)
<i>Arthrobacter paraffineus</i>	sacarose e frutose glicolípidos
<i>Arthrobacter</i>	glicolípide
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	glicolípide (ramnose lípide)
<i>Pseudomonas sp. MUB</i>	glicolípide (ramnose lípide)
<i>Torulopsis petrophilum</i>	glicolípide e ou proteína
<i>Candida tropicalis</i>	complexo polissacarídeo - ácido graxo
<i>Corynebacterium lepus</i>	ácidos corinomicólicos
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	lipopeptídeo intracelular

Fonte: Kosaric et alii (1987)

1.1 Propriedades dos Biosurfactantes

Quanto às propriedades que caracterizam os biosurfactantes como compostos tensoativos, podemos citar:

- Os biosurfactantes podem ser iônicos ou não-iônicos, podendo ser solúveis em solventes como o metanol, clorofórmio, acetato de etila, diclorometano e éter etílico.
- Apresentam a capacidade de abaixar a tensão superficial do meio de cultura e a tensão interfacial entre a água e compostos hidrofóbicos.
- Capacidade de formação de micelas onde, em solução as moléculas de surfactantes tendem a se agregar umas com as outras, o que implica na redução da tensão superficial até se atingir a concentração micelar crítica (CMC).

A tabela II ilustra alguns exemplos destas propriedades dos biosurfactantes :

Tabela II. Exemplos de propriedades de surfactantes produzidos por microorganismos :

Surfactante	Tensão Superficial Mínima (mN/m)	CMC (mg/l)	Tensão Interfacial Mínima(mN/m)	CMC (mg/l)
Trealose-6- corinomicolato	32	3	16	2
Raminolípide RL 1	27	10	<1	5
Manose-6- corinomicolato	40	5	19	50
Maltose-6- corinomicolato	33	1	1	20

Fonte: Kosaric et alii (1987)

1.2 Biosurfactantes Produzidos por Leveduras

Geralmente as leveduras são caracterizadas por produzirem biosurfactantes extracelularmente, principalmente quando crescem em meios de cultura contendo hidrocarbonetos como fonte de carbono ou como fator estimulante para a produção de tais compostos.

Um exemplo disso, é a levedura *Candida petrophilum*, a qual quando cresce em n- hexadecano, excreta no meio de cultura um emulsificante com uma molécula proteica rica em L-Asp, L-Glu, L-Ala e L-Leu (Iguchi et al,1969). Outra levedura, a *Endomycopsis lypolitica* Y-13, uma levedura que possui ascósporos, utiliza n-dodecano e n-alcanos para produzir biosurfactantes (Roy et al,1979).

Surfactantes de estrutura pequena e bem definida são formados por espécies de *Torulopsis*. A levedura *Torulopsis magnoliae* quando cresce em meio de cultura contendo glucose, extrato de levedura e uréia produz principalmente dois tipos de glicolípides (Gorin et al,1961).

1.3 Produção de Biosurfactantes

1.3.1 Introdução

Os biosurfactantes podem ser produzidos extra ou intracelularmente.

A produção do biosurfactante em ambos os casos é induzida pela adição ao meio de cultura de compostos lipofílicos, como hidrocarbonetos, ácidos graxos e óleos vegetais. Além disso, os biosurfactantes podem ser produzidos sob condições limitadas de nitrogênio, cátions multivalentes e sob condições limitantes de crescimento como pH e temperatura.

Outro método bastante importante na produção de biosurfactante é o chamado “Resting Cells”, que consiste em primeiro cultivar o microorganismo sob condições ótimas de crescimento, e a seguir a massa celular é transferida para um meio sob condições especiais, as quais induzem a produção de metabólitos secundários por parte do microorganismo durante sua fase estacionária.

1.3.2 Produção de Biosurfactantes em Meio Contendo Hidrocarbonetos

Muitos microorganismos são capazes de crescer em meio de cultura contendo hidrocarbonetos como única fonte de carbono. Leveduras e fungos preferem degradar hidrocarbonetos saturados como os alcanos enquanto as bactérias preferem os hidrocarbonetos insaturados e os aromáticos.

O principal problema da degradação dos hidrocarbonetos através dos microorganismos é a insolubilidade destes compostos em água, o que contraditoriamente é o que estimula a produção do biosurfactante.

As enzimas microbianas capazes de degradar os hidrocarbonetos e utilizá-lo como fonte de energia são integradas à membrana citoplasmática, o que obrigaria a entrada de tais compostos para o interior da célula para que estes pudessem ser metabolizados, no entanto os microorganismos resolveram facilmente este problema. No primeiro caso, é excretado um composto que provoca a emulsificação do hidrocarboneto no meio de cultura, como ocorre com várias espécies de *Torulopsis* (Cutler & Light, 1979; Cooper & Paddock, 1984; Spencer et alii, 1968) e *Pseudomonas* (Guerra-Santos et alii, 1984) e no outro ocorre uma alteração de estrutura da membrana celular, sintetizando surfactantes não -iônicos agregados à parede celular, como é o caso da *Candida lipolytica* e *Candida tropicalis* (Osumi et alii, 1975; Fukui & Tanaka, 1981).

Em ambos os casos citados, o principal objetivo da produção extra ou intracelular de biosurfactantes é facilitar a difusão passiva do hidrocarboneto para o interior da célula.

No entanto, hidrocarbonetos de cadeias inferiores a 14 carbonos, por possuírem uma certa solubilidade no meio de cultura, fazem com que seja possível o crescimento do microorganismo no meio sem que seja necessária a produção de biosurfactante, já que tais compostos acabam sendo metabolizados por mecanismos comuns. No entanto, a produção do biosurfactante, tendo estes compostos como indutores, pode ocorrer, dependendo do tipo de microorganismo.

Hidrocarbonetos com cadeia constituídas de mais que 20 carbonos, dificultam a ação dos microorganismos, já que os hidrocarbonetos durante sua degradação sofrem oxidação nas partes terminais da cadeia, cujo aumento de tamanho exigiria também ataques ao meio dela, o que dificulta mais sua ação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

YOUNG et alii (1971) estudaram o crescimento de *Candida Lypolítica* ATCC 8661 em meio simples contendo n-dodecano como fonte de carbono em fermentação contínua. O objetivo deste estudo foi avaliar experimentalmente o efeito das condições do processo fermentativo na composição celular, velocidade de crescimento e demanda de oxigênio nas células.

PAREILLEUX (1979) estudou uma linhagem de *Candida Lypolítica* a qual mostrou ser produtora de um polímero com propriedades emulsificantes quando cresceu em meio contendo n-tetradecano ou uma mistura de hidrocarbonetos de cadeia linear. Os polímeros recuperados do meio de fermentação foram previamente caracterizados como moléculas complexas tendo em suas estruturas proteínas, lipídeos e uma molécula de carboidrato.

ROY et alii (1979) estudaram uma caracterização comparativa do fenômeno que envolve a emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos durante o crescimento da levedura *Endomycopsis lipolytica* em n-alcenos e alcenos, onde dois mecanismos tem sido propostos como possíveis causas da emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos por compostos com superfície ativa produzidos por microorganismos. Foi medida a atividade do biosurfactante produzido em meio de cultura contendo alcanos e alcenos. Um meio de cultura isento de células foi colocado em contato com 2% de hidrocarbonetos, cuja mistura foi agitada vigorosamente por um minuto, e a seguir foi medida a absorbância da amostra em intervalos de 3 horas a 610 nm a fim de se avaliar a turbidez da emulsão formada pela mistura do meio de cultura com o hidrocarboneto a ser emulsificado.

COOPER et alii (1979) estudaram o crescimento de uma linhagem de *Corynebacterium lepus* em fermentador de bancada, utilizando querosene como fonte de carbono. Foram feitas medidas da concentração micelar crítica (CMC) indicando uma apreciável produção de biosurfactantes, a qual é definida como a concentração necessária de biosurfactante para que haja formação da micela . Após esta concentração a quantidade de biosurfactante produzido pode continuar aumentando mas não há mais abaixamento da tensão superficial do meio. A CMC foi calculada diluindo- se o meio de cultura livre de células sucessivamente e a seguir medindo sua tensão superficial para cada diluição. Após a obtenção dos dados, esta foi estimada traçando-se um gráfico da tensão superficial versus o logaritmo da concentração de biosurfactante presente. As cujas curvas resultantes são plotadas e o ponto de cruzamento entre elas é denominado de concentração micelar crítica (CMC). A composição do biosurfactante foi analisada por cromatografia em camada delgada com vários tipos de solventes . Foi encontrada a presença de seis fosfolipídeos , um lipopeptídeo , um glicolípide e lipídeos neutros .

DUVNJAK et alii (1982) estudaram a produção de biosurfactante através da linhagem de *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558 , quando esta foi inoculada em meio de cultura modificado de sais minerais com hidrocarbonetos com cadeias de C8 a C17 . A concentração miscelar crítica máxima (CMC) foi obtida quando se utilizou hexadecano como fonte de carbono.

Foram testados meios de culturas contendo apenas hidrocarbonetos , glicose ou ambos, como fonte de carbono a fim de se avaliar a produção de biomassa e de surfactante nos diferentes meios de cultura.

Os autores observaram que quando se utilizou glicose ao invés de hexadecano como fonte de carbono, a biomassa produzida foi 60% menor. Além disso quando se utilizou um meio de cultura contendo 4% de glicose com hexadecano houve uma diminuição de 27% para 21% nas concentrações de biomassa e biosurfactantes produzidos.

Foi concluído que no processo de produção de biosurfactante por esta linhagem, a glicose pode ser utilizada como fonte de carbono para o crescimento do microorganismo, porém o hidrocarboneto deve ser adicionado posteriormente ao meio de cultura para estimular então a produção de biosurfactante. Além quando se utilizou apenas glicose como fonte de carbono o biosurfactante foi ligado à parede das células, e quando se utilizou hidrocarbonetos, o biosurfactante foi produzido extracelularmente.

ITO & INOUE (1982) estudaram a produção extracelular de soforolípides por uma linhagem de *Torulopsis bombicola* quando esta foi inoculada em meio de cultura contendo alcanos insolúveis em água. Uma estimulação efetiva foi obtida quando se usou hidrocarbonetos de cadeias contendo de dez a vinte carbonos. Não foi observada influência na produção de biosurfactantes por *Torulopsis bombicola* quando se adicionou ao meio ácidos graxos, glicose, glicerol e álcoois graxos.

INOUE & ITO (1982) estudaram a possível função de soforolípides produzidos por uma linhagem de *Torulopsis bombicola*, investigando sua fermentação em alcanos. Soforolípides e modelos de compostos especificamente relatados estimularam o crescimento da linhagem de *Torulopsis bombicola* em alcanos insolúveis e deviam agir como fator de crescimento específico.

No entanto, os autores relataram que há mais de uma maneira da levedura ser estimulada a incorporar alcanos durante seu crescimento.

KRETSCHMER et alii (1982) estudaram as propriedades tensoativas de compostos lipofílicos produzidos por uma linhagem de *Rhodococcus erythropolis* quando esta cresceu em meio de cultura contendo n-alcanos como fonte de carbono. Treze componentes foram extraídos de culturas de *Rhodococcus erythropolis* com diclorometano-metanol, os quais foram isolados e caracterizados quanto às suas propriedades surfactantes, como a tensão superficial, interfacial e a concentração miscelar crítica. A atividade interfacial do extrato orgânico foi atribuída ao composto α,α -trealose-6'6-dicorinomicolatos o qual reduziu a tensão interfacial de 44mN/m do meio sem inóculo para 18mN/m. Fosfatidiletanolaminas, as quais também se encontravam presentes no solvente orgânico, reduziram a tensão interfacial para valores abaixo de 1mN/m. O composto trealose corinomicplatos, também produzido por esta linhagem de *Rhodococcus erythropolis*, teve uma concentração crítica de micela extremamente baixa quando em soluções altamente salinas, e suas propriedades interfaciais também foram consideradas estáveis quando em pH e concentração de íons adequados.

COOPER & PADDOCK (1983) estudaram a capacidade de uma linhagem de *Torulopsis petrophilum* em sintetizar um surfactante glicolípide ou uma proteína emulsificante dependendo do substrato utilizado. As fontes de carbono utilizadas foram 4% de glicose ou 4% de hexadecano, porém para a produção de glicolípides foi utilizado como fonte de carbono 10% de glicose com adição após o crescimento da linhagem de 9,5% de óleo de milho.

Foi utilizada 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 glicolípide produzido por esta linhagem de *Torulopsis petrophilum*. Os componentes foram visualizados através da revelação do cromatograma com α -naftol.

RISTAU & WAGNER (1983) relataram a produção de ésteres de trehalose aniônicos de *Rhodococcus erythropolis* sob condições limitantes de crescimento. Foi utilizada como fonte de carbono, uma mistura de n-alcenos de C-14 a C-15 ou querosene. A deficiência de nitrogênio, por exemplo, causou a formação de novos glicolípides no meio de fermentação. Os resultados mostraram que sob condições controladas de crescimento, a quantidade de glicolípides aumentou e a composição quantitativa de trahaloselípides pode ser fortemente influenciada por essas variações durante o crescimento de *Rhodococcus erythropolis*.

SANTOS et alii (1984) desenvolveram um processo contínuo para a produção de biosurfactante a partir de *Pseudomonas aeruginosa* DSM2659 com glicose como fonte de carbono. O composto ativo foi identificado como rhamnolípides. Foi verificado que a formação do surfactante é decisivamente influenciada pela composição e concentração dos componentes do meio. Na presença de extrato de levedura, a produção foi baixa, sendo que a produção mais alta foi encontrada utilizando-se nitrato como fonte de nitrogênio e a proporção ótima carbono : nitrogênio encontrada foi 18. A concentração de ferro precisou ser minimizada para 27,5 μg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ por grama de glicose. Proporções de carbono : fosfato menores que 16 foram as que proporcionaram maior produção de rhamnolípides.

Com um meio contendo 18,2g de glicose por litro , foi obtida uma concentração de biosurfactante de 1,5 g/l no meio de cultura livre de células , que quando comparada com a concentração obtida nos processos em batelada , foi possível concluir, de acordo com os autores, que a produção de biosurfactante nos processos contínuos obtida neste estudo foi mais eficiente . Os autores concluíram que esta produção pode ser ainda aumentada através do desenvolvimento de processos de melhoramento da linhagem .

KOSARIC et alii (1984) estudaram processos para a produção de soforose utilizando águas residuárias urbanas, devido a rica quantidade de carboidratos presentes e pelo fato destes serem convertidos em triglicerídeos por organismos oleaginosos, e também por linhagem de *Torulopsis bombicola* . Esta linhagem converte estes lipídeos em soforolipídeos, onde a quantidade produzida pode variar dependendo da estratégia de produção.

COOPER & PADDOCK (1984) estudaram dois tipos de fontes de carbono - carboidratos e óleos vegetais como fator estimulante para se obter grandes quantidades de biosurfactantes por *Torulopsis bombicola* ATCC 22214.

A maioria do surfactante é produzido no final da fase logarítmica de crescimento. Isto torna possível que a levedura cresça em uma fonte de carbono simples e então foi adicionado outro tipo de substrato que estimulou a produção de surfactante, a produção máxima desta ocorreu depois da fase exponencial de crescimento, ou seja, no início da fase estacionária. O produto obtido por esta linhagem , que cresceu nestas duas fontes de carbono, foi caracterizado como uma mistura de glicolípides. A máxima produção foi de 70g/l ou 35% do peso do substrato utilizado.

MULLINGAN & COOPER (1985) consideraram a possibilidade de se usar água residuária que é descartada da secagem de adubo . Esta água residuária contém significantes teores de carboidratos glicose, galactose e xilose e alguns aminoácidos como substratos para o crescimento microbiano para a produção de surfactante por *Bacillus subtilis*.

COOPER & GOLDENBERG (1987) estudaram duas espécies de *Bacillus sp.*, a linhagem IAF 343 e a linhagem IAF 346, as quais se mostraram capazes de produzir biosurfactantes de diferentes estruturas.

A linhagem de *Bacillus sp* IAF 343 se mostrou capaz de produzir extracelularmente biosurfactante quando inoculada em meio contendo substratos insolúveis, cuja produção de 1g/L foi considerada apreciável em relação a produção da maioria de biosurfactantes anteriormente estudados. No entanto o lipídeo neutro produzido pela linhagem IAF 343 não apresentou a propriedade de diminuir a tensão superficial da água. A outra linhagem de *Bacillus cereus*, IAF 346, inoculada em meio de cultura de mesma composição produziu um biosurfactante convencional formado por polissacarídeos. O biosurfactante produzido continha quantidades substanciais de glucosamina, a qual mostrou capacidade de diminuir a tensão superficial da água de 72mN/m para 28mN/m.

HOMMEL et alii (1987) estudaram a produção de uma mistura de biosurfactantes solúveis em água por fermentação em meio contendo n-alcanos e carboidratos por *Torulopsis bombicola* com valores para tensão superficial em torno de 30mN/m e para tensão interfacial de 1mN/m.

A maioria dos biosurfactantes foram produzidos no final da fase exponencial e no começo da fase estacionária. A produção de biosurfactantes é aumentada com o uso de compostos hidrofóbicos como fonte de carbono.

ASMER et alii (1988) cultivaram a linhagem ATCC 22214 de *Torulopsis bombicola* em meio contendo uma mistura de glicose e ácido oleico, denominado meio A, e em meio contendo apenas ácido oleico, denominado meio B, onde a linhagem produziu grandes quantidades de soforolípides. No caso do substrato A, foram obtidas 38g/l de surfactante bruto, e no meio com o substrato B, 77g/l.

VENKATA & KARANTH (1989) estudaram a produção de glicolípides através da linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6, pelo método de “Resting Cells”, no qual o microorganismo é previamente colocado em meio de crescimento, onde ele atinge sua fase logarítmica, e depois é transferido para um meio que induza a produção do biosurfactante.

Neste estudo, a linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 teve sua produção inibida quando transferida após crescimento para um meio contendo fosfato inorgânico, mostrando que para a produção de glicolípides, o meio de cultivo a ser utilizado deveria ser isento de fosfato inorgânico.

PALEJWALA & DESAI (1989) observaram uma significativa produção de biosurfactante através de uma linhagem de bactéria gram negativa, cuja produção de tensoativo ocorria após sua fase logarítmica de crescimento, quando esta era cultivada em meio contendo no mínimo 115 unidades/mL de etanol. No entanto foi verificado que a produção de biosurfactante se tornou mais efetiva em meio de cultura contendo uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos.

WATKINSON & MORGAN(1990) estudaram aspectos fisiológicos e bioquímicos da biodegradação microbiana de alcanos, sendo esta maior do que a ocorrida com metano, alcenos e alcinos. Foram analisados vários fatores envolvidos no processo de degradação de hidrocarbonetos como o substrato utilizado, os passos metabólicos para a quebra das ligações duplas dos alcenos, aspectos genéticos da regulação, co-oxidação de hidrocarbonetos alifáticos, potencial de degradação anaeróbica de hidrocarbonetos e o potencial para sua aplicação em biotecnologia.

KITAMOTO et alii (1990) isolaram uma linhagem de levedura proveniente de um exudado de árvore, e observaram que ela acumulava biosurfactantes abundantemente quando crescia em óleo de soja como fonte de carbono.

Os biosurfactantes foram encontrados como uma mistura de quatro manosileritritol lípides, onde dois deles se mostraram mais abundantes. O maior componente encontrado correspondeu a 80% do total de lípides produzido e foi identificado como 4-O-(di-O-acetil-O-alcanoil- β -O-manopiranosil)eritritol. A linhagem de levedura produtora destes compostos foi identificada como *Candida antarctica*.

KITAMOTO et alii (1990) estudaram ou três linhagens de *Candida antarctica* que foram caracterizadas como produtoras de biosurfactantes, constituídos por uma mistura de quatro manosilleritritol lípides. Eles foram similares aos compostos produzidos pela linhagem isolada T-34, a qual foi classificada como a melhor produtora de lípides em relação ao total produzido. A linhagem produziu lípides utilizando vários óleos vegetais como fonte de carbono, mas não teve bom desempenho com n-alcanos ou carboidratos.

A suplementação com extrato de levedura aumentou a produção de lípidos. Sob condições ótimas com fermentação em agitador, a concentração do total de lípidos produzido foi de 40g/l após 8 dias de fermentação.

SINGH et alii (1990) estudaram a produção de um biosurfactante por uma linhagem de *Candida tropicalis*, quando esta crescia em cultura contendo hidrocarbonetos como fonte de carbono, exibindo a produção de um biosurfactante extracelularmente. O emulsificante mostrou atividade contra vários hidrocarbonetos. Altas atividades do emulsificante foram obtidas em meio contendo condições limitantes de nitrogênio.

HOMMEL (1990) estudaram a formação e função fisiológica da produção de biosurfactantes por microorganismos utilizando hidrocarbonetos. Foi verificado que o crescimento microbiano utilizando-se fontes de carbono insolúveis em água, como os hidrocarbonetos, é acompanhado por alterações metabólicas e estruturais das células. O aparecimento de biosurfactantes no meio de cultura é com frequência visto como pré - requisito para o início das interações de hidrocarbonetos com as células. Sob este ponto de vista, a produção de biosurfactantes por hidrocarbonetos utilizando microorganismos, suas estruturas e propriedades físico - químicas são revistas. A produção destes compostos é mais comumente conectada com limitações de crescimento no final da fase exponencial e no início da fase estacionária, onde enzimas específicas são induzidas ou reprimidas. A adição de biosurfactantes purificados em culturas microbianas resultou na inibição assim como no estímulo de compostos tensoativos .

HOROWITZ et alii (1990) estudou o isolamento de surfactantes proveniente de espuma produzida durante o crescimento de uma linhagem de *Bacillus licheniformis* 86. O surfactante foi precipitado do meio de cultura através de precipitação ácida e extraído a seguir com tetrahidrofurano ou metanol. O surfactante produzido foi caracterizado como aniônico e apresentou solubilidade em tetrahidrofurano, metanol, clorofórmio, diclorometano, xileno, tolueno e água alcalina. O surfactante apresentou a propriedade de diminuir a tensão superficial da água de 72mN/m para 27mN/m, e a concentração miscelar crítica encontrada foi em torno de 10µg surfactante/mL. A tensão interfacial obtida quando se mediu o surfactante em 4% de cloreto de sódio contra n-hexadecano foi 0,36 mN/m.

Quanto às condições de fermentação, o surfactante se mostrou estável numa faixa de pH de 4,0 a 13,0, e de temperatura de 25 a 120°C, bem como em soluções com porcentagens de NaCl entre 0 e 30%.

Além disso, análises preliminares classificaram o surfactante produzido como uma mistura de lipolípides, diferentes dos tipos de surfactantes já produzidos por outras espécies de *Bacillus*.

JENNY et alii (1991) isolaram compostos com propriedades tensoativas de uma linhagem de *Bacillus licheniformis* e trabalharam na elucidação de sua estrutura. Foram encontrados, por fazerem parte da estrutura do composto, traços de ácidos graxos saturados de cadeia longa, principalmente o ácido palmítico e o esteárico, uma pequena quantidade de hidrocarbonetos de cadeia de 20 a 22 carbonos, e principalmente uma quantidade apreciável de quatro diferentes lipopeptídeos.

Quinze miligramas do composto purificado foram capazes de diminuir a tensão superficial da água de 72mN/m para 27mN/m, mostrando ser este um composto com grande poder tensoativo quando comparado com outros biosurfactantes já estudados anteriormente. Além disso o surfactante mostrou atividade antibiótica contra bactéria e leveduras.

JOHNSON et alii (1992) isolaram uma linhagem de *Rhodoturola glutinis* IIP - 30, a qual se mostrou grande produtora de um agente emulsificante extracelular quando foi fermentada em fermentador de bancada, cujo meio era composto de glicose, sob condições limitadas de nitrogênio, temperatura de 30°C e pH 4,0. Além de produzir um emulsificante extracelular, a linhagem acumulou intracelularmente uma quantidade significativa de lípides.

A atividade do emulsificante produzido foi medida colocando-se 10 mL do meio de cultura centrifugado e filtrado em membrana millipore 0,45µm, em contato com 0,2mL do composto a ser emulsificado (óleo bruto, hidrocarbonetos e querosene), cuja mistura foi agitada vigorosamente em agitador, e a seguir foi medida sua absorbância a 610nm.

HOMMEL & HUSE (1993), estudaram a produção de grandes quantidades de biosurfactantes do tipo soforose lípides durante a fase estacionária por *Candida apicola* quando esta cresceu em glicose, frutose ou sacarose. Em contraste não houve produção de soforose lípides com galactose ou maltose, independentemente se havia adição de hidrocarbonetos ou não, fazendo com que a degradação de hidrocarbonetos não seja um pré-requisito para a biossíntese de biosurfactantes.

DAVILA et alii (1994) estudaram o potencial de uma possível aplicação industrial de soforolípides produzidos por uma linhagem de *Candida bombicola* CBS 6009, produzidos a partir de glicose como fonte de carbono, e uma fonte lipídica como precursora da produção do biosurfactante. Os autores estudaram a influência do co-substrato lipídico sob vários aspectos quanto a produção de glicolípides. Foi utilizado um fermentador de bancada, no qual, além de co-substratos lipídicos, se utilizou também n-alcenos, ácidos graxos metílicos ou ésters etílicos e óleos vegetais e gordura animal, com a finalidade de se avaliar a influência deste na estrutura do biosurfactante produzido. Em termos de produção, os melhores substratos encontrados foram os óleos ou ésteres ricos em ácidos graxos com cadeias de 18 carbonos (C18 E C18:1). Além disso foi conseguida uma ótima produção de 340g/L de biosurfactante quando se utilizou ésteres como precursores da produção de biosurfactantes.

LIN et alii (1994) estudaram a produção de biosurfactantes através da linhagem de *Bacillus licheniformis* JF-2 sob condições aeróbicas e anaeróbicas de fermentação. O biosurfactante produzido após ter sido purificado e homogenizado foi analisado por HPLC para análise de sua composição. Mostrou-se tratar de um lipolípide com peso molecular de 1035. As análises de aminoácidos e espectrometria de massa mostraram a presença de uma molécula peptídica bastante similar à existente na surfactina, um lipopeptídeo produzido por *Bacillus subtilis*. Sob boas condições de processo, a concentração micelar crítica encontrada para o biosurfactante produzido foi de 10mg/L e a tensão interfacial contra o decano de 6×10^{-3} mN/m.

VENEZIA et alii (1995) reportaram a produção de um agente emulsificante extracelular, denominado Alasan, por *Acinetobacter radioresistens* KA53. O emulsificante bruto foi concentrado do meio de cultura livre de células por precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, obtendo-se um total de 2,2g/l. Este bioemulsificante estabiliza uma variedade de emulsões óleo-em-água, incluindo n-alcanos acima de 10 carbonos na cadeia, parafina líquida, óleos de soja e de côco e óleo bruto. Alasan mostrou ser de 2,5 a 3 vezes mais ativo após ser tratado a 100°C, sob condições neutras ou alcalinas.

Os autores concluíram que, por essas propriedades, esse bioemulsificante tem um grande potencial de aplicações, dentre elas, na indústria de cosméticos e de alimentos.

ASHTAPUTRE & SHAH (1995) estudaram um exopolissacarídeo viscoso produzido por uma linhagem de *Sphingomonas paucimobilis* GS-1 capaz de emulsificar compostos como xileno, benzeno, 2-metilnaftaleno, hexadecano, hexano, querosene, óleo de parafina, óleo castor, de côco, de oliva quando utilizados na concentração de 1mg/mL. O emulsificante produzido foi capaz de estabilizar emulsões mais eficientemente que gomas como a arábica, caraya, tragacanti e xantana. As emulsões se mantiveram estáveis por seis meses, entre temperaturas de 4 a 40°C e numa faixa de pH entre 4,0 e 10,0, na presença de concentrações de NaCl superiores a 50g/L. O polissacarídeo não apresentou toxicidade quando testado em ratos através de testes usados sob diretrizes da OMS.

ZHANG & MILLER (1995) estudaram o efeito da degradação de alcanos por raminolípídeos produzidos por espécies de *Pseudomonas*.

Dois di-raminolípídeos foram estudados, um metil éster (dR-Me), e um na forma ácida (dR-A). Estes raminolípídeos apresentaram diferentes propriedades quanto a tensão interfacial, solubilidade e carga elétrica. Por exemplo, a tensão interfacial entre o hexadecano e a água foi reduzida para menos de 0,1 mN/m para o composto na forma éster (dR-Me), e para somente 5 mN/m pelo composto com a forma ácida (dR-A).

A solubilização e biodegradação de dois alcanos em diferentes estados físicos, líquido e sólido, foram realizados pelos dois raminolípídeos em concentrações entre 7 a 70 g/L. Compostos na forma éster (dR-Me), produzidos por sete linhagens diferentes de *Pseudomonas*, degradaram o hexadecano (líquido) e o octadecano (sólido).

Oito linhagens testadas, as quais exibiram alta hidrofobicidade na superfície celular, degradaram o hexadecano na forma líquida, mas tiveram a degradação do octadecano na forma sólida inibida.

Já os compostos na forma ácida (dR-A), degradaram o hexadecano um pouco mais que os compostos na forma dR-Me, e no caso do octadecano somente as linhagens com baixa hidrofobicidade na superfície celular é que foram capazes de degradá-lo.

BANAT (1995) estudou as várias vantagens de se utilizar biosurfactantes ao invés dos surfactantes químicos devido a sua alta biodegradabilidade e baixa toxicidade.

Várias indústrias como as de petróleo e outras como as de cosméticos e as alimentícias teriam grandes aplicações para os biosurfactantes como no tratamento de águas residuárias, remoção do óleo residual, limpeza de lugares contaminados com metais como solos e águas residuárias entre outras vastas aplicações.

No entanto estas indústrias se mostravam um tanto relutantes na utilização destes compostos devido ao fato destes serem produzidos por microorganismos.

ZHOU & KOSARIC (1995) estudaram os pré-requisitos para o processo de fermentação industrial de biosurfactantes incluindo o uso de substratos de baixo ou isentos de custo, visando a conversão máxima destes em produto final. Sob condições competitivas, é esperado que o preço do óleo de canola caia em relação ao aumento do preço de outros. A lactose, obtida do soro de queijo, é um sub-produto da indústria alimentícia. Neste trabalho, o óleo de canola juntamente com a glicose ou lactose foram utilizados como fontes de carbono para a produção de soforose lípides por uma linhagem de *Candida bombicola*. As fermentações foram conduzidas em shakers ou em um reator Bellco 1 L, por um período de 5 a 7 dias, a 450rpm e a 30°C. A produção de biosurfactantes chegou a 150 - 160g/l em meio contendo 10% de glicose, 10,5% de óleo de canola, 0,1% de uréia e 0,4% de extrato de levedura. Quando a lactose foi substituída por glicose, 90 - 110g/l de biosurfactante foram obtidas. O composto apolar 17-L-(2'-O-β-D-glucopyranosil-β-D-glucopyranosil)-ácido octadecanóico 1'-4''-lactona 6',6''-diacetato foi o componente encontrado em maior quantidade, 73%. Quando o óleo de canola foi substituído por óleo de girassol, os compostos acima constituíram apenas 50% do total de biosurfactantes produzidos.

DESHPANDE & DANIELS (1996) estudaram o uso de gordura animal resultante de processos das indústrias de carnes como substrato para a produção de soforolípides por *Candida Bombicola*. Foi utilizado um meio de cultura contendo glicose, gordura animal, sulfato de amônio, água de maceração de

milho, uréia e fosfato de potássio, cujo meio foi otimizado visando o máximo crescimento da linhagem. A gordura animal e a glicose foram utilizadas como fontes de carbono, e a água de maceração de milho foi utilizado para fornecer vitaminas e minerais.

O crescimento máximo da linhagem foi obtido a 30°C, mas a produção máxima de soforolípides ocorreu a 27°C. O fermentador foi mantido em pH 3,0 - 4,0 . A produção de soforolípides após 68 horas foi de 120g/l.

Uma coluna cromatográfica contendo sílica gel foi utilizada para separar seis componentes , sendo que o composto presente em maior quantidade correspondia a 45% do total de biosurfactante produzido. As células no final da fermentação apresentaram 37% de proteínas e 14% de lipídeos. A análise de aminoácidos revelou a alta qualidade da proteína, embora fossem encontrados baixos níveis de triptofano. A redução do tempo de produção e o uso de substratos de baixo custo de materiais “in natura”, fizeram com que a produção de soforolípides se tornasse competitiva em relação a outros surfactantes, podendo este biosurfactante ser utilizado em indústrias alimentícias e de cosméticos.

MURIEL et alii (1996) estudaram a produção extracelular de um biosurfactante por linhagem de *Cladosporium resinae* quando esta cresceu em meio de cultura contendo hidrocarbonetos e o combustível JP8 como fontes de carbono. A produção de biosurfactantes foi observada devido a redução da tensão superficial do meio de cultura bem como através do aumento de espuma e propriedades emulsificantes pertencentes ao composto produzido.

O meio de cultura contendo o combustível JP8 foi o que proporcionou melhor crescimento às culturas utilizadas onde a tensão superficial do meio diminuiu de 72mN/m para 50mN/m após 25 dias de fermentação.

Uma purificação parcial dos compostos de propriedades emulsificantes e surfactantes obtidos pela linhagem de *Cladosporium resinae* foi feita através do fracionamento da espuma presente no meio de crescimento com solventes orgânicos clorofórmio - metanol (2:1), onde a fase diluída em clorofórmio foi concentrada por evaporação e a seguir diluída em água. Em seguida foi realizada uma cromatografia em fase reversa em coluna C18. A tensão superficial da fração de espuma extraída para purificação foi de 40mN/m.

OSMAN et alii (1996) estudaram a produção de biosurfactantes raminolípides, glicolípides e de piocianina quando uma linhagem de *Pseudomonas BOP100* cresceu em meio de cultura contendo etanol como fonte de carbono. A piocianina foi produzida durante a fase exponencial, enquanto o biosurfactante foi produzido na fase estacionária, indicando que os dois compostos são produzidos por mecanismos e caminhos totalmente diferentes. A máxima produção foi obtida quando se utilizou meio de cultura contendo 3% de etanol, tendo produzido 3g/L de raminolípides e 0,2g/L de piocianina.

CARRILLO & MARDARAZ (1996) usaram a capacidade hemolítica de certos microorganismos como critério para um prévio isolamento de bactérias produtoras de biosurfactantes. Somente 37 das 492 linhagens isoladas de diferentes origens tiveram atividade hemolítica. As 37 linhagens e mais 49 não-hemolíticas tiveram sua capacidade tensoativa estudada. Somente cinco das linhagens testadas, todas com capacidade hemolítica, obtiveram teste positivo, indicando uma possível ligação entre a capacidade hemolítica da linhagem com a produção de biosurfactantes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 EQUIPAMENTOS

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

3.1.2 REAGENTES

- Glicose, sacarose, maltose, lactose, amido, galactose MERCK
- Melaço comercial
- Petróleo bruto cedido pela Petrobrás - reservatório Dom João
- Hidrocarbonetos (n-decano, tetradecano, hexadecano, octadecano, icosano e octadodecano) SIGMA
- Extrato de levedura DIFCO
- Peptona DIFCO
- Extrato de malte MERCK
- Sais como NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, uréia, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 , NaCl MERCK

3.2 MÉTODOS

3.2.1. Seleção de Microorganismos Produtores de Biosurfactantes

Foram testadas 322 linhagens, 230 isoladas de frutas, flores, e vegetais da região de Campinas, SP e de Monte Belo, MG, e as 92 linhagens restantes já pertenciam a coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica de Alimentos da FEA - UNICAMP. As linhagens foram repicadas em meio "Yeast Malt", para o crescimento de leveduras. Das 322, foram pré-selecionadas 13 linhagens de leveduras por apresentarem bom crescimento, as quais foram testadas quanto a capacidade de abaixar a tensão superficial do meio de fermentação composto de : 1% glicose, 5% NaCl, 0,1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,025% MgSO_4 , 0,05% de extrato de leveduras e 1% de solução de sais (composição em g/l: MnSO_4 3,00; FeSO_4 0,10; CaCl_2 0,10; CoCl_2 0,10; ZnSO_4 0,10; CuSO_4 0,01; H_3BO_4 0,01; NaMnO_4 0,01) em tampão fosfato 0,2M - pH7,0.

3.2.2. Seleção das melhores linhagens

As linhagens puras, que quando cultivadas tiveram redução da tensão superficial do meio de cultivo, foram centrifugados a 8000 rpm por 10min e a massa celular quantificada através da determinação de peso seco em estufa por 24h. a 105°C.

O sobrenadante centrifugado foi acidificado com HCl 1N até pH 2,0 e deixado em repouso por 24h a 5°C para que ocorresse a precipitação do biosurfactante produzido. As linhagens que apresentaram a floculação do biosurfactante pelo método de precipitação ácida, foram novamente

fermentadas e submetidas a novas medidas de tensão superficial do meio após fermentação. As medidas foram realizadas com células e sem células, após centrifugação. A linhagem que apresentou maior redução de tensão superficial foi escolhida.

3.2.3. 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 40,0mm, comprimento de 19,9mm e espessura de 0,10mm, denominada placa de Wilhelmy.

As condições de análise foram pré-estabelecidas por tentativa, sendo padronizadas para todo ensaio com as seguintes condições: volume médio da amostra 50ml, temperatura, ambiente, intervalos de medidas de 15segundos, 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 a tensão superficial da água destilada cujo valor é em torno de 72mN/m.

3.2.4. Análise da Atividade Hemolítica como Indicativo da Produção de Biosurfactante

A linhagem que apresentou maior redução da tensão superficial, maior quantidade de extrato bruto produzido e melhores condições de

crescimento, foi inoculada em placas de Petri contendo 4% de ágar sangue e 5% de sangue de carneiro desfibrilado.

O sangue de carneiro foi adicionado ao ágar previamente autoclavado quando este se encontrava numa faixa de temperatura entre 45°C e 50°C, onde a seguir as placas foram incubadas por 48h a 30°C.

Após o período de incubação, o teste foi analisado como positivo se em torno das colônias que cresceram houve a formação de um halo transparente e a descoloração do meio indicará que houve hemólise do sangue e consequentemente produção de biosurfactante.

3.2.5. Estudo do Processo Fermentativo para a Obtenção de Biosurfactante

Foram analisados vários parâmetros do processo fermentativo, visando o aumento da produção de biosurfactante. Para tal estudo, utilizou-se um meio de cultivo composto de: 1% de glicose, 5% de NaCl, 0,1% (NH₄)SO₄, 0,025% MgSO₄, 0,05% 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 - pH7,0, o qual foi submetido a variações nas condições de fermentação, como tempo de fermentação, temperatura e pH, a fim de verificar como as linhagens se comportavam em relação ao crescimento celular e produção de biosurfactantes quando em novas condições.

3.2.5.1. Influência da Temperatura de Incubação na Produção de Biosurfactantes

As linhagens selecionadas foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 250ml contendo 50ml do meio 1% de glicose, 5%de NaCl, 0,1%(NH₄)SO₄, 0,025%MgSO₄, 0,05% de extrato de leveduras e 1% de solução de sais(cuja composição em g/l será: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 - pH7,0 e incubadas em diferentes temperaturas, tais como 25°C, 30°C, 40°C e 45°C.

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

3.2.5.2. Influência do pH na Produção de Biosurfactantes

As linhagens selecionadas foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 250ml contendo 50ml do meio 1% de glicose, 5%de NaCl, 0,1%(NH₄)SO₄, 0,025%MgSO₄, 0,05% de extrato de leveduras e 1% de solução de sais(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 em diferentes pHs tais como 6,0, 6,5, 7,0 e 8,0.

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

3.2.5.3. Influência da Concentração de NaCl na Produção de Biosurfactantes

As linhagens selecionadas foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 250ml contendo 50ml do meio composto de: 1% de glicose, 0,1%(NH₄)SO₄, 0,025%MgSO₄, 0,05% de extrato de leveduras e 1% de solução de sais(cuja composição em g/l será: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 - pH7,0, com diferentes concentrações de NaCl tais como 0%, 1%, 3% e 5%, sendo utilizado neste experimento a melhor temperatura e o melhor pH 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.

3.2.5.4. Influência da Concentração de Glicose na Produção de Biosurfactantes

As linhagens selecionadas foram inoculadas em frascos Erlenmeyers de 250ml contendo 50ml do meio com 5% de NaCl, 0,1%(NH₄)SO₄, 0,025%MgSO₄, 0,05% de extrato de leveduras e 1% de solução de sais(cuja composição em g/l será: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 com diferentes concentrações de glicose como 0%,1%,3%,5% e7%.

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

descrito nos itens anteriores. Neste experimento foi utilizada a melhor temperatura e o melhor pH encontrados em testes realizados anteriormente.

3.2.5.5. Influência da Fonte de Carbono na Produção de Biosurfactantes

As linhagens foram testadas na melhor temperatura, melhor concentração de NaCl e melhor pH resultantes de testes previamente realizados.

Neste experimento, foram testadas diversas fontes de carbono, em concentração igual à concentração de glicose que tenha levado a uma maior produção de biosurfactante, resultante de teste realizado anteriormente a este. As fontes testadas foram: sacarose, maltose, lactose, galactose, frutose, melão e glicerol.

A seguir foi medida a tensão superficial do sobrenante centrifugado, e foi quantificada a massa celular e o extrato bruto resultante da acidificação com HCl por diferença de peso seco, onde a secagem foi feita por 24h a 105°C, como descrito anteriormente.

3.2.5.6. Influência da Fonte de Nitrogênio na Produção de Biosurfactantes

Foram testadas várias fontes de nitrogênio no meio de cultivo, para a linhagem selecionada na concentração de 0,1%. Neste experimento foram utilizadas como condições do processo fermentativo, a melhor temperatura, concentração de NaCl e pH, obtidos de testes realizados previamente a este.

Para a fonte de nitrogênio que induziu uma maior produção de biosurfactante foi feito um estudo da concentração mais adequada, visando um bom crescimento da linhagem e uma boa produção de biosurfactante.

As fontes testadas foram : uréia, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, peptona, peptona + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, peptona + NaNO_3 , peptona + extrato de levedura, peptona + extrato de levedura + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de levedura + NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + extrato de levedura + NaNO_3 e extrato de levedura + peptona + NaNO_3 + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. É importante lembrar que a fonte de nitrogênio a ser substituída é composta por 0,05% de extrato de levedura + 0,01% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

3.2.5.7. Efeito da Concentração de Nitrogênio na Produção de Biosurfactante.

Com a fonte de nitrogênio que mostrou ser a mais indicada para a produção de biosurfactante, foi feito um estudo de concentração, sendo que o processo fermentativo utilizou as melhores condições já testadas como teor de glicose, NaCl , temperatura e pH. Neste ensaio foram testados extrato de levedura e peptona nas seguintes concentrações: 0,005%, 0,01%, 0,03%, 0,05%, 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1,0%, em meio de cultivo contendo também, 0,025% de MgSO_4 e 1% da solução de minerais.

Para todas as porcentagens testadas foram feitas medidas de tensão superficial no sobrenadante centrifugado e foram feitas determinações quantitativas de massa seca e extrato bruto.

3.2.5.8. Influência da Adição de Petróleo e de Hidrocarbonetos com Diferentes Tamanhos de Cadeia na Produção de Biosurfactantes

As linhagens selecionadas foram inoculadas em frascos Erlenmeyer de 250ml contendo 50ml do meio com a melhor concentração de glicose, NaCl, temperatura e pH obtidas em testes anteriores, além de 0,1%(NH₄)SO₄, 0,025%MgSO₄, 0,05% de extrato de leveduras e 1% de solução de minerais(cuja composição em g/l será: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 .Foram testados hidrocarbonetos de cadeia saturada e linear (alcanos) de diferentes tamanhos (petróleo, C10, C14, C16, C18, C20 e C28). Para todos os meios constituídos dos diferentes tipos de hidrocarbonetos foi medida a tensão superficial das amostras centrifugadas e a massa celular e o extrato bruto isento de resquícios de hidrocarboneto foram quantificados conforme descrito anteriormente.

3.2.5.9. Influência do Tempo de Fermentação na Produção de Biosurfactantes

A linhagem selecionada foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 250ml contendo 50ml do meio basal dentre das condições otimizadas para o processo fermentativo, tais como a melhor concentração de glicose, NaCl, fonte de nitrogênio, temperatura e pH, além de 0,025%MgSO₄ e 1% de solução de minerais(cuja composição em g/l será: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.

O tempo de fermentação variou de 6, 12, 24, 48, 72 até 96 , visando saber qual o tempo de fermentação necessário para a produção máxima de biosurfactante.

3.3. Produção de Biosurfactante pelo método “Resting Cells”

O método de produção de biosurfactantes por “Resting Cells” consiste em primeiro inocular a linhagem em meio de cultura contendo uma fonte de carbono solúvel em água, a qual deve proporcionar o crescimento da massa celular, e só então, após a fase logarítmica e total crescimento da linhagem é que alíquotas deste meio são transferidas para um meio de fermentação que contenha um substrato insolúvel como fator estimulante para a produção de biosurfactante.

A linhagem estudada foi inoculada em meio de cultura contendo a melhor concentração de glicose, NaCl, pH e temperatura resultantes de testes realizados anteriormente para o processo fermentativo, além de 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,025% de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% de extrato de levedura e 1% de soluções de sais (composição em g/l foi: MnSO_4 3,00 ; FeSO_4 0,10 ; CaCl_2 0,10 ; CoCl_2 0,10 ; ZnSO_4 0,10 ; CuSO_4 0,01 ; H_3BO_4 0,01 ; NaMnO_4 0,01) em tampão fosfato 0,2M.

A seguir, alíquotas de 1, 5, 10 e 20ml foram transferidas para um meio contendo todos os componentes acima descrito, adicionado de 1% de petróleo. A seguir, foi verificada qual a quantidade de inóculo mais adequada para o aumento de produção de biosurfactante, levando-se em consideração se a variação da quantidade de inóculo adicionada ao meio contendo petróleo teve

alguma influência sobre o aumento ou diminuição da produção de biosurfactante.

3.4. Determinação da Concentração Micelar Crítica(CMC)

CMC é definida como a concentração de surfactante necessária para se iniciar a formação de micelas em solução, onde, após esta concentração a produção de surfactante pode continuar aumentando, porém não ocorre mais redução da tensão superficial.

A determinação do CMC foi feita medindo - se a tensão superficial do meio de fermentação através de diluições sucessivas, sempre diluindo-se metade da amostra anterior com igual volume de água destilada e com igual volume do meio de cultura sem inoculação. As medidas de tensão superficial foram determinadas até que se igualasse ao valor de tensão superficial do meio diluído com a tensão da substância que diluiu a amostra, a água ou o meio de cultura sem inóculo. A seguir quantificou-se o extrato bruto da amostra diluída para que fosse possível o cálculo da CMC. Para tanto construiu-se um gráfico com TS(tensão superficial) x log ccSF(concentração do biosurfactante) onde a concentração micelar crítica foi determinada para três meios de cultura contendo diferentes classes de substrato, um açúcar, no caso a glicose, como padrão, um hidrocarboneto, o tetradecano o glicerol, com a finalidade de se observar a diferença de CMC para diferentes substratos.

No método empregado, duas retas foram ajustadas aos pontos experimentais alinhados antes e depois da região de formação das micelas. Considerou-se CMC como o valor da concentração da solução (abcissa) correspondente a intersecção das retas, de acordo com a figura 1.

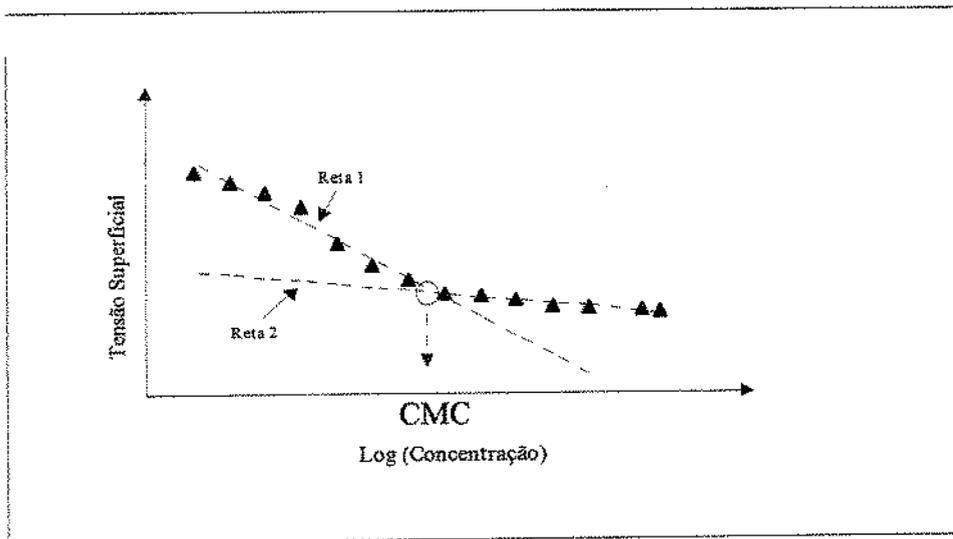


Fig.1- Determinação da Concentração Micelar Crítica de uma Solução

O ajuste das retas foi feito pelo método dos mínimos quadrados utilizando-se o programa do Microsoft Excel versão 5.0 .

3.5. Teste de Emulsificação

Em tubos de ensaio de igual especificação, foram colocados 0,1ml da substância a ser emulsificada, no caso tetradecano e óleo de soja e 4ml do meio de fermentação centrifugado a 8000rpm, por 10min e filtrado em membrana millipore 0,45 μ m, para total remoção de partículas. A seguir, os tubos foram agitados em agitador vortex com alta rotação, vigorosamente. Após 10 min de repouso foi medida a absorbância a 540nm para o meio de cultura sem emulsão e para este emulsionado com tetradecano e óleo vegetal, onde o aparelho foi zerado com o meio de cultura sem inóculo.

O teste de emulsificação foi feito para os meios de cultura contendo os seguintes substratos como fonte de carbono: glicose, maltose, sacarose, petróleo, N-decano com glicose, tetradecano com glicose, octadecano com glicose, icosano com glicose e octadodecano com glicose.

3.6. Identificação da Melhor Linhagem Seleccionada

A linhagem que apresentou melhor condição de crescimento e maior produção de extrato bruto de biosurfactante foi identificada quanto ao gênero.

A linhagem seleccionada foi suspensa em tubos contendo água destilada estéril e inoculadas em placas de petri contendo meio ágar GYP (4%glicose, 0,5%extrato de levedura, 0,5%peptona e 2% de ágar) para a obtenção de uma cultura pura. As placas foram incubadas a 25°C por 48 h. Decorrido o período de incubação, uma colônia representativa foi repicada em tubos contendo meio ágar GYP e mantidas como culturas estoque.

Após a obtenção destas culturas, foram feitas análises microscópicas, morfológica e bioquímica (assimilação e fermentação de carboidratos) na linhagem a ser identificada.

3.6.1. Características Morfológicas

3.6.1.1. Morfologia em Meio Líquido e Sólido

a) Crescimento em Meio Líquido:

Para a verificação das características da levedura quanto ao crescimento em meio líquido, a linhagem foi inoculada em frascos Erlenmeyer de 125ml com 50ml do meio GYP caldo e incubadas a 25°C. Após 2 ou 3 dias verificou-se presença de película e formação de sedimento.

b) Crescimento em Meio Sólido:

Para estudo das características morfológicas em meio sólido as culturas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar YM. As placas foram incubadas a 30°C por 3 a 5 dias. Foram observadas a forma e o modo de reprodução da levedura, tais como a textura, cor, superfície, elevação e aspectos de margens das colônias a olho nu e em microscópio com um aumento de 1000 vezes.

3.6.1.1.2 Formação de Pseudomicélio e Micélio Verdadeiro

A formação de pseudomicélio e micélio verdadeiro foi verificada de acordo com o método de Dalmau. Culturas jovens da linhagem em estudo foram inoculadas na forma de estrias e dois pontos bem separados na superfície do meio ágar farinha de milho, composto de 1,5% de ágar e 1,7% de

extrato de farinha de milho em 1000ml de água destilada. A parte central das estrias e um dos pontos inoculados foram cobertos por lamínula estéril.

A formação de pseudomicélio ou micélio verdadeiro foram verificados através do microscópio ótico após 7 a 10 dias de incubação a 30°C.

3.6.1.1.3 Características sexuais, formação de ascos e ascosporos

A formação de ascos e ascosporos foi verificada inoculando-se culturas da levedura a ser identificada, previamente desenvolvidas em meio ágar YM durante 48h a 30°C, nos seguintes meios de cultura em tubos inclinados:

-**meio acetato ágar**:0,5%acetato de sódio. 3H₂O,em pH entre 6,7-7,0.

-**gorodkova**:0,1%glicose, 1%peptona, 0,5%NaCl e 2%ágar

-**YM ágar**:0,3% extrato de levedura, 0,3%extrato de malte, 0,5%peptona, 1%glicose e 2%ágar.

-**ME ágar**:5%extrato de malte e 3% ágar

Os tubos foram incubados a 27°C por um período de 3 a 5 dias, onde se observou diariamente a formação de esporos através da preparação de montagem úmida. A seguir, 1 gota do material foi fixado sobre uma lâmina, aquecendo-se em chama de bico de Bunsen. A seguir a lâmina foi corada com verde malaquita 5%, lavando-se a lâmina em água corrente por 30 segundos,e acrescentando safranina(0,5%) por 30 segundos. Os esporos se coloram de verde enquanto que as células vegetativas e os ascos se coram de vermelho.

3.6.2. Características Fisiológicas

3.6.2.1 Testes da Assimilação de Carboidratos:

Foram realizados os seguintes testes de assimilação de carboidratos através dos kits de identificação de leveduras API 20C AUX e API 50 CH, do Laboratório Bio-Mérieux - França.

Os carboidratos testados foram: glucose, L-sorbose, melibiose, Keto-D-gluconato, D-ribose, D-arabinose, L-arabinose, L-ramnose, dulcitol, D-xilose, adonitol, xilitol, arbutina, galactose, D-glucosídeo, inositol, salicina, sorbitol, α -metil-D-manasídeo, 2-Metil D-glucosídeo, N-Acetil D-glucosamina, celobiose, lactose, maltose, sacarose, trehalose, melozitose, rafinose, eritritol, amido, manitol e melobiose.

Preparação do inóculo:

Uma suspensão de células de leveduras foi preparada a partir de células cultivadas por 48h. em meio "Sabourad - Ágar" a 30°C . Em seguida, a massa celular correspondente a duas alçadas, foi suspensa em 2mL de solução salina 0,85%, com uma densidade igual a 2 na escala de Mc Farland. A seguir, 100 μ L desta suspensão foram transferidos para um meio com a seguinte composição: sulfato de amônio 0,5%, fosfato monopotássico 0,031%, fosfato dipotássico 0,045%, fosfato disódico 0,092%, cloreto de sódio 0,01%, cloreto de cálcio 0,005%, sulfato de magnésio 0,02%, histidina 0,0005%, triptofano 0,002%, metionina 0,002%, gelose 0,05%, solução de vitaminas 0,1%, solução de oligo elementos 1% em pH entre 6,5 - 6,7.

3.6.2.2. Teste de Assimilação de Nitrato

Foi preparada uma solução constituída de 11,7g do meio “Yeast Carbon Base”(YCB) + 0,78G de KNO_3 em 1000ml de água destilada. A seguir 5ml de meio foram distribuídos em tubos de ensaio. Os quais foram esterilizados a $121^\circ C$ por 15 minutos.

A linhagem *Hansenula anomala* IFO 0112 foi utilizada como padrão por ter a capacidade de assimilar nitrato.

Em 4 tubos contendo meio de assimilação de nitrato, a linhagem a ser identificada foi inoculada com agulha após ter crescido em meio “Yeast Malt”em tubo inclinado. Os testes foram feitos por 3,5,10 e 15 dias aproximadamente.

Além disso foram preparados dois reagentes, a fim de se verificar se no final do teste ainda há nitrato presente no meio, cujos reagentes foram preparados da seguinte maneira:

- Reagente I: foi composto de 0,5g de ácido sulfanílico dissolvido em 50ml de solução de ácido acético 5N.
- Reagente II: foi composto de 0,5g de α -naftilamina dissolvida em 100ml de solução de ácido acético ou dissolver 0,3ml de dimetil α -naftilamina dissolvida em 50ml de solução de ácido acético 5N.

Algumas gotas de cada reagente foram adicionadas no meio de cultura de nitrato. O desenvolvimento da coloração rosada ou vermelha indicará a presença de nitrito. A ausência de nitrito na presença de bom crescimento pode contudo indicar o consumo completo de nitrato. Por isso testou-se a presença de nitrato adicionando-se pó de zinco nos tubos em que foram, adicionados os reagentes I e II e esperou-se alguns minutos.

Caso o nitrato ainda estivesse presente ele seria para nitrito com desenvolvimento da cor característica rosada.

3.6.2.3. Teste de Fermentação de Compostos de Carbono

A fermentação dos carboidratos: glucose, maltose, lactose, galactose e rafinose foi realizada utilizando o kit de identificação API - 20C do Laboratório Biomeriê - França.

Preparação do Inóculo:

Uma suspensão de células de leveduras foi preparada a partir de células cultivadas por 48h em meio "Sabourad - Ágar" a 30°C . Em seguida, a massa celular correspondente a duas alçadas, foi suspensa em 2mL de solução salina 0,85%, com uma densidade igual a 2 na escala de Mc Farland. A seguir, 100µL desta suspensão foram transferidos para um meio com a seguinte composição: sulfato de amônio 0,5%, fosfato monopotássico 0,031%, fosfato dipotássico 0,045%, fosfato disódico 0,092%, cloreto de sódio 0,01%, cloreto de cálcio 0,005%, sulfato de magnésio 0,02%, histidina 0,0005%, triptofano 0,002%, metionina 0,002%, gelose 0,05%, solução de vitaminas 0,1%, solução de elementos oligo 1% em pH entre 6,5 - 6,7.

A seguir, com uma pipeta Pasteur, inoculou-se a suspensão nas cúpulas, sobre as quais adicionou - se óleo mineral a fim de se obter uma zona de anaerobiose, onde o resultado foi observado após 48h.

O teste é considerado positivo com a mudança de coloração do meio original de azul para amarelo, e negativo se permanecer púrpura.

3.6.2.4. Teste de Osmotolerância

Algumas leveduras, não resistentes à altas pressões osmóticas, podem crescer em substratos com alto teor de açúcar ou sal. Para verificar se a linhagem a ser identificada possui ou não tal característica, é importante a realização de dois testes:

TESTE I: Verifica o crescimento da cultura em GYP ágar com 50% de glicose.

A cultura é repicada em tubo inclinado de GYP com 50% de glicose. Os tubos são incubados a 27°C por 5 a 7 dias, onde após este período de tempo observa-se o crescimento na superfície do meio, considerando o teste positivo se houver crescimento.

TESTE II: Verifica o crescimento da cultura em 10% de NaCl com 5% de glicose.

Em um tubo contendo 10% de NaCl com 5% de glicose adicionou-se 0,5ml do meio YNB(Yeast Nitrogen Base). A seguir, acrescenta-se 0,1ml de inóculo com densidade +2(observada através do cartão com linhas pretas), onde após a inoculação, incuba-se a 27°C por 21dias, agitando-se o tubo diariamente . Observou-se então o crescimento da cultura através do cartão com linhas pretas após 7,14 e 21 dias de incubação.

3.6.2.5. Teste de Crescimento a 37°C

Para se verificar se a linhagem a ser identificada tem crescimento a uma temperatura de 37°C, a linhagem foi repicada em meio GYP ágar, incubada a 37°C em banho maria por 3 a 4 dias. Após tal período se verificou se houve crescimento na superfície.

O teste será considerado positivo se tal crescimento ocorrer.

3.6.2.6. Teste da Atividade da Uréia

Considerando que certas leveduras tem a capacidade de hidrolisar a uréia para amônia em altas concentrações, procedeu-se da seguinte maneira a fim de elucidar se a linhagem testada possui tal capacidade.

A cultura foi repicada em meio de uréia-ágar, a seguir esta foi incubada por um período de 5 a 7 dias a 27°C. Após tal período, foi observado se houve produção de amônia pela mudança de coloração do meio que passa de amarelo a rosa.

3.6.2.7. Teste de Atividade de Arbutina

A linhagem a ser identificada foi repicada em tubos inclinados de arbutina-ágar. A seguir, a cultura foi incubada a 27°C por um período que variou de 5 a 7 dias. Foi observada a mudança ou não de coloração. A mudança indica o teste como positivo.

O meio arbutina-ágar em que a cultura foi repicada era composto de 0,5% de arbutina, 0,5% extrato de levedura e 2% de ágar.

3.6.2.8. Teste de Produção de Ácido

Certas leveduras produzem ácido a partir de glicose e tal característica pode ser verificada através de meio sólido contendo carbonato de cálcio e glicose. O ácido formado é capaz de dissolver o carbonato de sódio disperso no meio de cultura, possibilitando uma avaliação desta função biológica.

A cultura é repicada em tubos inclinados contendo meio de CaCO_3 ágar, é a seguir incubada a 27°C por um período de 5 a 7 dias, após o qual observou-se a formação ou não de ácido pelo aparecimento de zonas claras e translúcidas no meio opaco, sendo estas zonas muito visíveis à transparência da luz.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Pré-Seleção de Microorganismos Produtores de Biosurfactantes

Das 322 linhagens testadas, apenas treze linhagens apresentaram redução da tensão superficial do meio de cultura sem inóculo (prova em branco), de uma tensão em torno de 45mN/m para valores entre 25 - 30mN/m. As linhagens foram repicadas até se obter a pureza de cultura. A seguir as linhagens foram submetidas a novos testes fermentativos como descrito no item 3.1, e selecionadas a fim de serem submetidas ao teste de precipitação ácida. A tensão superficial foi medida ao final do processo fermentativo, para o meio contendo células (TS1). A Tabela III descreve os valores de tensão de acordo com o método descrito no item 4.3 .

Tabela III: Medida da tensão superficial dos meios de cultura das linhagens pré-selecionadas

LINHAGEM	TENSÃO SUPERFICIAL (mN/m)
LB-26	27,51
LB-83	27,77
LB-86	29,17
LB-141	29,02
LB-144	29,17
LB-148	29,76
LB-199	30,15
LB-225	28,45
LB-226	25,99
LB-227	28,54
LB-228	27,82
LB-229	28,04
LB-230	25,81

Meio de Referência: 1%glicose,5%NaCl, 0,05%extrato de lev., 0,1%(NH₄)₂SO₄, 0,025%MgSO₄ e 1% solução de minerais, em pH 7.0, tampão 0,2M e T de 45°C.

4.2 Seleção das Melhores Linhagens Seleccionadas Produtoras de Biosurfactantes

As treze linhagens que provocaram a redução da tensão superficial do meio de fermentação, foram submetidas ao teste de precipitação ácida como descrito no item 3.2.

As linhagens que apresentaram a floculação do biosurfactante com a adição de HCl até pH 2,0 foram novamente fermentadas em meio contendo 1%glicose, 5%NaCl, 0,05%extrato de levedura, 0,1%(NH₄)₂SO₄, 0,025%MgSO₄ e 1%solução de minerais, em pH 7, tampão 0,2M e T° de 45°C, como foi o caso das linhagens n°141, 144, 148, 199, 226, 227, 228 e 229. No entanto, como pode ser observado na Tabela IV, as linhagens n° 26, 83, 86, 225 e 230 não apresentaram floculação do biosurfactante, sendo portanto eliminadas da seleção.

Tabela IV - Presença de floculação do biosurfactante após adição de Hcl

LINHAGEM	pH meio após fermentação	Precipitação ácida pH 2,0
LB-26	6,00	-
LB-83	6,00	-
LB-86	6,00	-
LB-141	6,15	+
LB-144	5,60	+
LB-148	6,61	+
LB-199	5,75	+
LB-225	5,85	-
LB-226	6,17	+
LB-227	6,03	+
LB-228	5,97	+
LB-229	6,11	+
LB-230	6,00	-

(+): Ocorreu floculação ; (-): Não ocorreu floculação

As oito linhagens que apresentaram resultado de floculação positivo foram novamente fermentadas nas mesmas condições descritas no item 3.1 e submetidas a novas medidas de tensão superficial do meio de cultura com células, do meio centrifugado e do meio após retirada do biosurfactante, onde obtivemos de acordo com a Tabela V os seguintes resultados:

Tabela V : Medida da tensão superficial dos meios de cultivo das linhagens com floculação do biosurfactante por precipitação ácida

TENSÃO SUPERFICIAL (mN/m)			
LINHAGEM	TS ₁	TS ₂	TS ₃
141	29,45	30,13	47,59
144	30,30	46,49	45,56
148	30,29	42,08	45,93
199	28,63	29,27	43,27
226	26,38	26,55	52,13
227	32,53	35,25	45,46
228	33,19	43,04	45,69
229	29,94	31,55	48,84

TS1 : Tensão superficial do meio de fermentação com células

TS2 : Tensão superficial do meio de fermentação livre de células

TS3 : Tensão superficial do meio de fermentação após a precipitação ácida

As linhagens que apresentaram valores de tensão superficial iguais para o meio com as células e deste mesmo meio centrifugado, mostraram que a remoção das células não implicou na remoção do biosurfactante do meio de cultura, indicando que sua produção foi extracelular . No entanto, as linhagens que tiveram aumento da tensão superficial do meio de cultura após remoção das células mostraram que a remoção destas implicou na remoção do biosurfactante do meio de cultura , o qual pode ter sido produzido intracelularmente.

As linhagens que apresentaram o aumento da tensão superficial para o meio centrifugado, como ocorreu com as linhagens nº 144, 148 e 228 foram eliminadas da seleção pois o presente estudo teve por objetivo selecionar uma linhagem que produzisse biosurfactante extracelular. Horowitz et alli em 1990 utilizou a extração, do biosurfactante produzido por uma linhagem de *Bacillus licheniformis* 86, através da adição de HCl a pH 2,0 a 4°C. Se após a precipitação ácida, seguida de centrifugação, a tensão superficial do meio voltar a subir, significa que a adição de HCl, seguido de repouso a 5°C e centrifugação a 10.000rpm por 15min., resultou na extração do biosurfactante .

Cooper et alli (1981) utilizaram este método para a extração do biosurfactante surfactina, a partir de *Bacillus subtilis* . A tensão superficial do meio de cultura centrifugado subiu de 27mN/m para 62mN/m, indicando sua extração.

Das linhagens que apresentaram valores de tensão superficial semelhantes ou mesmo iguais para os meios de cultura com células ou centrifugado e aumento de tensão após a precipitação ácida, como foi o caso das linhagens nº 141, 199, 226, 227 e 228, a que apresentou maior redução de tensão superficial, em ambos os meios com células e livre de células, foi selecionada como melhor produtora de biosurfactante e utilizada para os estudos posteriores .

Como podemos observar na Tabela III , a linhagem LB-226 apresentou maior redução da tensão superficial, sendo portanto a linhagem selecionada para o estudo fermentativo .

4.3. Teste da Atividade Hemolítica

A atividade hemolítica positiva é demonstrada pela formação de um halo transparente em volta da linhagem inoculada, devido à possível ação do biosurfactante produzido sobre os fosfolipídeos presentes nas membranas dos eritrócitos.

Em placa de Petri contendo ágar-sangue com 5% de sangue de carneiro, foram inoculadas duas linhagens, a linhagem n° 226, a qual apresentou redução da tensão superficial do meio de fermentação de 42mN/m para 25mN/m e uma linhagem não produtora de biosurfactante, não provocando redução da tensão superficial do meio.

Como resultado podemos observar na Figura 2, que após 48 horas de incubação, apenas a linhagem descrita como produtora de biosurfactante foi capaz de hemolisar as hemácias do meio.

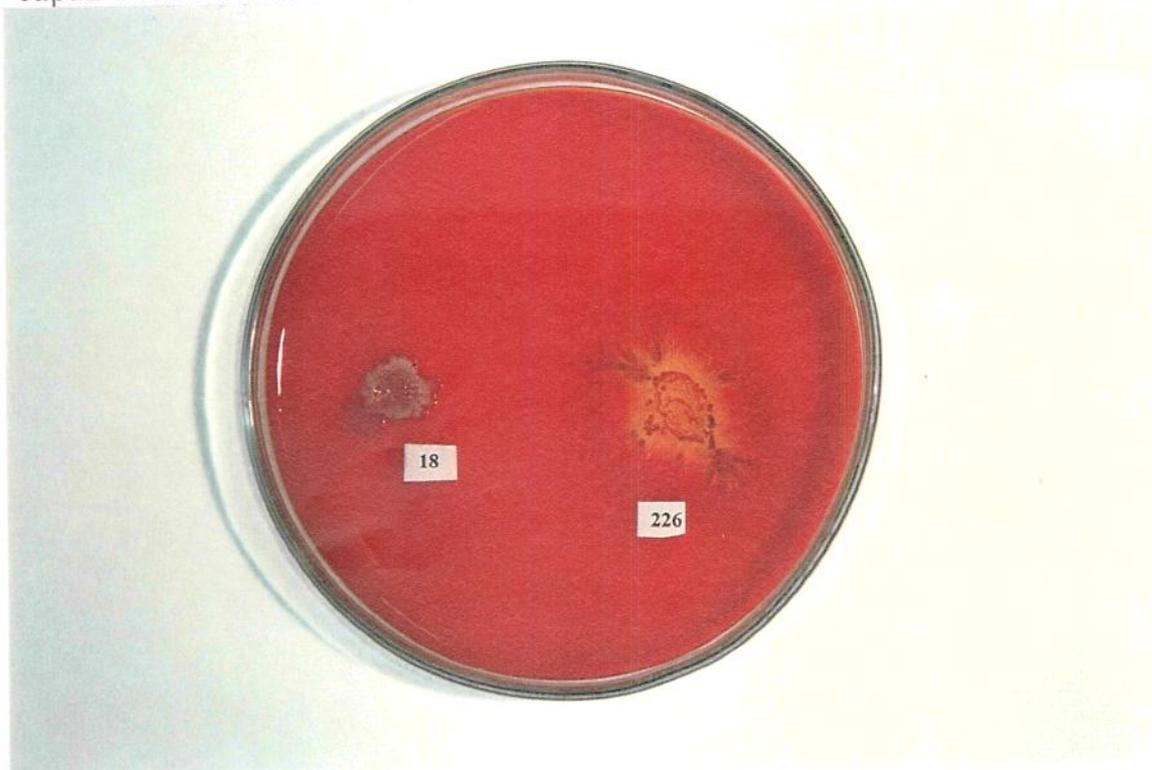


FIG.2 - Fotografia das linhagens 18 e 226 em Placas de Petri contendo ágar sangue após 48 horas de incubação.

A atividade hemolítica foi utilizada como critério de seleção primária para microorganismos produtores de biosurfactantes. Carrillo et alii (1996) isolaram 492 linhagens das quais 37 apresentaram atividade hemolítica. A seguir, 49 linhagens sem atividade hemolítica mais as 37 de atividade positiva foram testadas quanto a redução de tensão superficial do meio de fermentação. Apenas 5 linhagens foram capazes de abaixar a tensão do meio, todas com atividade hemolítica positiva.

4.4. Estudo Preliminar do Processo Fermentativo

Esta etapa do estudo foi realizada visando avaliar quais as melhores condições de fermentação necessárias para a linhagem n° 226, selecionada como melhor produtora de biosurfactante e qual a influência de cada uma dessas condições sobre a tensão superficial, e as quantidades de massa celular e extrato bruto produzido.

4.4.1 Influência da Temperatura na Tensão Superficial, Produção de Massa Celular e Extrato Bruto de Biosurfactante pela Linhagem Estudada

O grau de influência da variação de temperatura durante o crescimento da linhagem n° 226, bem como a quantidade de extrato bruto de biosurfactante produzido foi avaliado.

De acordo com a Figura.3, pode-se observar que a temperatura de 30°C se mostrou a mais adequada para a linhagem estudada, tanto para seu crescimento e produção de massa celular como para a quantidade de extrato bruto de biosurfactante produzido, cuja quantidade chegou a ser cerca de sete vezes maior que a produzida pela linhagem a 45°C .

Quanto à tensão superficial, a variação de temperatura mostrou exercer menor influência, sendo quase que constante durante as diferentes temperaturas testadas, devido ao efeito da concentração micelar crítica, presente neste tipos de compostos. Podemos dizer, no entanto, que a variação de temperatura durante o crescimento e produção de biosurfactante pela linhagem escolhida, foi bastante acentuada, e a temperatura de 30°C foi selecionada para os ensaios posteriores aos quais foi submetida.

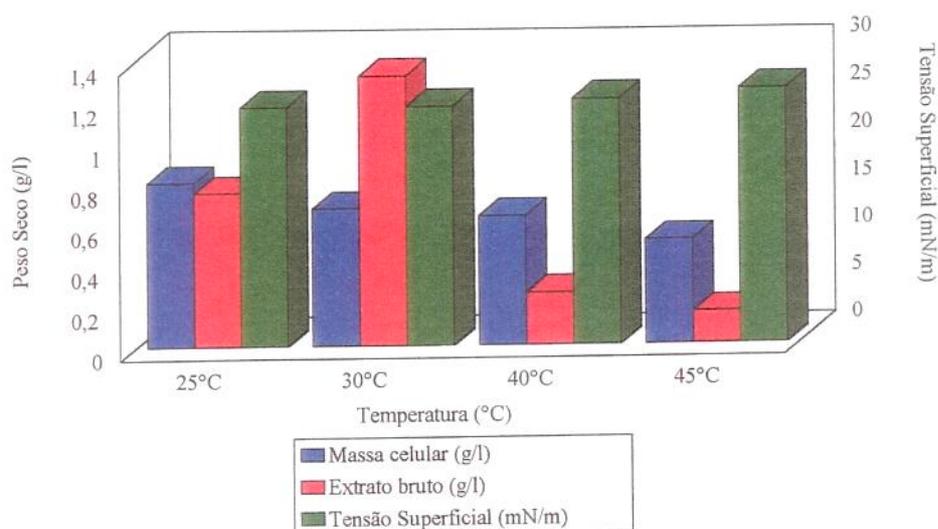


FIG. 3 - Efeito da Temperatura na Tensão Superficial e nas Produções de Massa Celular e de Extrato Bruto de Biosurfactante

4.4.2 Influência da Concentração de NaCl do Meio Basal na Tensão Superficial, Produção de Massa Celular e Extrato Bruto de Biosurfactante pela Linhagem N°226

Neste estudo foi avaliado o grau de influência da variação da concentração de NaCl durante o crescimento da linhagem n°226 bem como da quantidade de extrato bruto de biosurfactante produzido.

De acordo com a Figura.4, pode-se observar que a variação da concentração de NaCl adicionada ao meio de fermentação não influenciou drasticamente na produção de extrato bruto de biosurfactante bem como na produção de massa celular.

No entanto a concentração de 3% mostrou um ligeiro aumento da quantidade de extrato bruto de biosurfactante produzido. Porém na ausência de NaCl , ocorreu a menor produção de extrato bruto de biosurfactante .

Quanto a tensão superficial, esta permaneceu praticamente constante nas variações de concentração de NaCl .

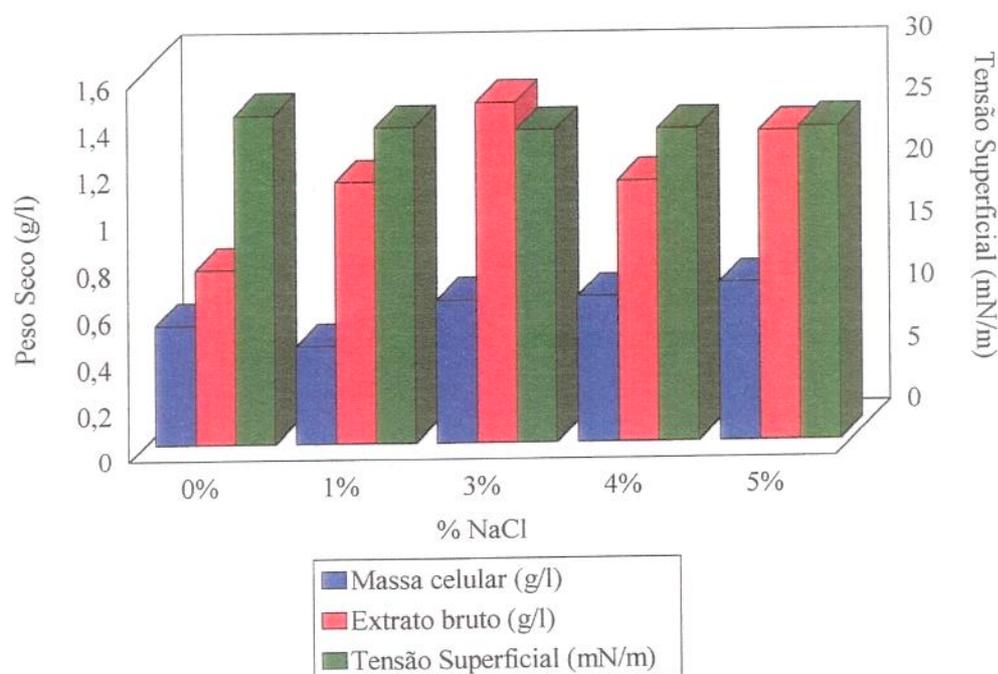


FIG.4 - Estudo do Efeito da Concentração de NaCl na Tensão Superficial e na Produção de Massa Celular e Extrato Bruto de Biosurfactante

Jenneman et alli (1982) estudaram a produção de surfactante por *Bacillus licheniformis* JF-2 num meio de sacarose e sais minerais contendo 5% de NaCl .

4.4.3 Influência da Concentração de Glicose do Meio Basal na Tensão Superficial, Produção de Massa Celular e Extrato Bruto de Biosurfactante pela Linhagem N°226

O grau de influência da concentração de glicose no crescimento da linhagem n°226 bem como na quantidade de extrato bruto de biosurfactante produzido foi estudado .

De acordo com a Figura 5, pode-se observar que a variação de concentração de glicose adicionada ao meio de fermentação influenciou na produção de extrato bruto de biosurfactante bem como na produção de massa celular . A concentração de 3% mostrou um aumento considerável de quantidade de extrato bruto produzido.

Quanto à tensão superficial, esta permaneceu praticamente constante durante as variações de concentração de glicose .

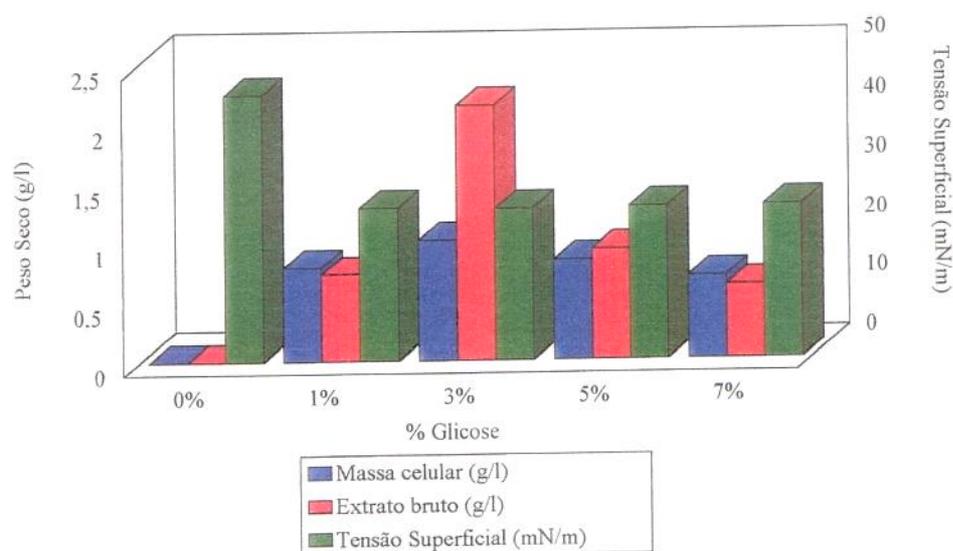


FIG.5 - Efeito da Concentração de Glicose na Tensão Superficial e na Produção de Massa Celular e Extrato Bruto de Biosurfactante

Cooper et alii (1981) utilizou 4% de glicose como fonte de carbono para a produção de surfactina por *Bacillus subtilis*, cuja quantidade de biosurfactante produzida foi de 0,1g/l.

4.4.4. Influência do pH do Meio de Incubação na Tensão Superficial, Produção de Massa Celular e Extrato Bruto de Biosurfactante pela Linhagem N°226

A influência do pH inicial do meio de fermentação da linhagem n°226 foi analisada, quanto à medida da tensão superficial, a produção de massa celular e à produção de extrato bruto de biosurfactante.

De acordo com a Figura 6, observou-se que não houve crescimento da linhagem 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, porém é necessário observar que não houve abaixamento desta nos pHs 4,0 e 5,0, uma vez que não houve crescimento celular.

Observou-se ainda, através da Figura 6 que o pH 6,5 ofereceu condições mais adequadas de crescimento celular e produção de biosurfactante para a linhagem em estudo .

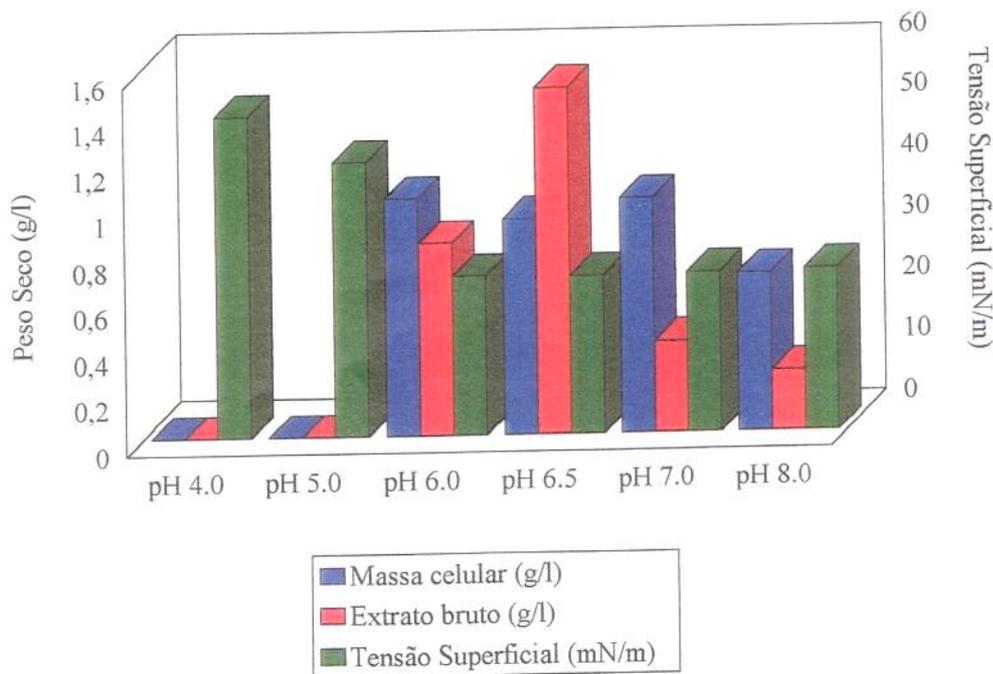


FIG.6 - Estudo do Efeito do pH na Tensão Superficial e na Produção de Massa Celular e Extrato Bruto de Biosurfactante

4.4.5. Influência do Tempo de Fermentação na Tensão Superficial, Produção de Massa Celular e Extrato Bruto de Biosurfactante pela Linhagem N°226

Nesta etapa avaliou-se o aumento da produção de massa celular e de extrato bruto de biosurfactante de acordo com o tempo de fermentação. Foi feita ainda, a medida a tensão superficial a diferentes intervalos de fermentação.

Observando a Fig.7, verificou-se que o biosurfactante foi produzido durante a fase logarítmica de crescimento, como é evidenciado pelo declínio constante na tensão superficial até 24h, quando a mesma se manteve constante.

A produção máxima de extrato bruto de biosurfactante e de massa celular foram obtidas com 72 horas de fermentação.

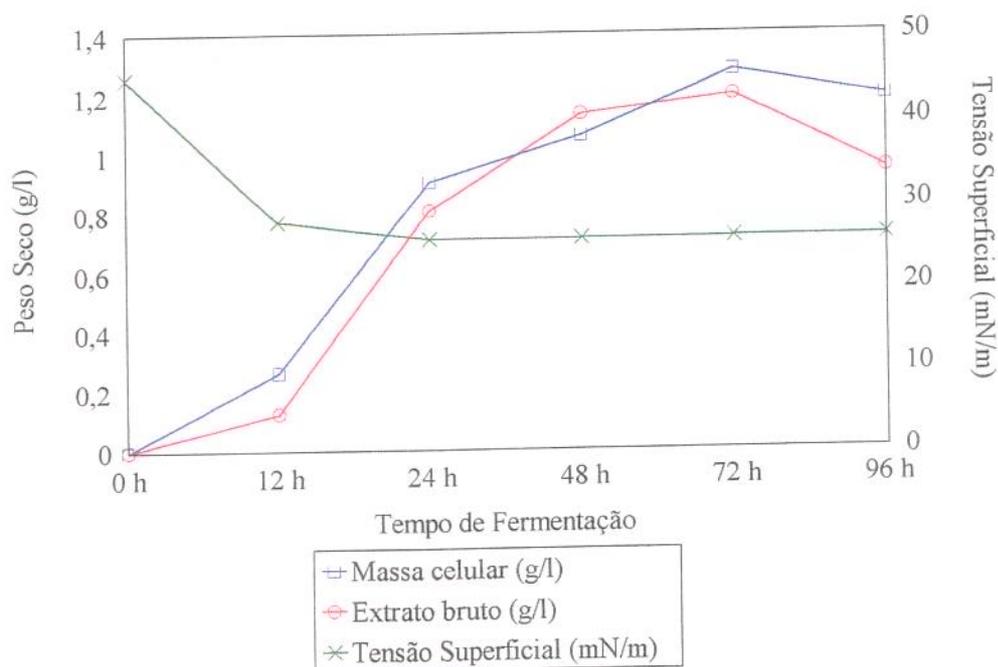


FIG.7- Estudo do Efeito do Tempo de Fermentação na Tensão Superficial e na Produção de Massa Celular e Extrato Bruto de Biosurfactante

Hommel et alii (1987) estudaram a produção de uma mistura de biosurfactantes, a partir de *Torulopsis apicola* IMET 43747, com n-alcanos ou carboidratos como fonte de carbono . A maioria desses surfactantes foi produzida na fase exponencial tardia e na fase estacionária de crescimento .

Cooper et alii (1980) verificaram que a produção de surfactante por *Clostridium pasteurianum*, ocorreu na fase exponencial de crescimento . Desta maneira, é mais provável que o surfactante seja um produto extracelular do microorganismo . Entretanto, a velocidade máxima de formação de espuma ocorreu durante a fase de morte da fermentação, o que indica que o agente estabilizante de espuma foi um produto da lise da célula..

4.4.6. Estudo da Influência de Diferentes Fontes de Carbono Hidrofílicas na Produção de Massa Celular pela Linhagem N°226

Várias fontes de carbono foram testadas, tomando-se como referência a glicose. Todas as fontes testadas, maltose, sacarose, frutose, lactose, melão, galactose, amido e glicerol promoveram o crescimento da linhagem em estudo, no entanto, em termos de crescimento celular o melão foi o que promoveu melhor resultado, com uma produção de 1,49g/l de massa celular. O amido, o glicerol, a sacarose e a maltose também mostraram serem boas fontes de carbono para o crescimento da linhagem, com 1,36g/l, 1,30g/l, 1,29g/l e 1,19g/l de massa celular respectivamente, ficando a glicose um pouco abaixo destes com uma produção de massa celular de 0,982g/l, mas ainda mantendo um crescimento bastante aceitável. Quanto às demais fontes de carbono testadas, lactose, galactose e frutose, os resultados obtidos não foram satisfatórios, sendo que a galactose foi a fonte de carbono que promoveu o menor crescimento celular, com uma produção de 0,23g/l.

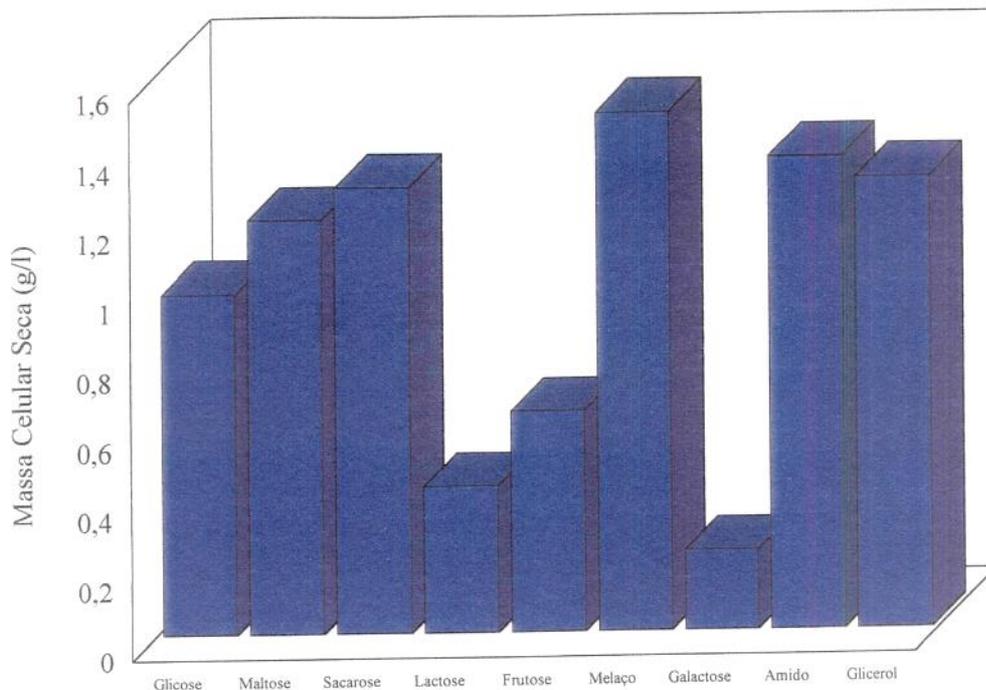


FIG.8 - Influência da Utilização de Diferentes Carboidratos na Produção de Massa Celular

4.4.7. - Estudo da Influência de Diferentes Fontes de Carbono Hidrofílicas na Produção de Extrato Bruto de Biosurfactante pela linhagem N°226

O melaço apesar de ter promovido um acentuado crescimento celular, não estimulou a linhagem suficientemente para uma boa produção de extrato bruto de biosurfactante.

A maltose e o glicerol foram as duas fontes de carbono responsáveis pela maior produção de extrato bruto de biosurfactante, com uma produção de 2,75g/L e 2,60g/L respectivamente. A glicose também mostrou ser uma boa fonte de carbono, conseguindo uma produção média de 2,09g/L de extrato bruto de biosurfactante. A sacarose produziu quando presente no meio, 1,9g/L de extrato bruto de biosurfactante.

As demais fontes de carbono, lactose, galactose e frutose apresentaram uma pequena produção de extrato bruto de biosurfactante,

além de um baixo crescimento celular. No caso do amido, este se mostrou semelhante ao melaço, conseguindo promover bom crescimento celular, mas foi ineficiente quanto a quantidade de biosurfactante produzida.

Zhou & Kosaric (1993) testaram glicose, galactose, lactose e sacarose como fontes de carbono para a produção de biosurfactante por *Torulopsis bombicola* onde a maior produção foi obtida com a glicose, seguida da sacarose, galactose e por último da lactose, cuja produção com a glicose foi de 25,22g/l e para a lactose 1,87g/l.

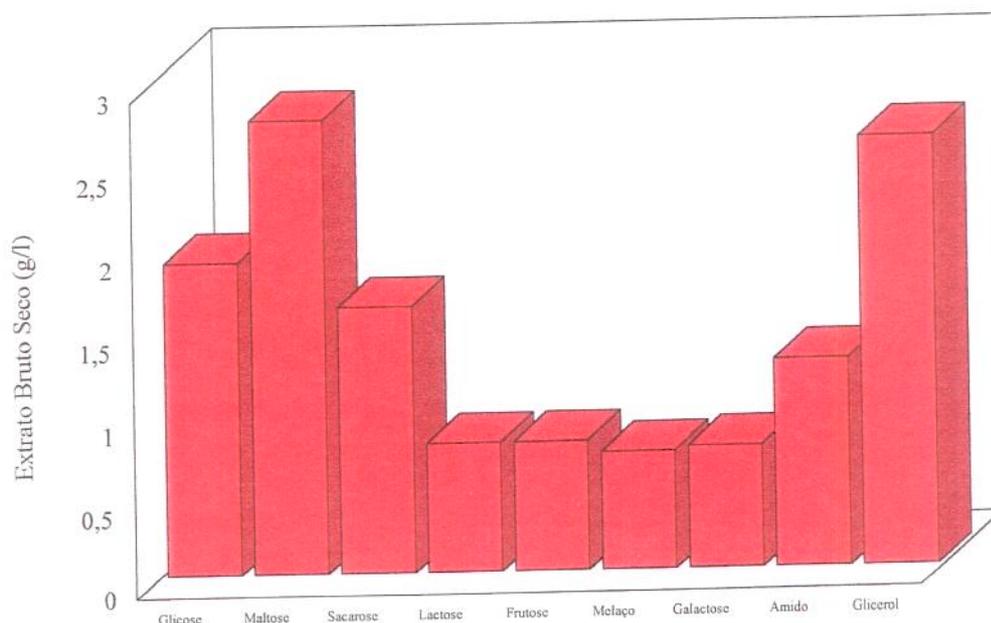


FIG. 9- Influência da Utilização de Diferentes Carboidratos na Produção de Extrato Bruto de Biosurfactante

4.4.8. Estudo da Influência de Diferentes Fontes de Carbono Hidrofílicas na Tensão Superficial

Ao contrário da massa celular e extrato bruto, a tensão superficial permaneceu praticamente constante para todas as fontes de carbono testadas, sendo levemente superior para o melaço e a galactose, as quais produziram quantidades inferiores de extrato bruto quando comparadas as demais fontes testadas.

O fato da tensão superficial ter permanecido novamente constante sugere que a redução máxima da tensão superficial que o biosurfactante produz é atingida, não importando a fonte de carbono utilizada. No entanto, a diferença de quantidade de biosurfactante produzida pela linhagem nas diferentes fontes de carbono mostrou ser entre o efeito mais significativo que as fontes de carbono provocaram.

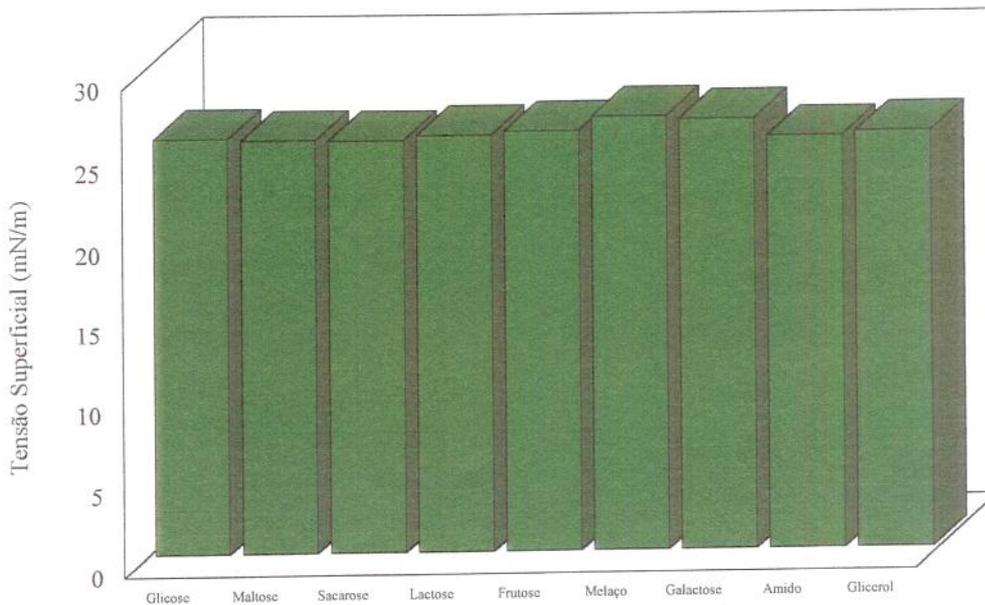


FIG.10 - Influência da Utilização de Diferentes Carboidratos na Tensão Superficial

4.4.9. Estudo da Influência da Adição de Diferentes Hidrocarbonetos no Meio Basal na Produção de Massa Celular

A adição de hidrocarbonetos ao meio de fermentação funciona como fator estimulante para o aumento de produção de extrato bruto de biosurfactante, sendo estudados por Palejwala & Desai (1989), mas não para o aumento de massa celular, a qual pode até ser inibida ou sofrer uma certa diminuição em função da adição deste tipo de composto ao meio de cultura.

É descrito na literatura pois primeiro a linhagem precisa atingir sua fase logarítmica de crescimento, para depois utilizar o substrato insolúvel no meio como fator fundamental para o estímulo de produção de biosurfactante.

De acordo com a Figura 11, o maior valor de massa celular foi obtida com a adição de hexadecano no meio de cultura. Cooper & Kosaric (1982) adicionaram n-alcenos ao meio de cultura constituídos de 11, 12, 13, 14, 15, 16 e 17 carbonos, e observaram que a maior massa celular seca foi obtida quando se adicionou hexadecano ao meio de cultura onde cultivou-se uma linhagem de *Arthrobacter paraffineus*. Por outro lado Jenneman et ali (1982) observaram que não ocorreu crescimento em meio de cultura adicionado de hexadecano por *Bacillus licheniformis* JF-2.

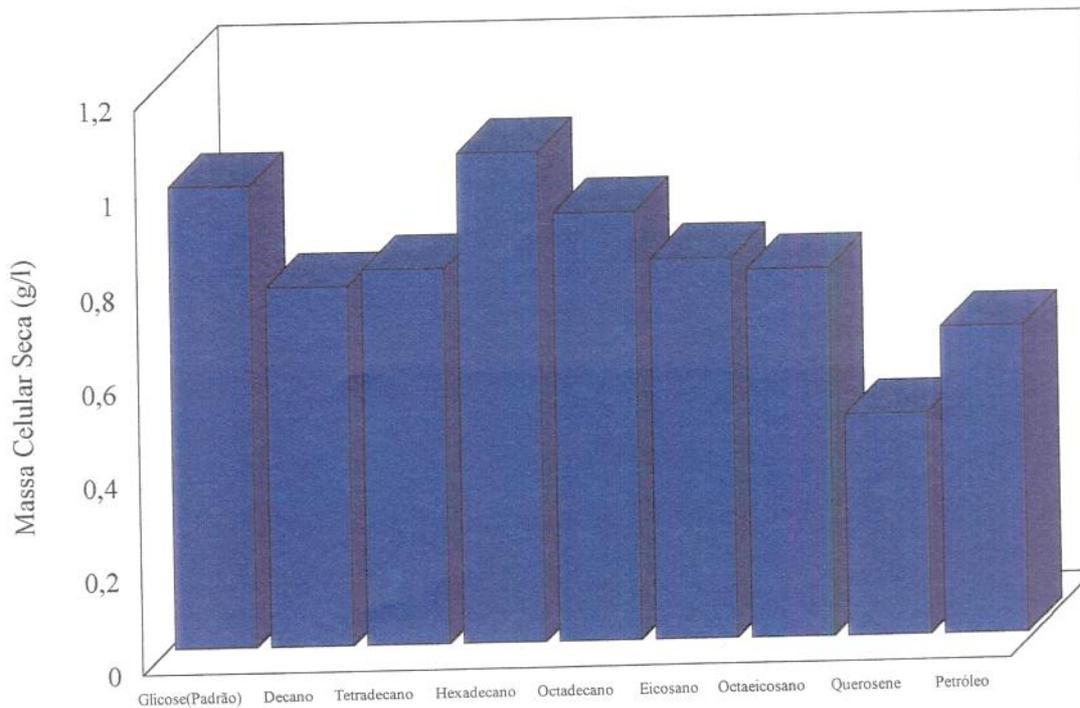


FIG.11 - Influência da Utilização de Diferentes Hidrocarbonetos na Produção de Massa Celular

4.4.10. Estudo da Influência da Adição de Diferentes Hidrocarbonetos no Meio Basal na Produção de Extrato Bruto

A adição de hidrocarbonetos, saturados ou insaturados, ao meio de cultura atuam como estimulantes para o aumento de produção de biosurfactantes, sendo que o principal fator que resulta neste estímulo é o fato de tais compostos serem insolúveis em água, estimulando então a liberação por parte do microorganismo de um composto que emulsifique tal substrato em questão, como estudaram Watkinson & Morgan (1990).

Compostos como n-alcenos são os mais facilmente emulsificados pelos microorganismos. De acordo com o estudo efetuado neste trabalho, foram adicionados ao meio de cultura n-alcenos, com tamanhos de cadeia de 10, 14, 16, 18, 20 e 28 carbonos. Os hidrocarbonetos constituído de 16 carbonos, hexadecano, mostrou ser a melhor fonte de hidrocarboneto para a produção de biosurfactante. Os hidrocarbonetos de cadeias inferiores a 14 carbonos apresentarem uma certa solubilidade em água, não oferecendo estímulo necessário para o microorganismo. O meio de cultura contendo tetradecano, hexadecano e o meio contendo petróleo foram totalmente emulsificados pelo microorganismo, indicando que houve a formação de uma emulsão. Já os n-alcenos de cadeias de mais de 18 carbonos não se mostraram totalmente efetivos como precursores para o aumento da produção de biosurfactantes, devido talvez à dificuldade do microorganismo em degradar n-alcenos com mais de 18 carbonos.

Davila et alli (1994) adicionou n-alcenos com 12, 14, 16 e 18 carbonos ao meio de cultura contendo glicose por *Torulopsis bombicola* e observou produções de 20g/L produzidos com apenas glicose como fonte de carbono, de 95g/L com hexadecano adicionado ao meio e 175g/L com octadecano. Com os hidrocarbonetos de 12 e 14 carbonos, não houve aumento de produção, sendo que com C12 a produção foi reduzida de 20g/L para 17g/L e com C14 se manteve em 20g/L.

Hommel et alli,1987, observaram que a produção de biosurfactante produzido por uma linhagem de *Torulopsis bombicola* aumentou sensivelmente, de 30g/l em meio de cultura contendo apenas glicose para 75g/l quando se adicionou hexadecano.

Por outro lado, Cooper et alli (1981)_a verificaram a inibição da produção de surfactina, por *Bacillus subtilis*, na presença de 2 a 4% de hexadecano, sendo que em meio contendo 4% de glicose como fonte de carbono, a produção de surfactina foi de 0,1g/l.

Com relação a linhagem 226, a adição de querosene com glicose ao meio de cultura não apresentou bons resultados, já que a produção de extrato bruto de 0,283g/L de biosurfactante foi inclusive bastante inferior comparada com a produção de biosurfactante com apenas glicose no meio de cultura, que foi de 1,9g/L, mostrando a baixa afinidade da linhagem 226 com tal substrato, a qual acabou inibindo a produção de biosurfactante.

Em contra partida, Cooper et alli (1981)_b relataram a produção de biosurfactante por linhagens de *Mycobacterium*, onde seis delas apresentaram significativo abaixamento de tensão superficial quando querosene estava presente no meio de fermentação.

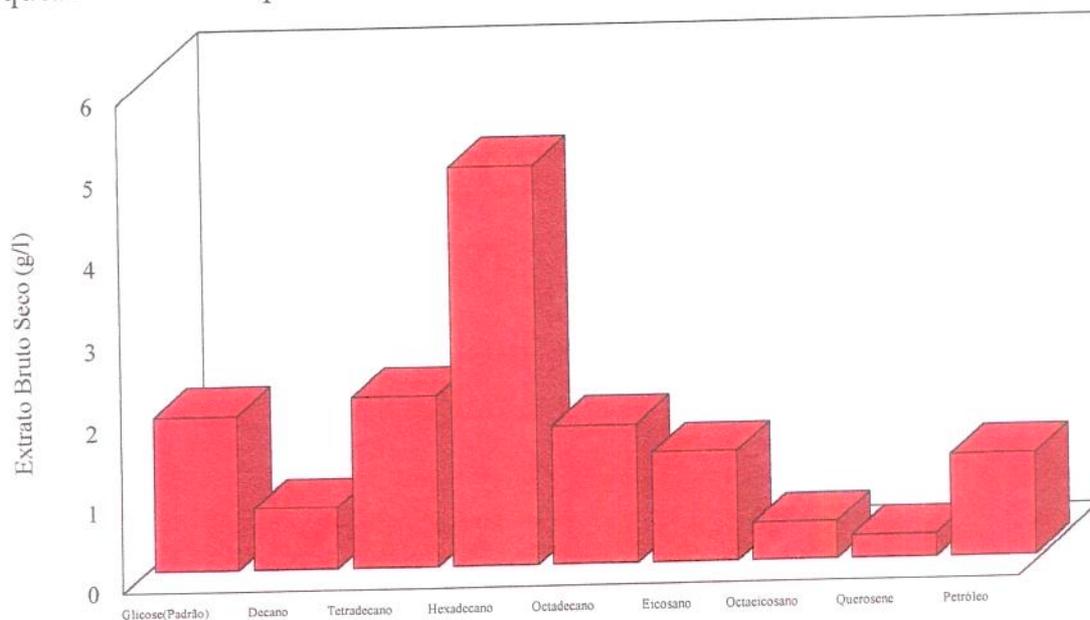


FIG.12 - Influência da Utilização de Diferentes Hidrocarbonetos na Produção de Extrato Bruto de Biosurfactante

4.4.11. Estudo da Influência da Adição de Diferentes Hidrocarbonetos no Meio Basal na Tensão Superficial

A Tensão Superficial média de 27mN/m para os meios de cultura adicionados de n-alcenos foi cerca de duas unidades mais alta que a tensão do meio de cultura contendo apenas glicose, valor médio de 25mN/m como fonte de carbono . Porém o tamanho da cadeia dos n-alcenos não influenciou no abaixamento de tensão superficial do meio de fermentação , cujos valores se mostraram similares .

Apenas o meio de cultura onde adicionou-se querosene mostrou uma tensão superficial um pouco superior às demais, 30mN/m. A pouca diferença de variação dos valores obtidos de tensão superficial apesar de haver diferença na quantidade de extrato bruto produzido se deve a concentração micelar crítica, a qual geralmente é atingida apenas com 10mg/L e onde a partir de tal valor não há mais abaixamento da tensão superficial. Isto mostra a formação de micela em ambos os meios de cultura testados, não importando a quantidade de biosurfactante produzido.

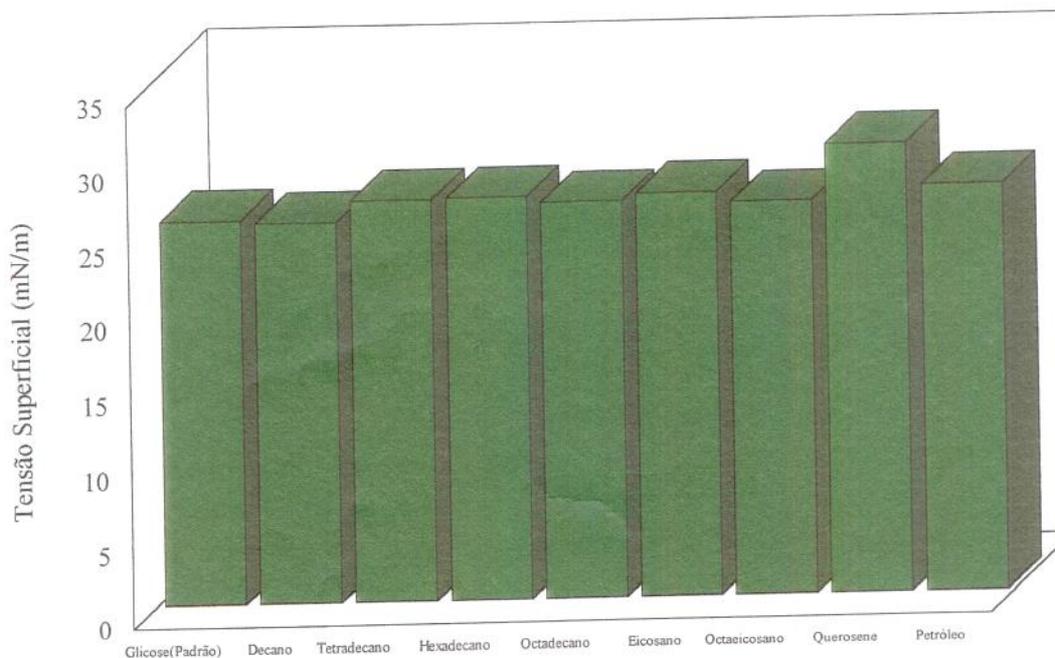


FIG. 13 - Influência da Adição de Diferentes Hidrocarbonetos no Meio Basal na Tensão Superficial

4.4. 12 Estudo da Influência de Diferentes Fontes de Nitrogênio na Massa Celular

O comportamento da linhagem 226 em relação a adição de fonte de nitrogênio foi estudado em relação ao crescimento da linhagem.

Adicionou - se ao meio na concentração de 0,1% de: uréia, NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, Extrato de Levedura e Peptona. Como podemos observar na Figura 13, só houve crescimento da linhagem 226, quando esta foi cultivada em meio contendo extrato de levedura ou peptona como fonte de nitrogênio. Não houve crescimento celular quando a nenhuma fonte de nitrogênio estava presente no meio de cultura.

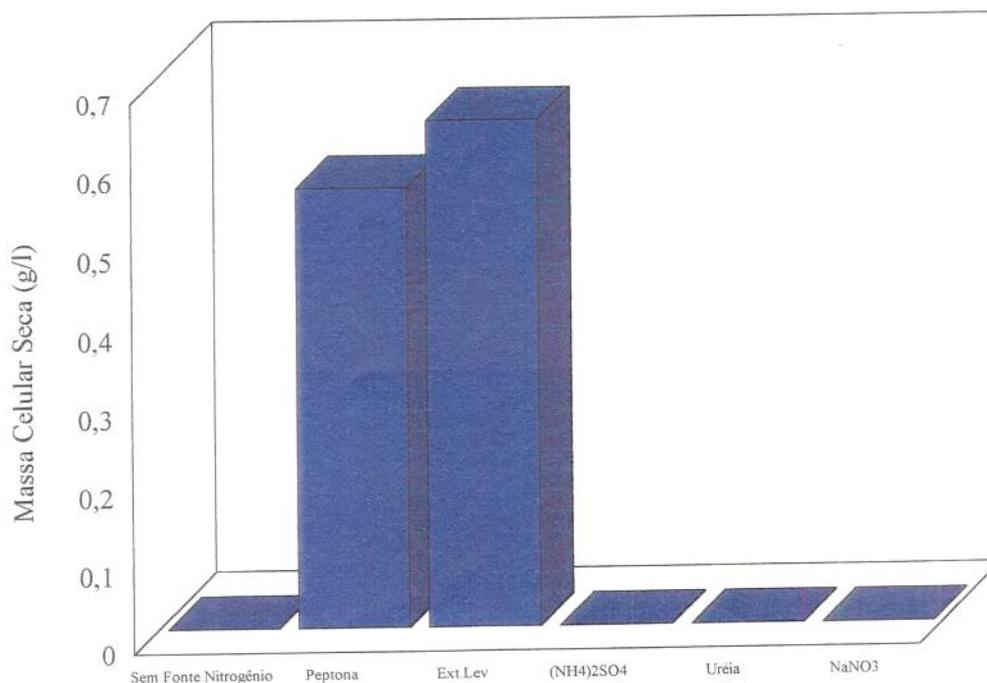


FIG.14 - Influência da Utilização de Diferentes Fontes de Nitrogênio na Produção de Massa Celular

4.4.13. Estudo da Influência de Diferentes Fontes de Nitrogênio na Produção de Extrato Bruto de Biosurfactante

A produção de extrato bruto de biosurfactante quando se utilizou peptona foi praticamente igual a produção com extrato de levedura, 1,35g/l e 1,42g/l, respectivamente. No entanto, quando se utilizou 0,1% de extrato de levedura com 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fonte esta presente ao meio basal, a produção foi de 1,9g/l, mostrando uma produção média de 0,60g a mais do que quando se utiliza extrato de levedura isoladamente. Vale lembrar que apenas $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio não promoveu crescimento da linhagem, mostrando a importância da combinação de ambas as fontes de nitrogênio.

Santos et alli (1984), estudaram a produção de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa*, cuja produção foi pobre na presença de extrato de levedura, atingindo valor máximo quando se utilizou nitrato como fonte de nitrogênio.

Kitamoto et alli (1990) obtiveram uma alta produção de biosurfactante por uma linhagem de *Candida antarctica*, quando utilizou, como fonte de nitrogênio, nitrato a uma concentração de 0,2%. A adição de NH_4Cl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fontes de nitrogênio resultaram na diminuição de pH, e consequentemente numa pequena produção.

Hommel et alli (1987) relataram que a adição de uréia como fonte de nitrogênio não foi efetiva para a produção de biosurfactante pela levedura *Torulopsis apicola*.

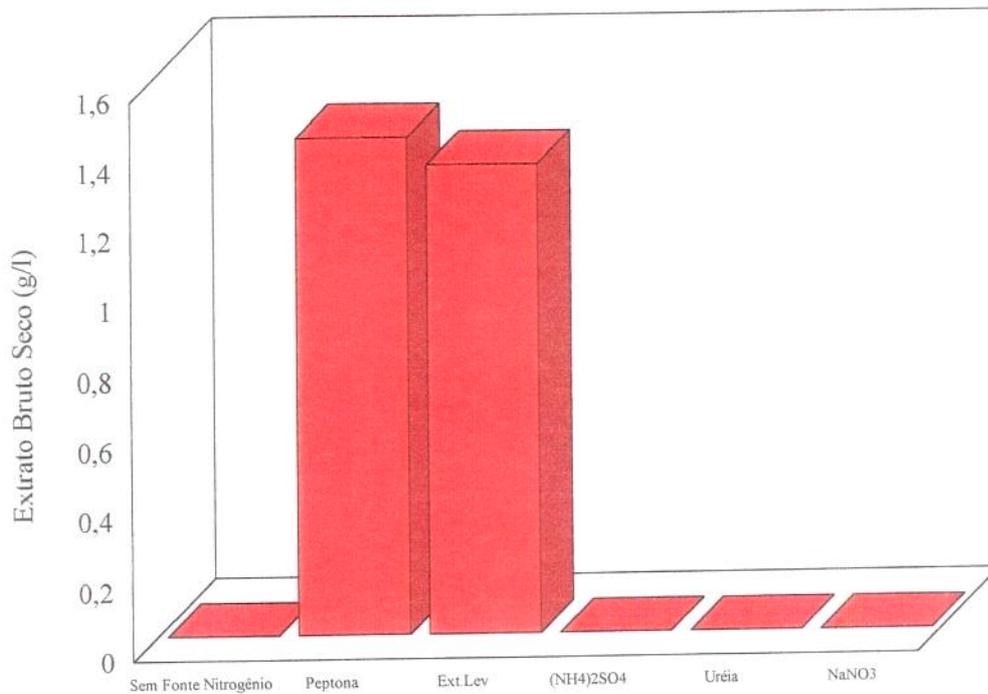


FIG.15- Influência da Utilização de Diferentes Fontes de Nitrogênio na Produção de Extrato Bruto de Biosurfactante

4.4.14 Estudo da Influência de Diferentes Fontes de Nitrogênio na Tensão Superficial

Apenas as fontes de nitrogênio que promoveram crescimento da linhagem estudada, e conseqüente produção de biosurfactante, é que provocaram abaixamento de tensão superficial do meio de cultura. Os meios de cultura que continham umas das fontes que não provocaram o crescimento da linhagem estudada tiveram um valor de tensão superficial igual ao de solução padrão isenta de inóculo, as quais apresentaram um valor médio de 45mN/m.

A tensão superficial do meio de cultura contendo extrato de levedura como fonte de levedura reduziu de 42mN/m para 25,92mN/m, e a que continha peptona de 41,21mN/m para 25,56mN/m .

Não há portanto diferença significativa em relação à redução máxima obtida por estas duas fontes de nitrogênio, podendo diferir apenas na quantidade de biosurfactante necessária, em cada um dos meios para que ocorresse este abaixamento máximo de tensão.

A tensão superficial obtida quando se utilizou 0,1% de extrato de levedura com 0,1% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi praticamente igual à obtida com apenas extrato de levedura como fonte de nitrogênio .

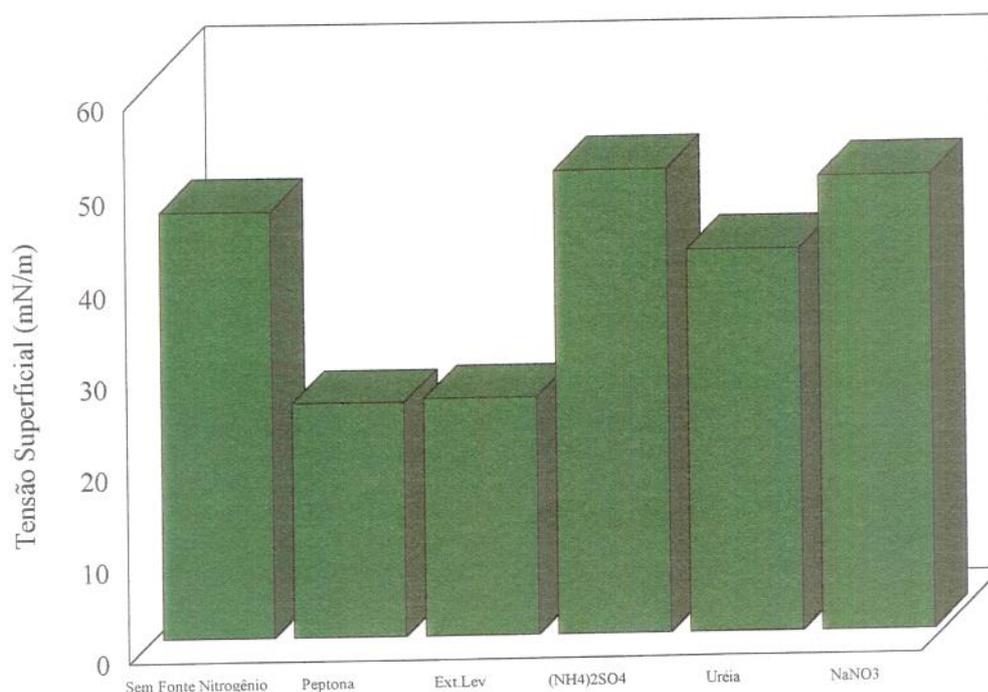


FIG.16 - Influência da Utilização de Diferentes Fontes de Nitrogênio na Tensão Superficial

4.4.15. Estudo da Influência de Diferentes Combinações de Fontes de Nitrogênio na Produção de Massa Celular

Com a finalidade de observarmos se a adição de fontes diferentes de nitrogênio proporcionam um melhor crescimento para a linhagem estudada e conseqüentemente uma maior produção de biosurfactante, foram feitas várias combinações de extrato de levedura e peptona, as quais isoladamente proporcionaram crescimento da linhagem e produção de biosurfactante.

Como podemos observar na fig.17, 0,1% de cada uma das fontes de nitrogênio compostas de: extrato de levedura + peptona + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, extrato de levedura + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + NaNO_3 foram as fontes que proporcionaram melhor crescimento celular de 2,52g/l e 2,43g/l, respectivamente, contra 0,64g/l de massa celular para o extrato de levedura e 0,56g/l para a peptona quando utilizados separadamente como fontes de nitrogênio como podemos observar no item 5.4.12.

O resultado deste experimento mostra a importante interferência da adição conjunta de duas ou mais fontes de nitrogênio para a produção de biosurfactante.

Cooper & Paddock cultivaram a levedura *Torulopsis bombicola* em meios de cultura contendo 4% de glicose, 0,1% de extrato de levedura e 0,05mol de diversas fontes de nitrogênio inorgânicas, dentre elas NaNO_3 , NH_4Cl , NH_4NO_3 e $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$. A maior produção de massa celular foi obtida quando se adicionou extrato de levedura com $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, cuja produção de massa celular seca foi 10,14g/l. A fonte que induziu uma menor produção de massa celular foi a constituída de NaNO_3 com extrato de levedura, cuja produção de massa celular seca foi de 4,82g/l.

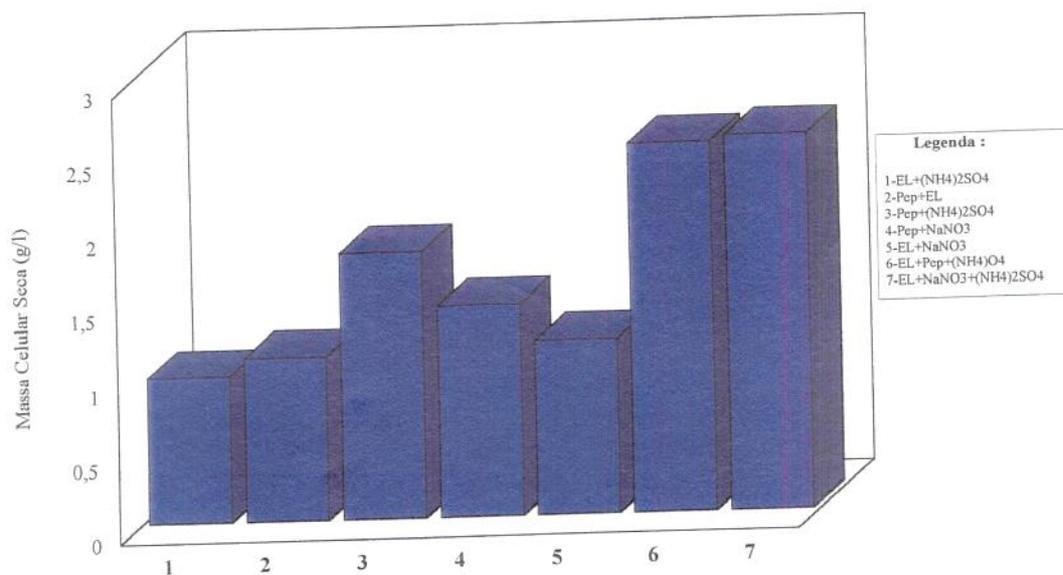


FIG.17 - Influência da Utilização de Diferentes Combinações de Fontes de Nitrogênio na Produção de Massa Celular

4.4.16. Estudo da Influência de Diferentes Combinações de Fontes de Nitrogênio Produção de Extrato Bruto de Biosurfactante

As combinações de fontes de nitrogênio que proporcionaram uma maior produção de biosurfactante foram peptona+(NH₄)₂SO₄, extrato de levedura+ (NH₄)₂SO₄+ NaNO₃ e extrato de levedura+(NH₄)₂SO₄, com uma produção de 2,32g/l, 2,07g/l e 1,90g/l respectivamente, mostrando que a fonte extrato de levedura + (NH₄)₂SO₄ + NaNO₃ foi efetiva tanto para o crescimento celular como para a produção de biosurfactante.

A adição do (NH₄)₂SO₄ conjuntamente com outras fontes de nitrogênio como extrato de levedura e peptona se mostrou mais eficiente do que a adição de peptona e extrato de levedura com NaNO₃. A produção com peptona + (NH₄)₂SO₄ foi 2,32g/l contra 1,42g/l quando adicionamos peptona + NaNO₃. O mesmo ocorreu quando adicionamos de extrato de levedura com NaNO₃. A produção foi de 1,17g/L contra 1,9g/l obtidas quando utilizamos extrato de levedura + (NH₄)₂SO₄, o que mostra que a linhagem n° 226 produz maior quantidade de biosurfactante quando cresce em meio contendo peptona ou extrato de levedura, em combinação com (NH₄)₂SO₄.

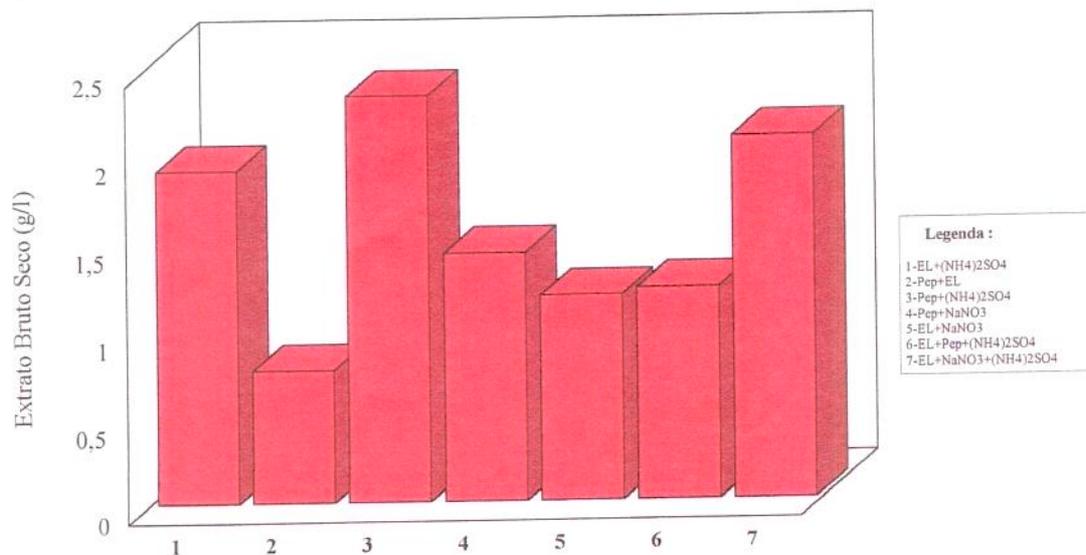


FIG.18 - Influência da Utilização de Diferentes Combinações de Fontes de Nitrogênio na Produção de Extrato Bruto de Biosurfactante

4.4.17. Estudo da Influência de Diferentes Combinações de Fontes de Nitrogênio na Tensão Superficial

Os valores de tensão superficial obtidos para os meios de cultura contendo diferentes combinações de fontes de nitrogênio compostas foram praticamente iguais, com pequenas variações nos valores, devido ao efeito de formação de micela nos meios de cultura compostos pelas diferentes fontes de nitrogênio, conforme ilustrado na Figura 19 .

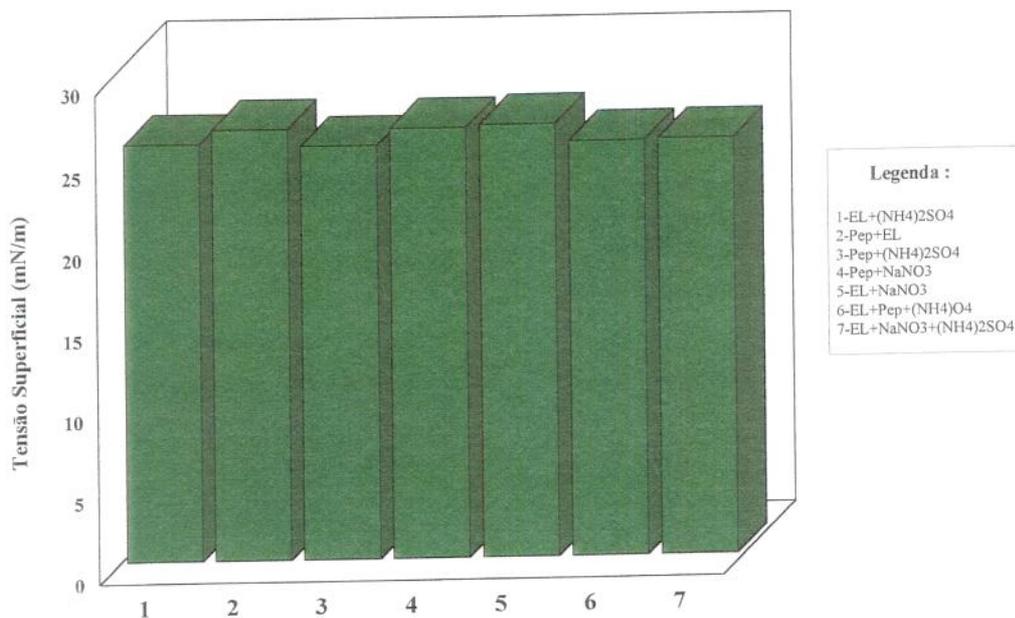


Fig.19- Influência da Utilização de Diferentes Combinações de Fontes de Nitrogênio na Tensão Superficial

4.4.18. Estudo da Influência da Utilização de Ácidos Graxos como Fonte de Carbono na Tensão Superficial e na Produção de Massa Celular e Extrato Bruto de Biosurfactante

A influência da adição ácidos graxos sobre a massa celular, produção de biosurfactante e sobre a tensão superficial foi estudada. Foi utilizado ácido oleico com e sem adição de glicose ao meio de cultura.

De acordo com a Figura 20, observamos que a adição de apenas ácido oleico ao meio de cultura não estimulou o crescimento da linhagem e conseqüentemente não houve produção de biosurfactante e nem tampouco, redução da tensão superficial .

A adição de glicose ao meio de cultura promoveu o crescimento celular mas não estimulou a produção de biosurfactante, pois o valor de tensão superficial do meio com o inóculo foi praticamente igual ao valor do padrão da solução de ácido oleico com glicose, cerca 33mN/m. O meio contendo ácido oleico e glicose, apesar de não indicar produção de biosurfactante, foi acidificado. Constatou-se ausentes de produção , uma vez que não ocorreu floculação, sugerindo que o ácido oleico inibiu a produção de biosurfactante em vez de estimulá-la, já que quando utilizamos apenas glicose em meio de cultura temos uma considerável produção de extrato bruto de biosurfactante.

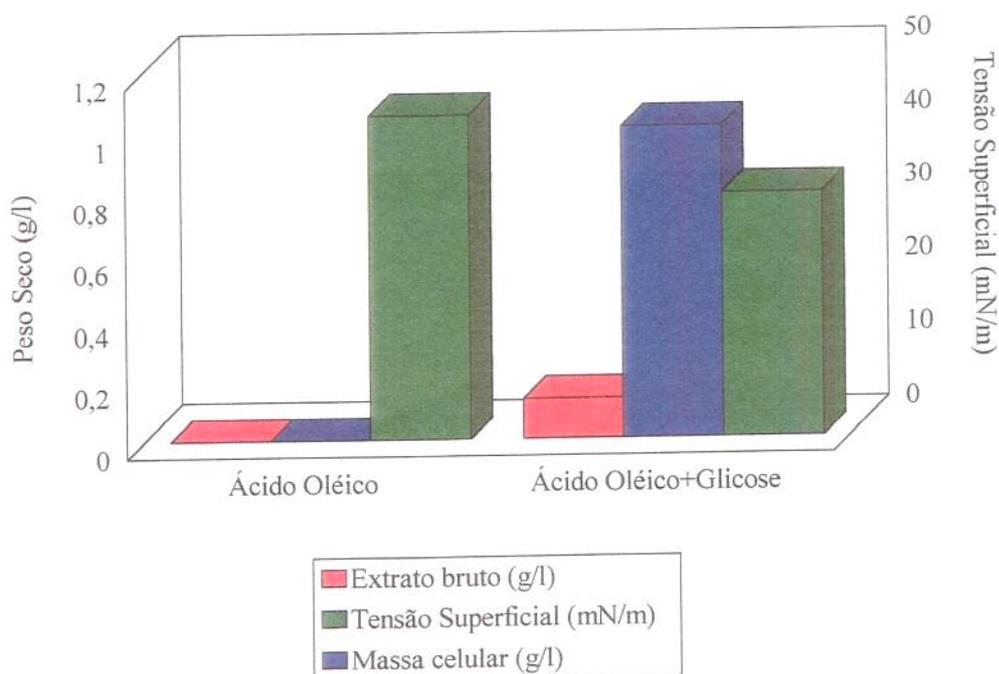


Fig.20 - Influência da Utilização de Ácidos Graxos como Fonte de Carbono

Em contrapartida aos valores encontrados, a literatura relata a produção de surfatos lipídicos, que são biosurfactantes, quando crescem em uma mistura de glicose e ácido oléico (Asmer et alii, 1988), ácido palmítico (Ito & Inoue, 1982a) ou glicose e óleos vegetais (Cooper & Paddock, 1984; Zhou et alii, 1992).

4.4.19. Estudo da Influência da Adição de Minerais na Tensão Superficial e Extrato Bruto de Biosurfactante

Dois meios de culturas foram preparados com os mesmos nutrientes diferindo apenas na adição ou não de uma solução de minerais, cuja composição está descrita no item 3.1. Foi verificado o grau de influência da adição de minerais ao meio de cultura basal. Verifica-se através da Figura 21 que a não adição da solução de minerais ao meio de cultura reduziu pela metade a produção de biosurfactante quando comparado com a adição da solução de minerais de 0,892g/l e 1,9g/l, respectivamente.

Quanto aos valores de tensão superficial, praticamente não há diferenças, o que pode ser observado através da Fig.21

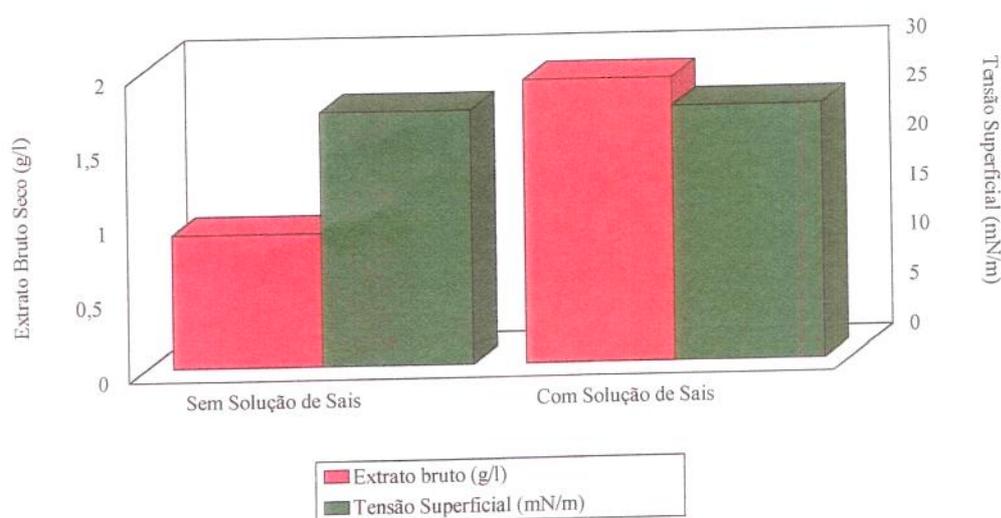


FIG.21 - Influência da Adição da Solução de Minerais na Produção de Extrato Bruto de Biosurfactante e na Tensão Superficial.

Cooper et alii (1981) observaram que a adição de cátions ao meio de cultura pode ter um efeito positivo na produção de surfactante em alguns casos. Por exemplo, a formação de surfactina por *Bacillus subtilis* foi estimulada pela adição de íons ou sais de ferro ou manganês ao meio de cultura.

O efeito positivo de EDTA na produção de biosurfactantes pode ser observado no caso dos lípides trehalose produzido por *Rhodococcus erythropolis*. Em contrapartida, a produção de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas sp* DSM 287 foi fortemente inibida por EDTA (Kosaric, 1987).

4.4.20. Estudo da Influência da Concentração de Extrato de Levedura como Fonte de Nitrogênio na Massa Celular da linhagem 226

Devido ao fato do extrato de levedura ter se revelado como uma boa fonte de nitrogênio quando adicionado ao meio de cultura como fonte de nitrogênio, foram testadas várias concentrações de extrato de levedura ao meio de cultura basal, com o objetivo de avaliar a influência do aumento da concentração de extrato de levedura sobre a produção de massa celular, a produção de extrato bruto de biosurfactante e a tensão superficial.

Conforme podemos observar a Figura 22, conforme se aumenta a concentração de extrato de levedura no meio de cultura, aumenta-se a quantidade de massa celular produzida, mostrando a relação direta da adição de fonte de nitrogênio para a síntese de proteínas. Cooper & Paddock (1984) estudaram a produção de massa celular por *Torulopsis bombicola* em meio de cultura contendo 4% de glicose com duas diferentes concentrações de extrato de levedura, as quais foram 0,1 e 0,5%.

De acordo com os autores, o meio que continha 4% de glicose com 0,1% de extrato de levedura produziu uma massa celular de 3,6g/l e o meio que continha a mesma concentração de glicose do meio anterior com 0,5% de extrato de levedura produziu 10,7g/l de massa celular, sugerindo como aconteceu com os dados acima, que o aumento da concentração de extrato de levedura no meio fornece melhores condições para a síntese de uma maior quantidade de material celular.

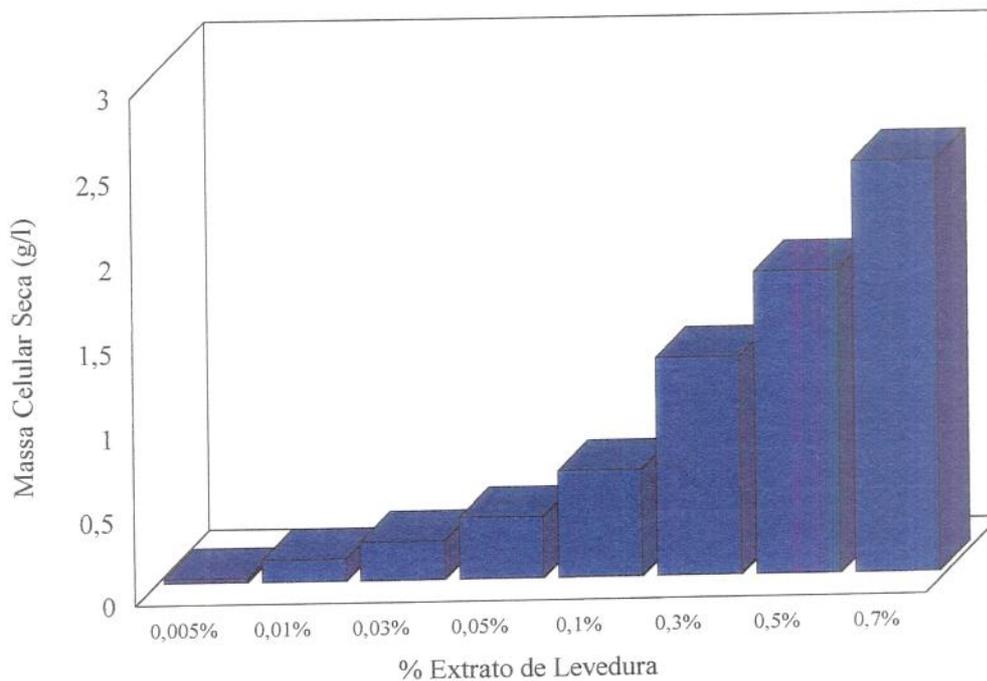


FIG.22- Influência da Concentração de Extrato de Levedura na Produção de Massa Celular

4.4.21. Estudo da Influência da Concentração de Extrato de Levedura como Fonte de Nitrogênio na Produção de Extrato Bruto de Biosurfactante

A produção de biosurfactante aumentou com o aumento da concentração de extrato de levedura no meio de cultura, quando esta foi adicionada em concentrações de até 0,5%, de extrato de levedura.

A adição de 0,7% de extrato de levedura não proporcionou aumento na produção de biosurfactante talvez devido ao fato de termos limitado a fonte de carbono a 3% de glicose para todas as concentrações de extrato de levedura utilizadas.

A adição de concentrações inferiores a 0,03%, além de não produzir crescimento celular, não induziu a produção de biosurfactante como consequência.

Cooper & Paddock (1984) estudaram a produção de biosurfactante por *Torulopsis bombicola* em meio de cultura contendo 4% de glicose com duas diferentes concentrações de extrato de levedura, as quais foram 0,1 e 0,5%. De acordo com os autores, o meio que continha 4% de glicose com 0,1% de extrato de levedura produziu 1,0g/l de extrato bruto de biosurfactante e o meio que continha a mesma concentração de glicose do anterior, com 0,5% de extrato de levedura, produziu apenas traços, sugerindo que o aumento da concentração de extrato de levedura pode ocasionar o aumento da massa celular, mas por outro lado pode reduzir ou inibir a produção de biosurfactante.

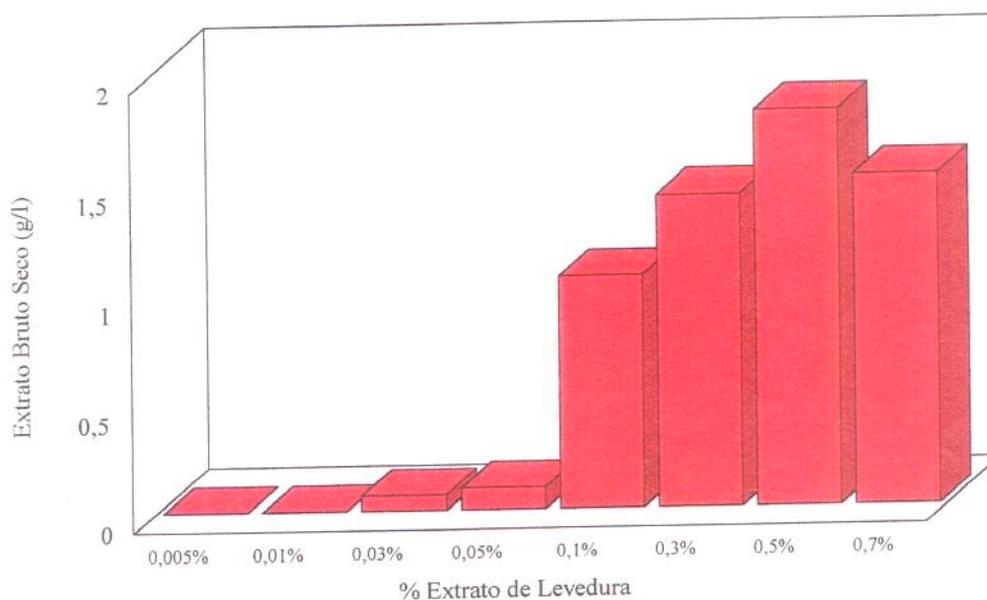


FIG.23 - Influência da Concentração de Extrato de Levedura na Produção de Extrato Bruto

4.4.22. Estudo da Influência da Concentração de Extrato de Levedura como Fonte de Nitrogênio na Tensão Superficial

As concentrações de extrato de levedura inferiores a 0,03%, 0,005% e 0,01% não tiveram redução da tensão superficial do meio em que foram inoculadas em relação ao padrão, meio sem inóculo. A partir da adição da concentração de 0,03% de extrato de levedura, houve crescimento celular, produção de biosurfactante e conseqüentemente redução da tensão superficial do meio.

A tensão superficial do meio de cultura centrifugado contendo 0,03% de extrato de levedura teve um valor de tensão um pouco superior, ou seja uma redução de tensão superficial aos valores obtidos quando adicionamos concentrações de extrato de levedura iguais ou superiores a 0,05%, cuja tensão superficial média para os meios contendo concentrações superiores a 0,05% foi de 25mNm contra um valor médio de 28mN/m para o meio contendo 0,03% de extrato de levedura.

Novamente concluímos que apesar da produção de biosurfactante através do meio que continha apenas 0,03% de extrato de levedura ter sido bastante inferior, em relação a quantidade produzida quando adicionamos concentrações superiores a 0,05%, a diferença de tensão superficial entre um meio e outro é pequena. Isto se deve mais uma vez à formação de micela quando o biosurfactante está presente em solução, diferindo apenas na concentração necessária para cada meio para que esta se inicie, cuja concentração que induz o início da formação da micela é denominada concentração micelar crítica.

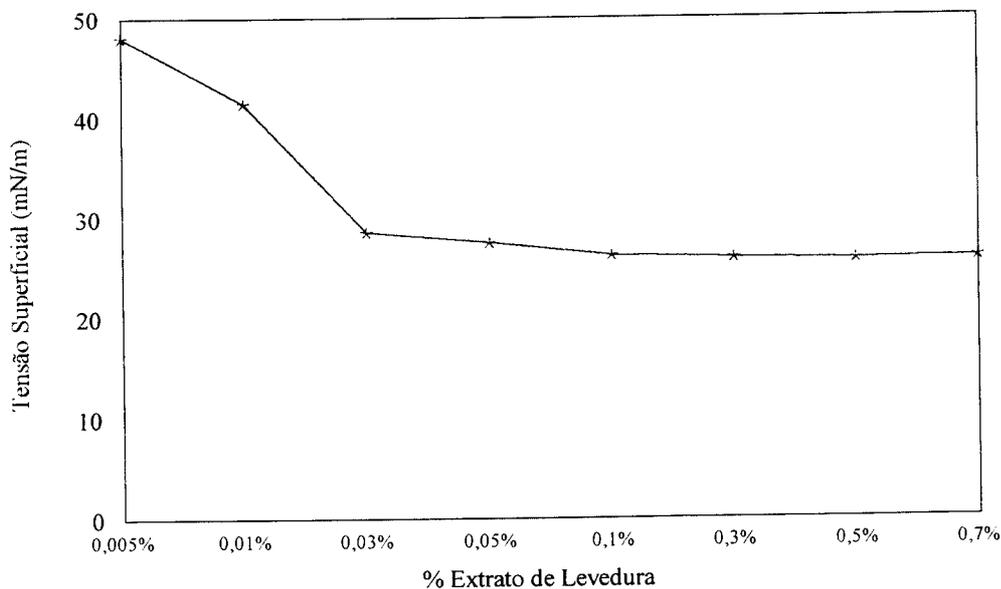


FIG.24 - Influência da Concentração de Extrato de Levedura na Tensão Superficial

4.4.23. Estudo da Influência da Concentração de Peptona como Fonte de Nitrogênio na Produção de Massa Celular

A adição de peptona como fonte de nitrogênio isolada mostrou resultados bastante satisfatórios quanto a produção de massa celular, de biosurfactante e quanto a redução da tensão superficial. Esta foi testada em várias concentrações assim como foi feito para o extrato de levedura, visando descobrir o grau de influência que o aumento de concentração de peptona ocasionou sobre o crescimento celular, produção de biosurfactante e abaixamento de tensão superficial, bem como qual a concentração mínima que induz a produção de massa celular, produção de biosurfactante e redução de tensão superficial.

De acordo com a Figura 25, observamos que a concentração de 0,005% não foi suficiente para induzir o crescimento celular. Com isto também ocorreu quando se adiciona a mesma concentração de extrato de levedura.

No entanto, a concentração de 0,01% já foi suficiente para induzir o crescimento celular, fato que no caso do extrato de levedura só ocorreu numa concentração igual e superior a 0,03%.

O aumento crescente da concentração de peptona aumentou proporcionalmente a massa celular, cuja produção máxima ocorreu com a adição de 0,7% de peptona ao meio, com uma produção próxima de 2,5g/L.

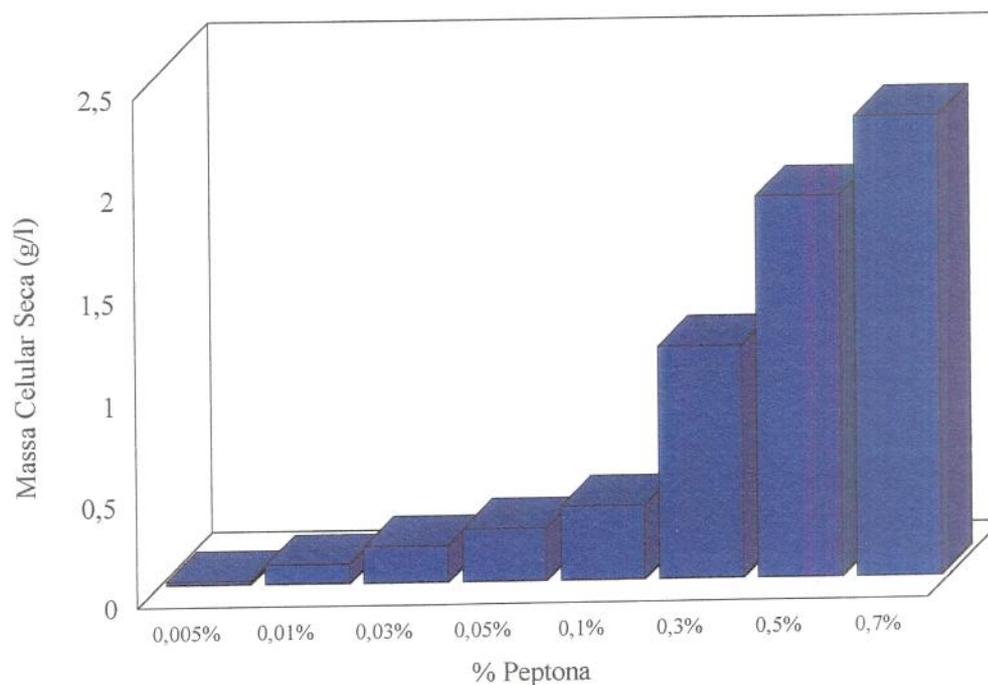


FIG.25 - Influência da Concentração de Peptona na Produção de Massa Celular

4.4.24. Estudo da Influência da Concentração de Peptona como Fonte de Nitrogênio na Produção de Extrato Bruto

A adição de peptona como fonte de nitrogênio em concentrações iguais a 0,005% e 0,01% não induziu a produção de biosurfactante. Apesar da concentração de 0,01% ter oferecido condições para o crescimento celular, não houve floculação de biosurfactante quando este foi submetido ao teste de precipitação ácida, o que sugere que a concentração mínima de

peptona necessária para que a linhagem seja induzida a produzir biosurfactante é de 0,03% de peptona.

Como ocorreu quando foram testadas várias concentrações de extrato de levedura, no meio de cultura, a produção de biosurfactante aumentou proporcionalmente com o aumento da fonte de nitrogênio. No caso, o estudo foi realizado para o extrato de levedura e peptona, apenas até a concentração de 0,5%. O aumento de concentração de fonte de nitrogênio para 0,7% aumentou a produção de massa celular, mas fez com que a quantidade de biosurfactante produzida fosse diminuída cerca de 1g.

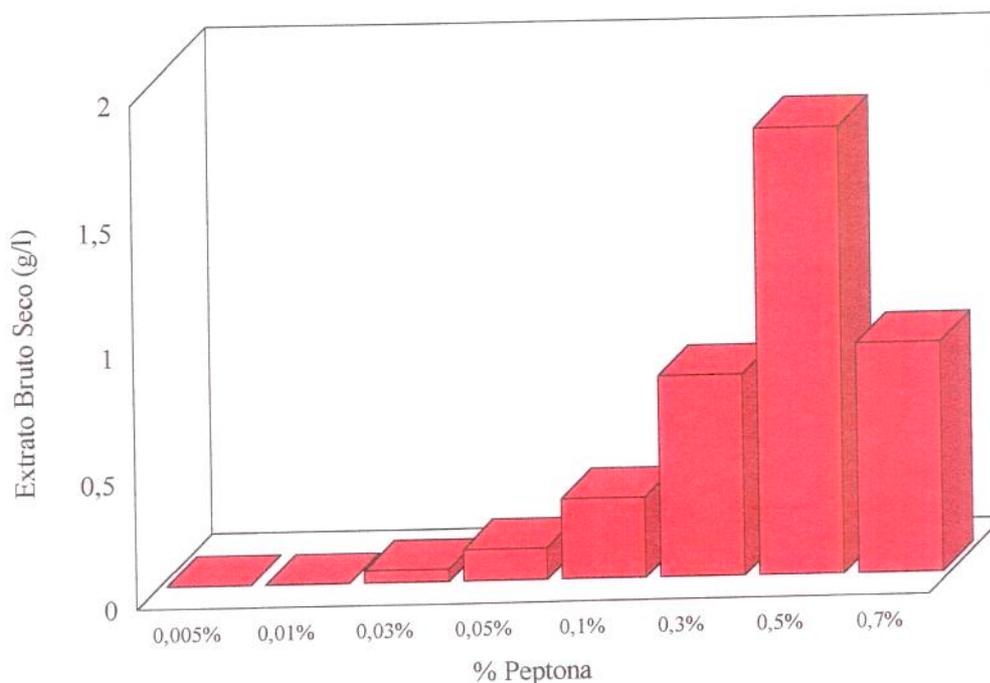


FIG.26 - Influência da Concentração de Peptona na Produção de Extrato Bruto

4.4.25. Estudo da Influência da Concentração de Peptona como Fonte de Nitrogênio na Tensão Superficial

De acordo com a Figura 27, observamos que a redução da tensão superficial se iniciou quando adicionamos concentrações de peptona iguais ou superiores a 0,03%.

Em concentrações inferiores, no caso 0,005% e 0,01%, a tensão superficial do meio após fermentação se mostrou próxima ou superior ao valor do meio sem inóculo, cujo valor médio para todas as concentrações testadas foi de 45mN/m.

A tensão superficial se mostrou praticamente constante para as concentrações de 0,03% a 0,5%. Apesar da quantidade de biosurfactante presente no meio contendo 0,03% ser bastante inferior em relação à quantidade presente no meio com 0,5% de peptona, a tensão superficial é praticamente constante pelo fato do biosurfactante produzido em cada ensaio ter sido suficiente para que ocorresse formação de micela do biosurfactante em solução. O aumento da quantidade de biosurfactante produzido não provocou maior redução de tensão superficial, já que a concentração necessária para que se dê início a formação de micela já foi atingida nos meios com diferentes concentrações de peptona.

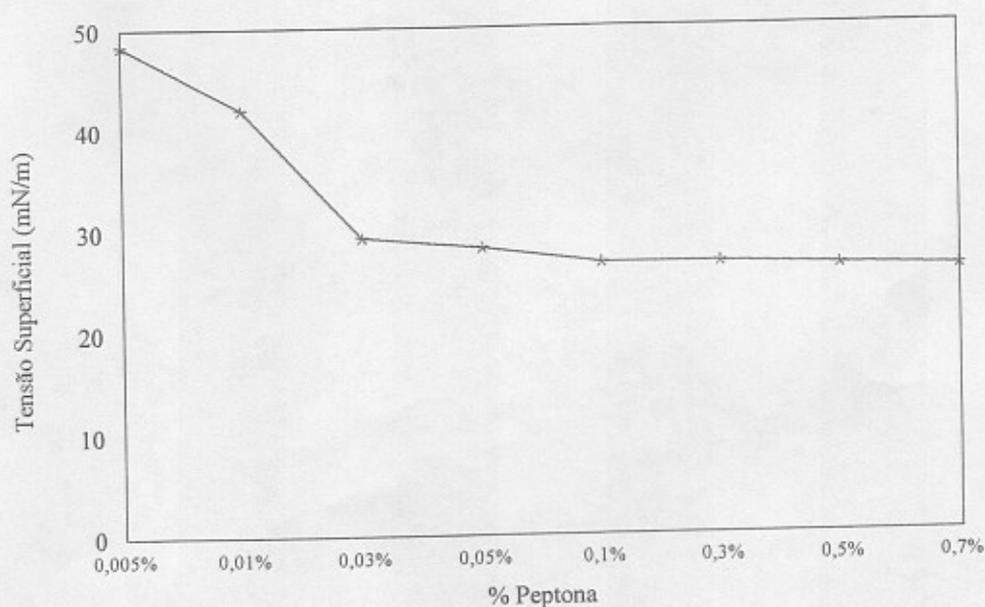


FIG.27 - Influência da Concentração de Peptona na Tensão Superficial

4.5 Produção de Biosurfactantes pelo método de “Resting Cells”

O processo denominado “Resting Cells” tem a finalidade de, primeiro promover um crescimento significativo da linhagem em uma fonte de carbono primária, e quando a mesma atinge seu crescimento máximo é transferida para um meio de cultura contendo um substrato insolúvel, como hidrocarbonetos ou óleos vegetais, os quais atuam como precursores hidrofóbicos para o aumento da produção de biosurfactantes. A linhagem nº 226 foi inoculada em um meio basal e após 48 h de cultivo, foram transferidas alíquotas de 1, 5, 10 e 20 ml para um meio basal contendo 1% de petróleo, como precursor hidrofóbico.

Como pode ser observado na Figura 28, os resultados obtidos foram bastante significativos, uma vez que foram obtidas concentrações de 5g/l, até então, obtidas apenas quando hexadecano foi utilizado como fonte de carbono no meio basal.

No que se refere à quantidade de inóculo, o sistema 2 foi o que apresentou maior produção de biosurfactante sendo que nos valores de tensão superficial praticamente não ocorreram variações.

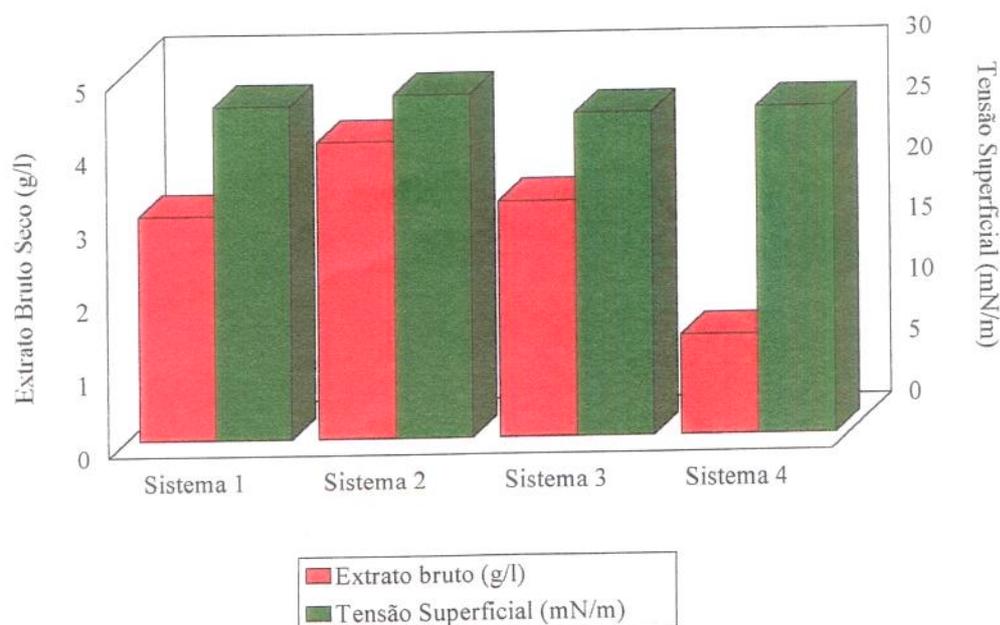


FIG.28 - Influência da Quantidade de Inóculo no processo de “Resting Cells”

Legenda da Figura :

- Sistema 1 : 1ml Meio Fermentação Basal c/ 3% Glicose (48 horas) adicionado ao Meio Basal c/ 1% Glicose + 3% Petróleo (144 horas)
- Sistema 2 : 5ml Meio Fermentação Basal c/ 3% Glicose (48 horas) adicionado ao Meio Basal c/ 1% Glicose + 3% Petróleo (144 horas)
- Sistema 3 : 10ml Meio Fermentação Basal c/ 3% Glicose (48 horas) adicionado ao Meio Basal c/ 1% Glicose + 3% Petróleo (144 horas)
- Sistema 4 : 20ml Meio Fermentação Basal c/ 3% Glicose (48 horas) adicionado ao Meio Basal c/ 1% Glicose + 3% Petróleo (144 horas)

Venkata & Karanth (1989), estudaram a produção de glicolípides por uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa*, a qual produziu 0,72g/l pelo processo de “Resting Cells” contra apenas 0,43g/l obtidos pela fermentação tradicional.

Este método tem sido aplicado com êxito para a produção de ramnolípides, através de células imobilizadas ou livres de *Pseudomonas sp* DSM 2874; produção de soforose lípides por *Torulopsis bombicola* e produção de tetraésteres de trehalose por *Rhodococcus erythropolis*. No caso de *Arthrobacter sp* DSM 2567 foi possível utilizar vários mono; di ou trissacarídeos como precursores para se obter os glicolípides correspondentes (Kosaric,1987) .

4.6. Atividade do Bioemulsificante

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).

Neste trabalho 5ml de vários meios de cultura contendo glicose, maltose, sacarose, e glicerol como fontes de carbono e meios contendo glicose com um n - alcano de cadeia de 14, 18, 20, 28 e petróleo foram emulsificandos com 2% de tetradecano e 2%de óleo de soja. O espectofotômetro foi zerado para cada meio com este isento de inóculo. Os diferentes meios de fermentação foram filtrados em mebrana millipore 0,45 μ m (Johnson et alli,1992) para evitar a influência de partículas durante a leitura da absorvância.

Os meios de cultura contendo os diferentes substratos como fontes de carbono, após sofrerem adição de 2% de tetradecano, mostraram que uma maior atividade bioemulsificante foi o obtida com o glicerol como fonte de carbono, o qual apresentou uma absorvância de 1,301, ficando a seguir os meios contendo sacarose e petróleo como fontes de carbono. O meio que já continha tetradecano e foi emulsificado com mais 2% de tetradecano teve pouca alteração de absorvância, a qual aumentou apenas de 0,678 para 0,699.

Quando os meios de cultura contendo os diferentes substratos foram emulsificados com 2% de óleo de soja, estes apresentaram absorvância superiores às obtidas quando os meios de fermentação receberam 2% de tetradecano, mostrando que o biosurfactante produzido tem melhor ação emulsificante sobre o óleo que sobre o n-alcano. Novamente os meios de cultura contendo glicerol, sacarose e petróleo tiveram uma absorvância alta, sendo a máxima igual 2,000 quando os meios de cultura foram emulsionados com 2% de óleo de soja.

No entanto todos os outros meios de cultura tiveram uma absorvância superior a obtida quando estes sofreram emulsificação com tetradecano. A seguir seguem a tabela IV e um histograma com as absorvância obtidas e figuras que elucidam melhor o aspecto de cada uma das emulsões formadas com o óleo de soja e com o tetradecano, quando estes foram adicionados aos diferentes meios de culturas.

Este experimento foi baseado nos métodos de Cirigliano & Carmanm(1984) e de Jonhson et alii (1992). Cirigliano & Carmanm (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 VI. Atividade do bioemulsificante utilizando-se tetradecano e óleo de soja

ABSORVÂNCIA a 540 nm			
Fonte de Carbono (*)	Meio de Fermentação Filtrado	Meio com Tetradecano	Meio com Óleo de Soja
Glicose	0	0,854	1,699
Maltose	0	0,17	1,222
Glicerol	0,0223	1,301	2,000
Sacarose	0,05	1,011	2,000
Decano e Glicose	0	0,23	1,301
Tetradecano e Glicose	0,678	0,699	1,523
Octadecano e Glicose	0	0,688	1,426
Eicosano e Glicose	0	0	1,280
Octaeicosano e Glicose	0	0,678	1,260
Petróleo e Glicose	0,235	1,000	2,000

(*) Foram utilizadas 3% da fonte de carbono no meio de fermentação

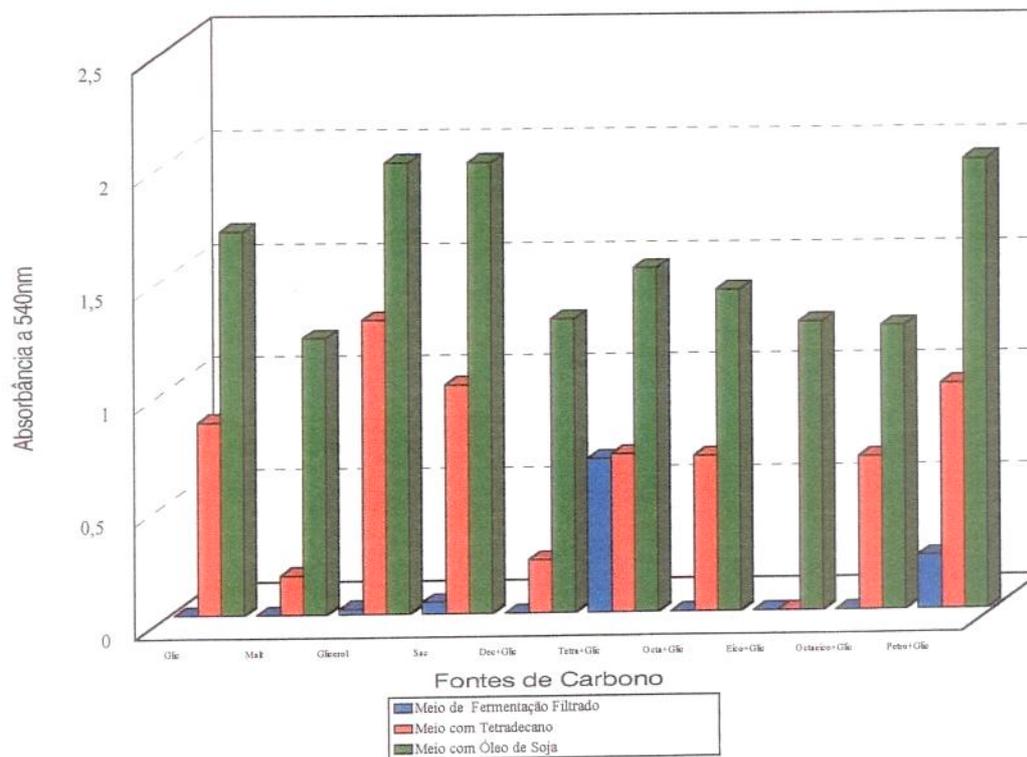


FIG.29 - Atividade Bioemulsificante do biosurfactante produzido em meios contendo diferentes fontes de carbono, emulsificados com 2% de óleo de soja e 2% de tetradecano separadamente

Legenda para as figuras:

- Legenda para as letras:

- (a) Meio de cultura centrifugado sem emulsificação,
- (b) Meio emulsificado com 2% de tetradecano,
- (c) Meio emulsificado com 2% de óleo de soja

- Legenda para os números:

- (1) Glicose,
- (2) Glicerol,
- (3) Sacarose,
- (4) Maltose,
- (5) Petróleo,
- (6) n-decano,
- (7) Tetradecano,
- (8) Dodecano,
- (9) Eicosano
- (10) Octadodecano

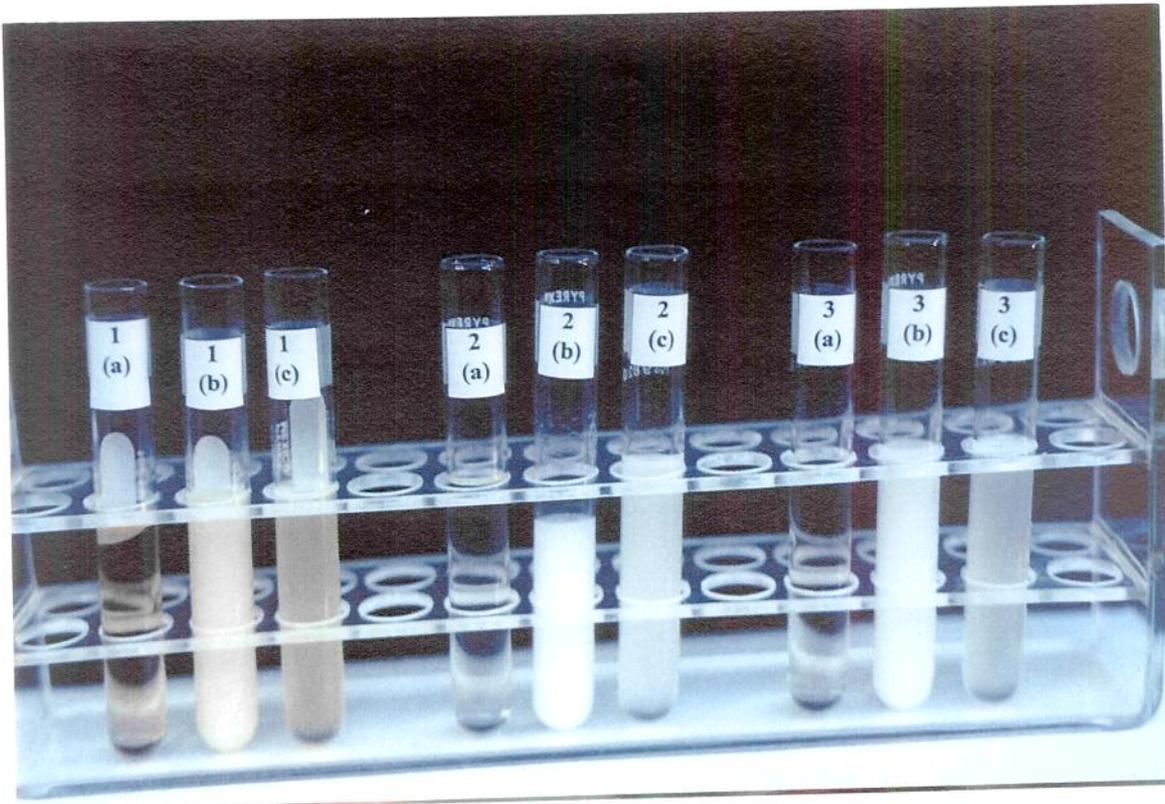


FIG.30- Emulsão formada pela emulsificação dos meios de cultura contendo (1)glicose, (2)glicerol, (3)sacarose como fontes de carbono com 2% de óleo de soja e 2%de tetradecano separadamente

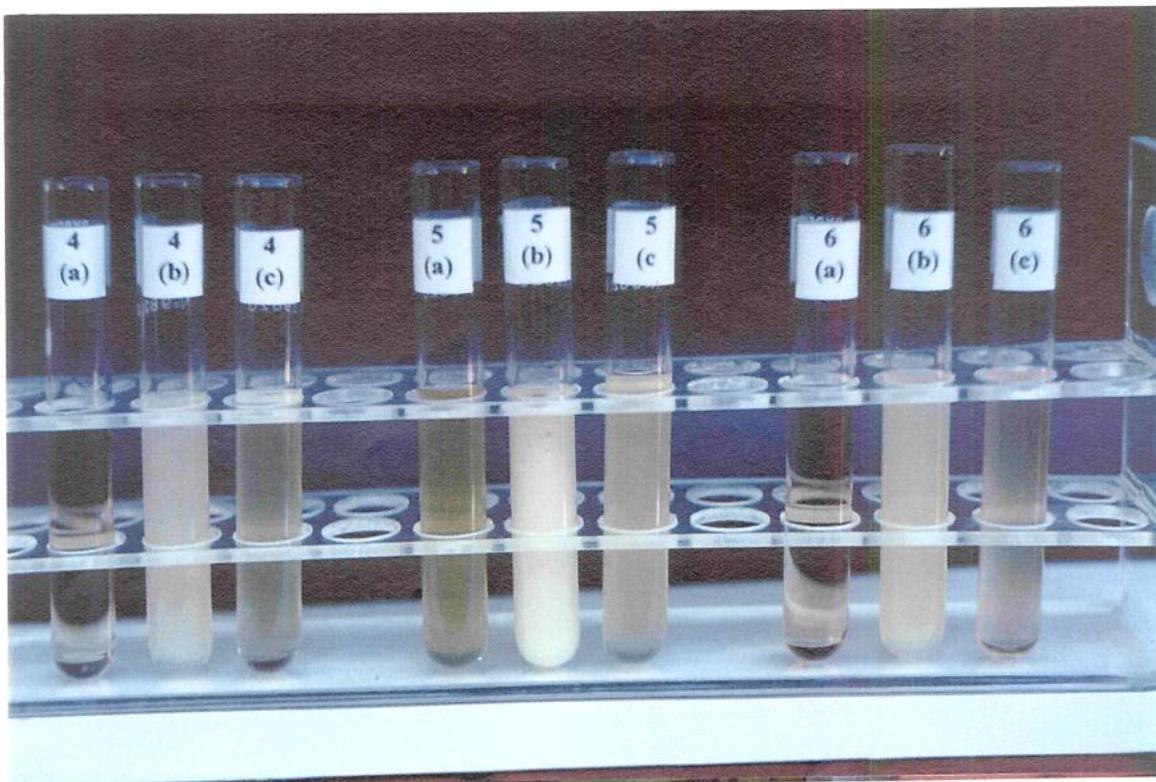


FIG.31- Emulsão formada pela emulsificação dos meios de cultura contendo (4)maltose, (5)petróleo, (6)n-decano como fontes de carbono com 2% de óleo de soja e 2%de tetradecano separadamente

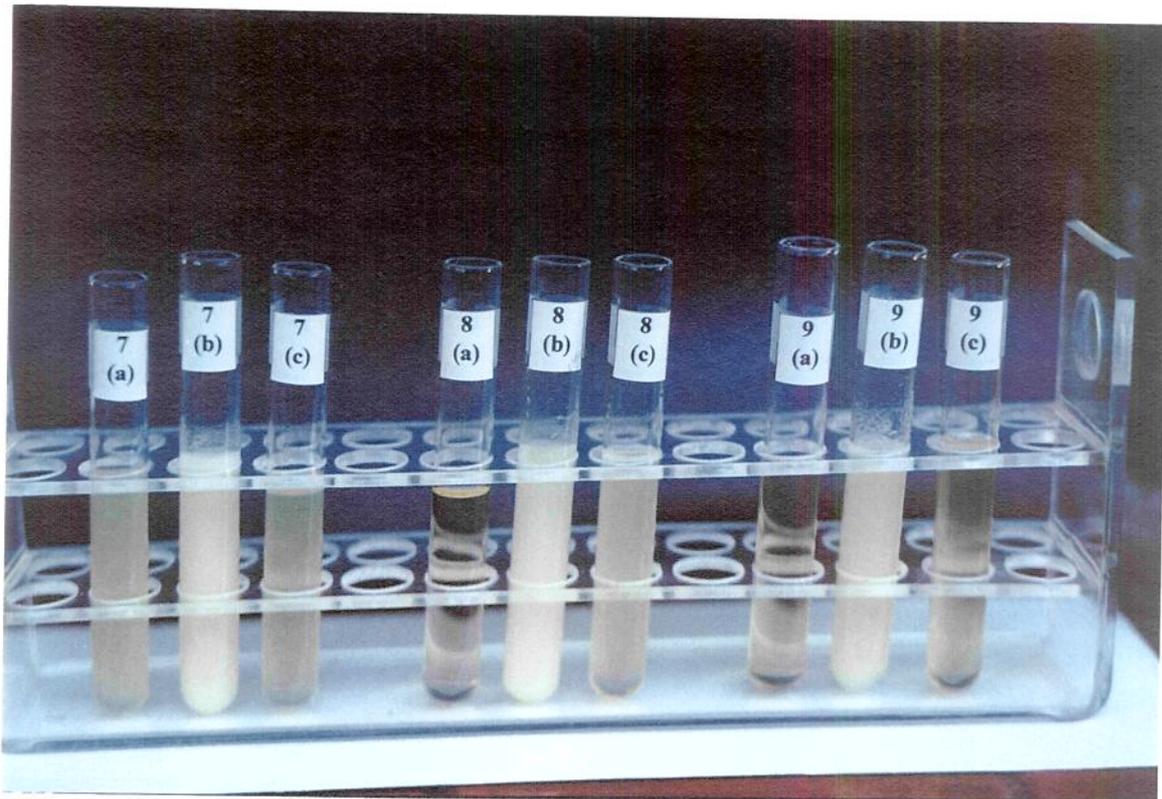


FIG.32- Emulsão formada pela emulsificação dos meios de cultura contendo (7)tetradecano, (8)dodecano, (9)icosano como fontes de carbono com 2% de óleo de soja e 2%de tetradecano separadamente

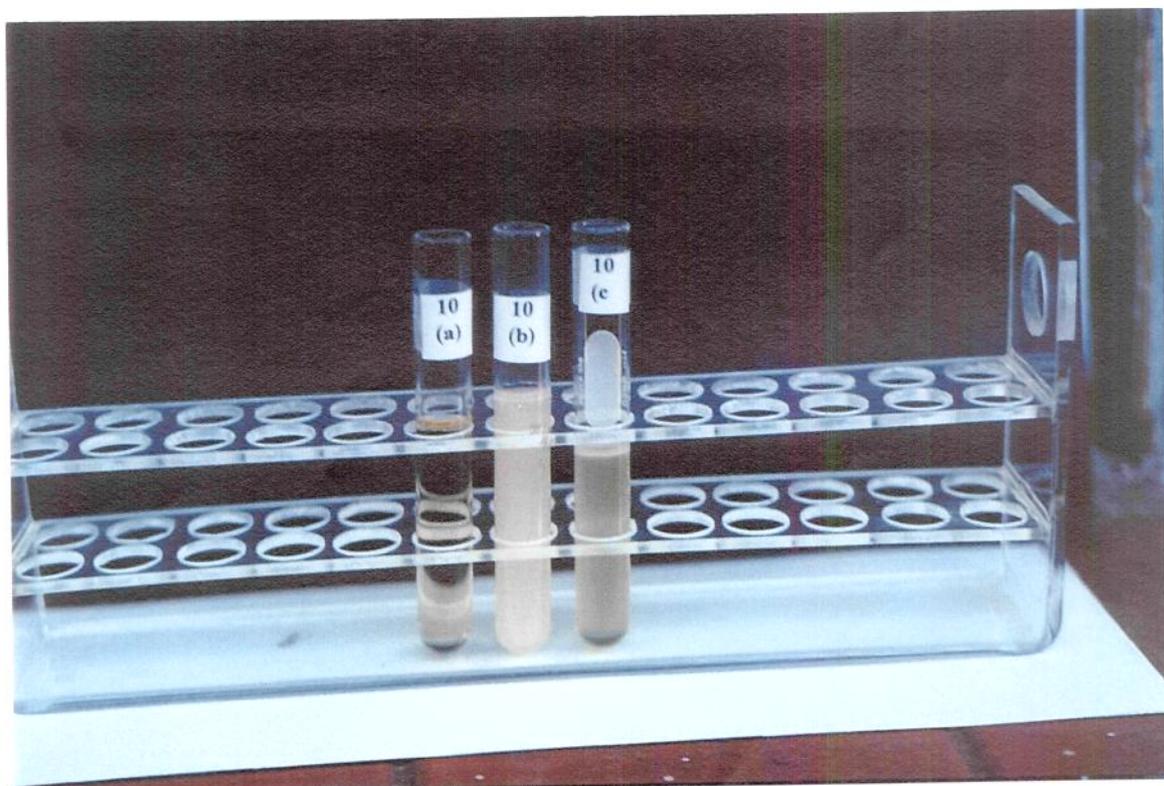


FIG.33- Emulsão formada pela emulsificação do meio de cultura contendo (10)octadodecano como fonte de carbono com 2% de óleo de soja e 2%de tetradecano separadamente

4.7. Cálculo da Concentração Micelar Crítica baseada em diluições do meio de cultura com água destilada

A concentração micelar crítica é definida como a concentração de biosurfactante necessária para que haja formação da micela, onde a partir de tal concentração não ocorre mais a redução da Tensão Superficial do meio de cultura, apesar da produção de biosurfactante poder continuar aumentando (Gerson & Zajic, 1979).

A Concentração Micelar Crítica (CMC) é determinada fazendo - se soluções com concentrações conhecidas de surfactante ou diluindo -se o meio de cultura isento de células sucessivamente. Após feitas tais diluições, mede - se a tensão superficial de cada uma delas. Constrói-se então um gráfico da tensão superficial versus o logaritmo da concentração de biosurfactante diluído em solução, como mostrado no item 4.6.

Neste estudo calculamos a CMC para três meios de cultura com diferentes fontes de carbono. Foram calculados valores da CMC para meios de cultura contendo glicose, a qual é considerada com fonte de carbono padrão, o glicerol por ter apresentado bons resultados em relação à redução da tensão superficial e por ser de estrutura diferente da glicose, e um meio contendo, além da glicose, um hidrocarboneto (alcano) de cadeia de 14 carbono, cujo composto foi praticamente emulsificado durante o crescimento da linhagem, com a finalidade de se comparar qual dos meios com os diferentes substratos tem uma menor CMC, ou seja, uma produção de biosurfactante que já provoca uma redução máxima de tensão superficial.

Cálculo da CMC utilizando glicerol como fonte carbono

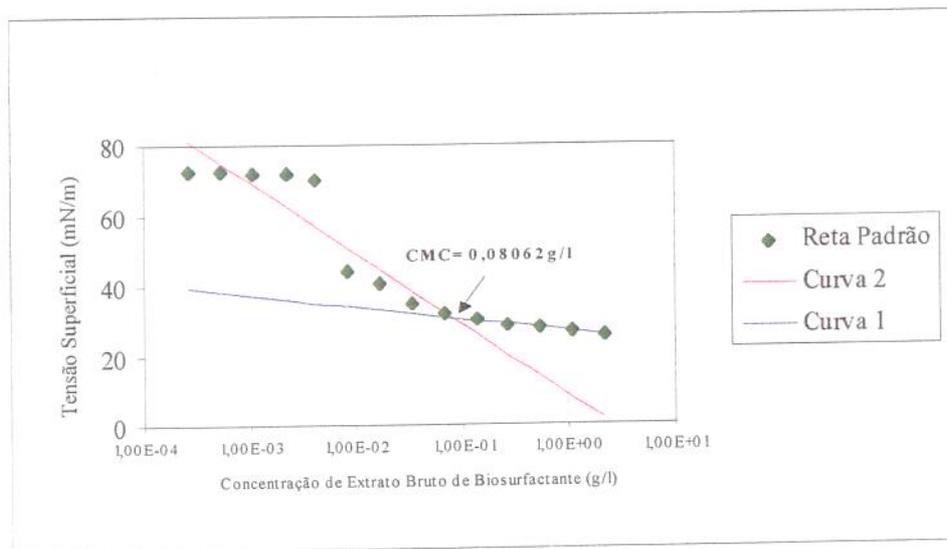


FIG.34 - Obtenção da CMC do Biosurfactante produzido a partir de Glicerol como Fonte de Carbono e Diluições com Água

$$\text{Equação Curva 1 : } -8,8345 \cdot \ln(\text{CMC}) + 8,3173 - R^2 = 0,8358$$

$$\text{Equação Curva 2 : } -1,5177 \cdot \ln(\text{CMC}) + 26,741 - R^2 = 0,9625$$

$$\text{Cálculo da CMC : } -1,5177 \cdot \ln(\text{CMC}) + 26,741 = -8,8345 \cdot \ln(x) + 8,3173$$

$$\ln(\text{CMC}) = -2,5179997$$

$$\text{CMC} = 0,08062 \text{ g/l}$$

Cálculo da CMC utilizando glicose como fonte carbono

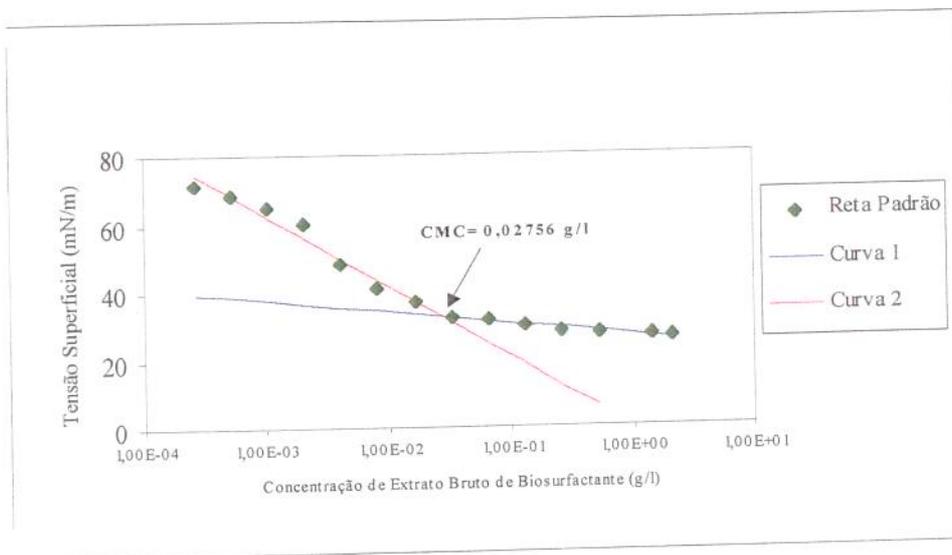


FIG.34- Obtenção da CMC do Biosurfactante Produzido pela LB - 226 a partir de Glicose como Fonte de Carbono e Diluições com Água

$$\text{Equação Curva 1 : } -1,5350 \cdot \ln(\text{CMC}) + 26,957 - R^2 = 0,9683$$

$$\text{Equação Curva 2 : } -9,0344 \cdot \ln(\text{CMC}) + 0,0226 - R^2 = 0,9635$$

$$\text{Cálculo da CMC : } -1,5350 \cdot \ln(\text{CMC}) + 26,957 = -9,0344 \cdot \ln(\text{CMC}) + 0,0226$$

$$\ln(\text{CMC}) = -3,5915407$$

$$\text{CMC} = 0,02756 \text{ g/l}$$

Cálculo da CMC utilizando como fontes de carbono glicose e tetradecano como indutor para produção de biosurfactante

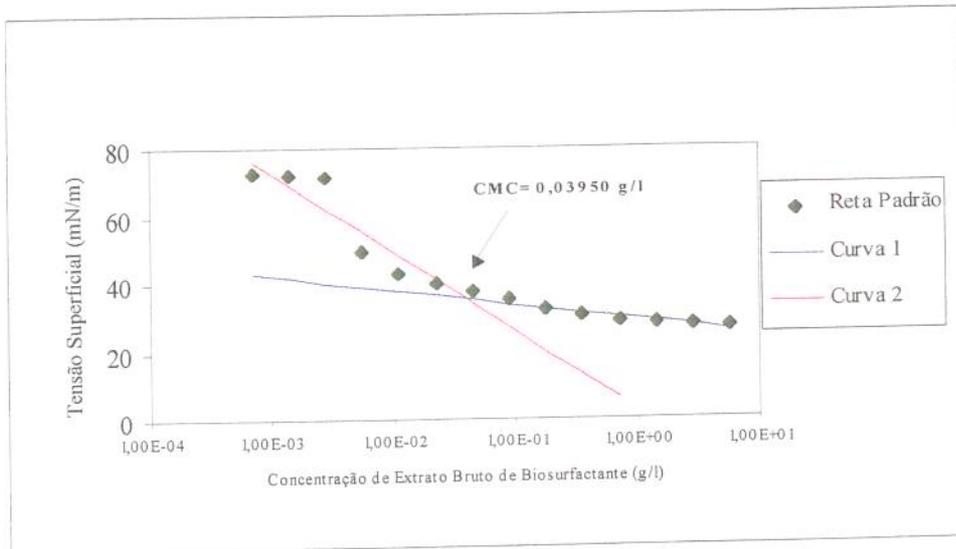


FIG.35 - Obtenção da CMC do Biosurfactante Produzido pela 226 a partir de Glicose com Tetradecano como Fonte de Carbono e Diluições com Água

Equação Curva 1 : $-1,8941 \cdot \ln(\text{CMC}) + 29,137$ - $R^2 = 0,8982$

Equação Curva 2 : $-10,195 \cdot \ln(\text{CMC}) + 0,23123$ - $R^2 = 0,8844$

Cálculo da CMC : $-1,8941 \cdot \ln(\text{CMC}) + 29,137 = -10,195 \cdot \ln(\text{CMC}) + 0,23123$

$$\ln(\text{CMC}) = -3,2315412$$

$\text{CMC} = 0,03950 \text{ g/l}$

Como podemos observar nas Figuras 33, 34 e 35, os valores de concentração micelar crítica obtidos para os três meios de cultura constituídos de glicose, glicerol e glicose com tetradecano foram 0,02756g/l, 0,1075g/l e 0,03950g/l respectivamente, onde menores valores de CMC, indicam que uma menor quantidade de biosurfactante já provoca uma redução máxima de tensão superficial. O menor valor encontrado entre as três fontes de carbono testadas foi para a glicose.

Jenneman et alli (1982) obteve valores de CMC com surfactina produzida por *Bacillus subtilis* entre 1250mg/l a 1500mg/l em meio contendo 1% de sacarose como fonte de carbono. Duvinjak et alli (1982) encontraram uma CMC igual a 0,0139g/l quando se utilizou um meio de contendo 3% de tetradecano para a produção de biosurfactante por *Arthrobacter paraffineus* e uma CMC de 0,00676g/l quando se utilizou 4% de glicose como fonte de carbono, cujos resultados foram compatíveis com os obtidos pela linhagem 226, já que para a glicose como fonte de carbono também se encontrou uma CMC menor do que quando se utilizou tetradecano.

4.8. Identificação do gênero da Linhagem 226

4.8.1 Características Morfológicas

4.8.1.1 Crescimento em meio líquido

Após ter sido encubada em meio GYP caldo, a linhagem LB - 226 apresentou as seguintes características:

Características da película formada:

- brilho: opaco
- superfície: lisa
- extensão da película: em forma de anel na superfície do meio
- tempo de formação: a formação de uma película bem fina se iniciou com uma semana, se tornando bastante espessa com 30 dias.

Características do anel formado:

- extensão: apenas sobre a superfície do meio, incompleto e fino no início e grosso após 30 dias.
- tempo de formação: 7 dias

Características do sedimento formado:

- escasso
- compacto
- mucóide

4.8.1.2. Crescimento em meio sólido

- coloração:**branca
- configuração ou forma:**irregular e expansiva
- margem:**irregular
- elevação:**mamilonada
- superfície:**lisa
- brilho:**opaca
- textura:**cremosa

4.8.1.3. Formação de pseudomicélio e micélio verdadeiro

Não observou-se a clara formação de pseudomicélio ou micélio verdadeiro após três dias de incubação, no entanto, isto não significa que realmente não ocorra a formação de tais estruturas em períodos mais longos.

4.8.1.4. Características sexuais, formação de ascos e ascósporos

Coloração de Vartz: a lâmina se cora de verde se houver formação esporos e de vermelho se não houver

- **ME ágar (-)**
- **Acetato ágar (-)**
- **Gorodkova ágar (-)**
- **YM ágar (-)**

Após uma semana de incubação a 30°C, foram feitas lâminas das culturas repicadas acima, as quais foram coradas conforme a metodologia descrita em item .

Porém, as lâminas preparadas não se coraram de verde malaquita, corante específico para a coloração de esporos, assumindo apenas coloração vermelha resultante da coloração pela safranina, o que indica que em uma semana não houve formação de esporos .

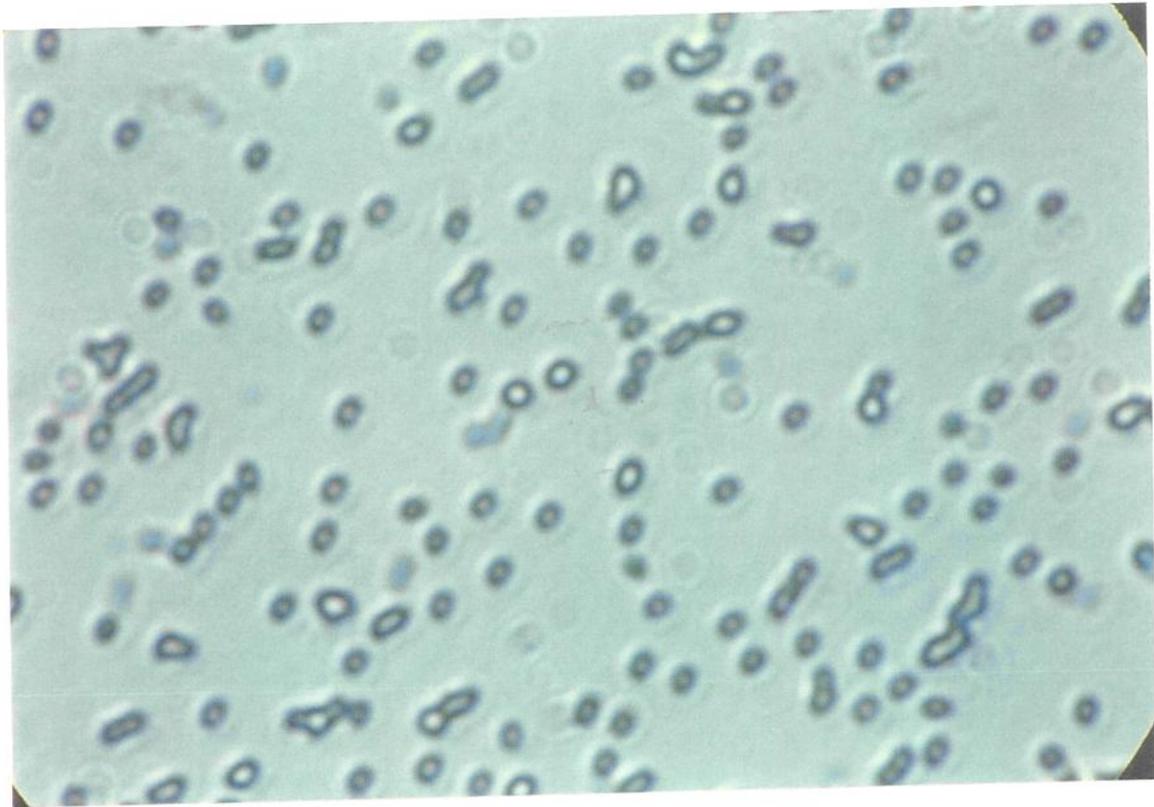


FIG.37- Microfotografia tirada da linhagem 226, em YM, após 48h. de incubação, corada com azul de metileno

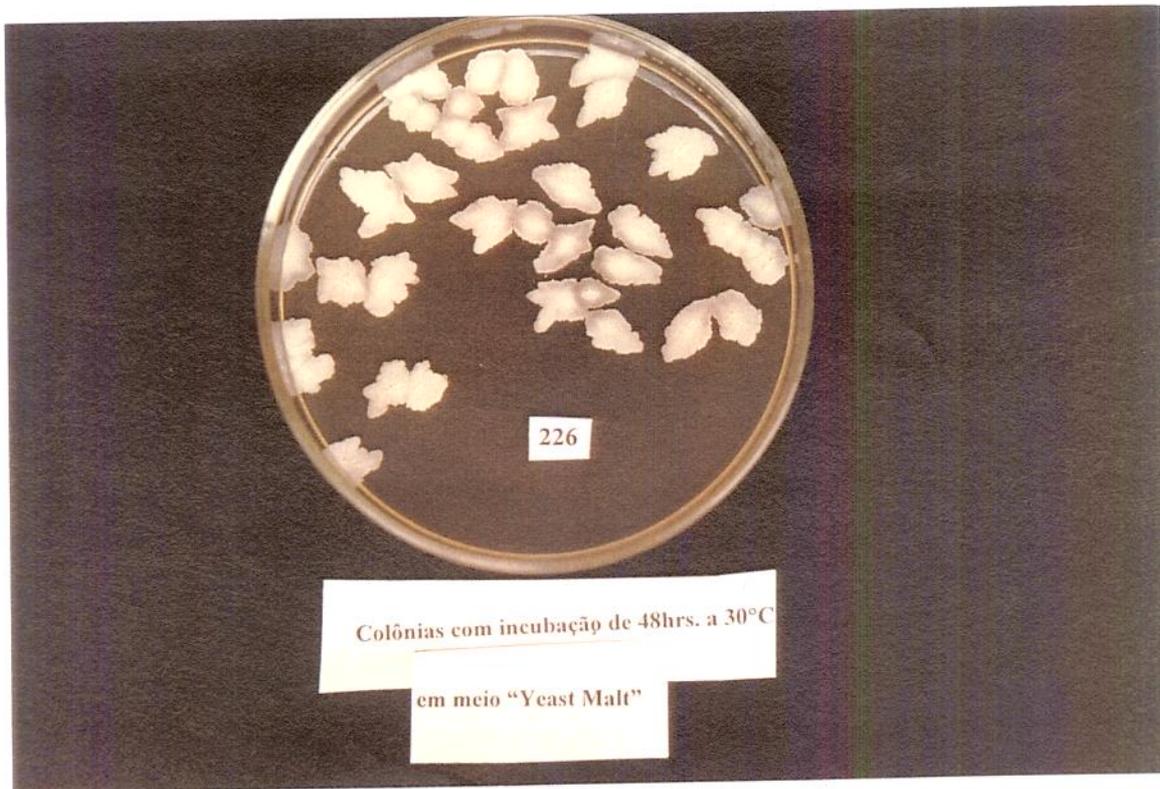


FIG.38- Culturas da Linhagem 226 inoculadas em placas de Petri contendo YM, com 48h. de incubação

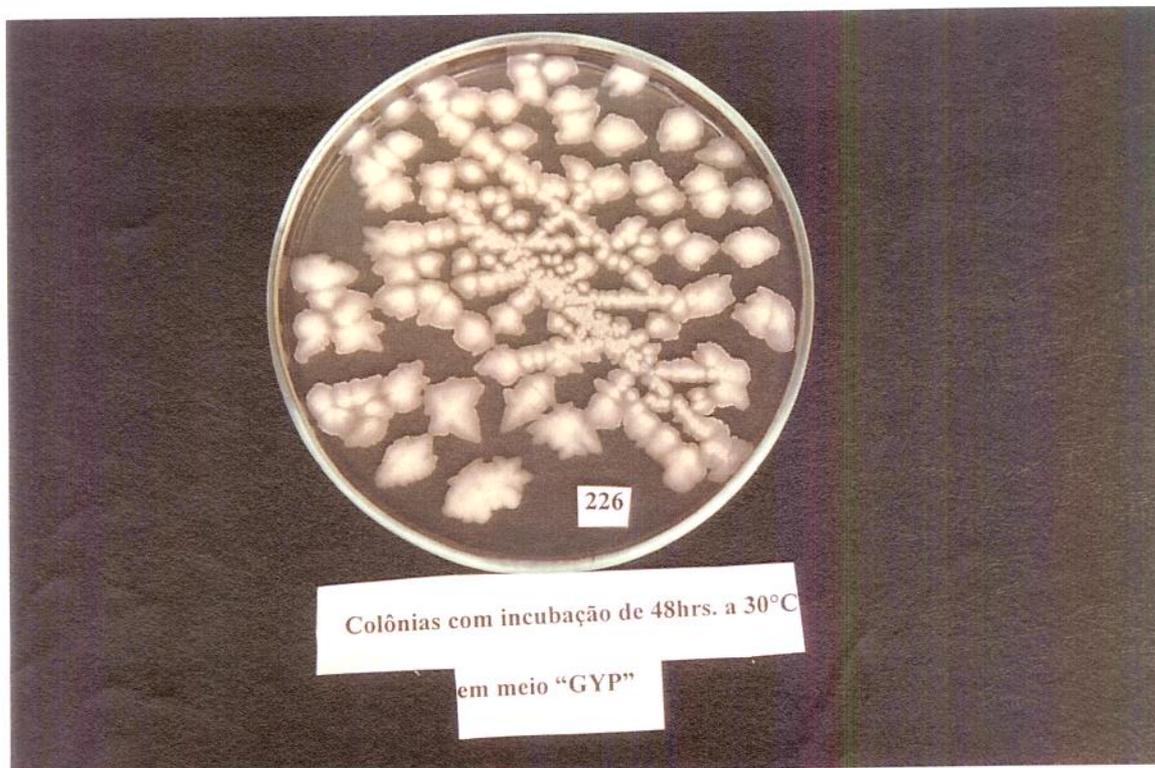


FIG.39- Culturas da Linhagem 226 inoculadas em placas de Petri contendo GYP, com 48h. de incubação

4.8.2 Características Fisiológicas

4.8.2.1. Fermentação de carboidratos:

Foi realizada através do “kit” de identificação API - 20C, onde a mudança de coloração de roxo para amarelo indica teste positivo após 48h.

Tabela VII- Carboidratos fermentados pela linhagem 226 utilizando o kit API 20C

Carboidrato	Resultado
glicose	+
sacarose	+
maltose	-
rafinose	-
galactose	-
lactose	-
trealose	-
melbiose	-

4.8.2.2. Assimilação de Carboidratos

Foram realizados testes de assimilação de carboidratos através dos kits de identificação API 20C AUX e API 50CH, cujos resultados se encontram na tabela VIII:

Tabela VIII: Testes de Assimilação de Carboidratos

Carboidratos	Resultado
glucose	+
sorbose	-
glicerol	+
Melibiose	+
2-Keto-D-gluconato	-
ribose	+
D-arabinose	-
L-arabinose	+
ramnose	-
dulcitol	-
D-xilose	+
adonitol	-
manitol	+
xilitol	-
arbutina	-
galactose	-
inositol	+
salicina	+
sorbitol	+
alfa-metil-D-manasídeo	-
2-Metil D-glucosídeo	-
N-Acetil D-glucosamina	+
celobiose	+
lactose	+
maltose	+
sacarose	+
trehalose	+
melozitose	-
rafinose	+
eritritol	-
amido	-
melobiose	+

4.8.2.3. Teste de Assimilação de nitrato

Conforme metodologia descrita, a presença de nitrito no meio em que a linhagem é inoculada é indicada por uma mudança de coloração do meio, que se torna rosa forte após a adição de 2 gotas do reagente I e 2 gotas do reagente II, conforme descrito anteriormente.

No entanto, a ausência de nitrito na presença de bom crescimento de cultura pode contudo indicar o consumo completo de nitrato. Por isso, testou-se a presença de nitrato adicionando-se pó de zinco nos tubos em que foi adicionado o reagente I e II e esperando-se alguns minutos. Caso o nitrato ainda esteja presente ele será transformado para nitrito, com desenvolvimento da cor característica rosada.

Foram feitos testes de assimilação de nitrato para a linhagem 226 inoculada ao meio de assimilação de nitrato em período de 3, 5, 10 e 15 dias. Todos apresentaram mudança de coloração do meio que passou de amarelo claro para rosa forte, indicando que não houve consumo total de nitrato no meio de cultura em que a linhagem foi inoculada.

4.8.2.4. Teste de Osmotolerância

Algumas espécies de leveduras diferem das demais espécies por serem capazes de crescerem em meios com alta pressão osmótica.

Com a finalidade de observar se a linhagem 226 possui tal habilidade, foram feitos dois testes de osmotolerância. O primeiro teste foi realizado em meio GYP ágar contendo 50% de glicose por um período de 7 dias, e um segundo teste em meio líquido contendo 10% de NaCl e 5% de glicose.

Para o teste realizado com GYP ágar contendo 50% de glicose houve crescimento bastante fraco da linhagem sobre a superfície do meio.

Para o teste realizado com 10% de NaCl e 5% de glicose em meio líquido, não se observou nenhum crescimento, sendo portanto negativo.

4.8.2.5. Teste de Crescimento a 37°C

A temperatura ótima de crescimento para a maioria das leveduras é de 20 a 30°C, embora existam espécies que sejam capazes de crescer em amplas faixas de temperatura, a qual pode variar de 0 a 47°C.

A linhagem 226 apresentou excelente crescimento à temperatura de 37°C em meio “Yeast Malt”, conforme descrito na metodologia, considerando portanto o teste como positivo.

4.8.2.6. Teste de Assimilação de uréia

Certas leveduras tem capacidade de hidrolisar a uréia transformando-a em amônia em altas concentrações, que é observada pela mudança de coloração do meio de amarelo para rosa escuro, devido a adição do reagente fenolftaleína ao meio de cultura como descrito na metodologia.

A linhagem 226 foi inoculada em meio contendo uréia ágar por 7 dias, a 27°C, como descrito em metodologia, não apresentando no entanto ao final do período de incubação, a mudança de coloração para rosa, sendo portanto o resultado do teste negativo.

4.8.2.7. Teste de Atividade de arbutina

Este teste é importante para confirmar a atividade da β -glicosidase das leveduras, as quais hidrolisam a arbutina, resultando numa mudança de coloração que passará de branco para marron escuro devido a sais de Fe^{+3} presentes no meio.

A mudança de coloração do meio indica que houve hidrólise da arbutina, no entanto, após 7 dias de incubação, não observamos mudança na cor do meio a que foi inoculada a linhagem 226, sendo portanto o resultado negativo para tal linhagem.

4.8.2.8. Teste produção de ácido

Certas leveduras produzem ácido a partir de glicose e tal característica pode ser verificada através de meio sólido contendo carbonato de cálcio e glicose. O ácido formado é capaz de dissolver o carbonato de sódio disperso no meio de cultura, possibilitando uma avaliação desta função biológica. A formação de ácido é observada pelo aparecimento de zonas translúcidas no meio, originando zonas claras e translúcidas no meio opaco.

A linhagem 226 foi inoculada em meio CaCO_3 ágar conforme descrito na metodologia, e incubada a 27°C por 7 dias, ao final do qual observou-se o crescimento da cultura. Não observou-se o aparecimento de zonas claras e translúcidas no meio, apesar da linhagem ter tido um bom crescimento, considerando-se portanto o teste como negativo.

5. CONCLUSÃO

Dentre as linhagens testadas, a 226 foi a que apresentou maior redução de tensão superficial do meio de cultura, cuja tensão passou de 45-50mN/m para 25mN/m, sendo esta portanto selecionada como melhor produtora de biosurfactante.

As melhores condições de fermentação, que proporcionaram uma maior produção de biosurfactante pela linhagem selecionada 226, foram: temperatura de 30°C, pH do meio de fermentação igual a 6,5, concentração de NaCl do meio igual a 3%, concentração de glicose ou outra fonte de carbono igual a 3% e tempo de fermentação de 72hrs, com agitação de 150 rpm.

A fonte de carbono que ocasionou um maior crescimento celular foi o melaço. Porém a maltose e o glicerol produziram maiores quantidades de biosurfactante, tais como 2,75g/l e 2,60g/l respectivamente.

A adição de hidrocarbonetos, no caso n - alcanos com cadeia de 10, 14, 16, 18, 20 a 28 carbonos, ao meio de cultura estimulou a produção de biosurfactante por parte da linhagem 226, cujos melhores resultados foram obtidos com os n - alcanos com tamanhos de cadeia de 14 a 18. Os meios de cultura que continham n - alcanos com cadeias de 14 ou 16 foram emulsificados durante a fermentação.

A linhagem apresentou preferência por fontes de nitrogênio compostas, adicionadas na concentração de 0,1%, contendo extrato de levedura, peptona, ou ambas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, o qual apresentou melhores resultados em relação ao NaNO_3 , podendo porém ser adicionado juntamente com o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e extrato de levedura.

Quanto à atividade hemolítica, esta foi positiva para a linhagem 226, a qual formou um halo transparente no meio de cultura ágar-sangue em volta do crescimento da linhagem, o que pode ser utilizado como confirmação da ação surfactante.

O biosurfactante produzido apresentou boa atividade bioemulsificante para meios de cultura contendo diferentes fontes de carbono (glicose, sacarose, maltose, glicerol, n-decano, tetradecano, octadecano, icosano, octadodecano e petróleo). A emulsificação com 2% de óleo de soja mostrou melhores resultados do que quando emulsificamos os diferentes meios de cultura com 2% de tetradecano.

A concentração micelar crítica, calculada por diluição com água destilada, para os meios de cultura contendo glicose, glicerol e glicose com tetradecano como fontes de carbono, apresentaram resultados bastante satisfatórios. O melhor resultado foi obtido com a glicose, seguido do tetradecano e do glicerol. Observamos que em meios de cultura de diferentes composições, apesar da produção de biosurfactante ter sido bastante distinta dependendo da composição do meio, a redução da tensão superficial foi praticamente constante, a qual reduz a tensão superficial do meio sem inóculo de 45-50mN/m para valores em torno de 25-28mN/m . Estes resultados confirmam a teoria de que atingida a CMC , a redução da tensão superficial se torna constante .

Quanto à identificação da linhagem 226, não foi possível identificá-la quanto ao gênero, apesar dos testes morfológicos e fisiológicos realizados, devendo ser repetidos futuramente.

6. BIBLIOGRAFIA

- ARAÚJO, Júlio M. A. Emulsificantes. **Química de Alimentos - teoria e prática**. 1ed. Viçosa : Imprensa - UFV, p.97-115, 1995.
- ASHTAPUTRE, A.A.; SHAH, A.K. Emulsifying property of a viscous exopolysaccharide from *Sphingomonas paucimobilis*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, vol.11, p.219 - 222, 1995.
- ASMER, H.J. ; WAGNER, F. e WRAY, V. Microbial Production, Structure Elucidation and Bioconversion fo Sophorose Lipids. **J. AM. Oil Chem. Society**, 65(9), p.1460 - 1466, 1988.
- BANAT, I.M. Characterization of Biosurfactants and their Use in Pollution Removal - State of the Art (Review). **Acta Biotechnology**, vol.15(3), p.251-267, 1995.
- CARRILLO, P.G. ; Mardaraz, C. ; PITTA - ALVAREZ, S.I. ; GIULIETTI, A.M. Isolation and Selection of Biosurfactant - producing bacteria. **World journal of Microbiology & Biotechnology**, vol.12, p.82-84,1996.
- 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 Cations Additions . **Applied and Environmental Microbiology** , P.408-412, 1981.
- COOPER,D.G. ; ZAJIC, J.E. ; GERSON, D.F. Production of Surface - Active Lipids by *Corynebacterium lepus*. **Applied and Environmental Microbiology**, p.4 - 10, jan. 1979.

- COOPER,D.G. ; PADDOCK,D.A. *Torulopsis petrophilum* and Surface Activity. **Applied and Env. Microbiology**, vol.46(6), p.1426 - 1429, dec.1983.
- COOPER,D.G. ; GOLDENBERG, B.G. Surface - Active Agents from Two Bacillus Species. **Applied and Env. Microbiology**, vol.53(2), p.224-229, 1989.
- COOPER,D.G. ; PADDOCK,D.A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis Bombicola*. **Applied and Env. Microbiology**, vol.47(1), p.173-176, 1984.
- DAVILA, A.M.; MARCHAL,R.; VANDECASTEELE,J.P. Sophorose lipid production from lipidic precursors: predictive evaluation of industrial substrate. **Journal of Industrial Microbiology**, vol.13, p.249 - 257, 1994.
- DESHPANDE, M. ; DANIELS,L. Evaluation of Sophorolipids Biosurfactan Production by *Candida Bombicola* using Animal Fat. **Bioresource Technology**, vol.54, p.143-150, 1996.
- DUVNJAK, Z.; COOPER, D.G.; Production of Surfactant by *Arthrobacter paraffineus* ATCC 19558. **Biotechnology and Bioengineering**, vol.XXI, p.165 - 175, 1982.
- HOMMEL,R. ; STUWER, O ; STUBER, W. ; HAFERBURG D. ; KLEBER, H.P. Production of water soluble surface - active exolipids by *Torulopsis bombicola*. **Applied and Env. Microbiology**, vol.26, p.199-205, 1987.
- HOMMEL,R. Formation and Physiological Role of Biosurfactants Produced by Hydrocarbon - Utilizing Microorganisms. **Biodegradation**, vol.1, p.107-109,1990.

- HOMMEL,R. ; HUSE, K. Regulation of Sophorose lipids Production by *Candida Apicola*. **Biotechnology Letters**, vol.15(8), p.853-858, 1993.
- HOROWITZ, S. ; GILBERT, J.N. ; GRIFFIN, W.M. Isolation and characterization of a surfactant produced by *Bacillus licheniformis* 86. **Journal of Microbiology**, vol.6, p.243 - 248, 1990.
- INOUE,S.; ITO,S. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola* as microbial surfactant in alkane fermentation. **Biotechnology Letters**. vol.4(1),p3-8,1982.
- KOSARIC, Naim; CAIRNS, W.L.; GRAY, Neil C.C. **Biosurfactants and Biotechnology**. New York : Marrel Decker,INC., vol.25, 342p.,1987.
- ITO, S.; INOUE, S. Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: Possible Relation to Alkane Uptake. **Applied and Env. Microbiology**, vol.43(6), p.1278 - 1283, jun.1982.
- JENNY, K.; KAPPELLO,O.; FIECHTER, A. Biosurfactants from *Bacillus licheniformis*: structural analysis and characterization. **Applied. Microbiology Biotechnology**, vol.36, p.5 - 13, 1991.
- JOHNSON,V.; SINGH, M.; SAINI,V.S. Bioemulsifier Production by an Oleaginous Yeast *Rhodotorula glutinis* IIP - 30. **Biotechnology Letters**, vol.14(6), p.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**, vol.54(1) p.31-36, 1990.

- KITAMOTO,D. ; HANEISHI, K. ; NAKAHARA, T. ; TABUCHI, T.
 Production of Manosileritritol Lípides por *Candida antarctica* with
 Vegetable Oils. **Agricultural Biologic Chemistry**, vol.54(1) p.37-40,
 1990.
- KITAMOTO,D. ; YANAGISHITA,H. ; HARAYA,K. ; KITAMOTO, H.K.
 Effect of Cerulenin on the Production of Mannosyl-Erythritol Lipids as
 Biosurfactants by *Candida antarctica*. **Biotechnology Letters**, vol.17(1),
 p.25-30,1995.
- KOSARIC,N.;CAIRNS,W.L.;GRAY,N.C.C.; STECHEY,D. ; WOODD,J.
 The Role of Nitrogen in Multiorganisms Strategies for Biosurfactants
 production. **J. Am. Oil Chem.Society**. vol.61 p.1735 - 1743, 1984.
- KRETSCHMER,A.; BOCK,H.; WAGNER,F. Chemical and Physical
 acaharacterization of Interfacial - Active Lipids from *Rhodococcus*
erythropolis Grown on n - Alkanes. **Applied and Env. Microbiology**,
 vol.44(4), p.864 - 870, Oct. 1982.
- LIN, S.C.; MINTON,A.; SHARMA,M.M.; GEORGIU,G. Structural and
 Immunological Characterization of a Biosurfactant Produced by *Bacillus*
licheniformis JF - 2. **Applied Env. Microbiology**, vol.50(1), p.31-38,
 jan.1994.
- 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**. vol.XIII, p.741-760. 1971.

- MULLIGAN,C. ; COOPER,D.G. Pressate from Peat Dewatering as a Substrate for Bacterial growth. **Applied and Env. Microbiology**, vol.50(1), p.160 - 162, 1985.
- MURIEL, J.M.; BRUQUE, J. M.; OLÍAS, J. M.; SÁNCHEZ, A.J. Production of Biosurfactants by *Cladosporium resinae*. **Biotechnology Letters**, vol.18(3), p.225 - 230, mar. 1996.
- OSMAN,M.;ISHIGAMI,Y.;SOMEYA,J.;JENSEN,H.B. The Bioconversion of Ethanol to Biosurfactants and Dye by a Novel Coproduction Technique. **J.AM.Oil Chem Society**, vol.73(7), p.851 - 856, 1996.
- PALEJWALA,S.; DESAI,J.D. Production of an Extracellular Emulsifier by a gram negative bacterium. **Biotechnology Letters**, vol.11(2), p.115 - 118, jan.1989.
- PAREILLEUX, A . Hydrocarbon Assimilation by *Candida lypolítica*: Formation of a Biosurfactant.; Effects on Respiratory Activity and Growth. **Biotechnology**, vol.8, p. 91 - 101, 1979.
- RAMANA, K.V.; KARANTH, N.G. Production of Biosurfactants by the Resting Cells of *Pseudomonas Aeruginosa* CFTR - 6. **Biotechnology Letters**, vol. 11(6), p.437 - 442, 1989.
- RISTAU, E.; WAGNER, F. Formation of Novel Anionic Trehaloetetraesters from *Rhodococcus erythropolis* under growth limiting conditions. **Biotechnology Letters**, vol.5(2), p.95 - 100, 1983.

- 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**, vol.XXI, p.955 - 974, 1979.
- SANTOS, L.G.; KAPPELI,O.; FIETCHER,A. *Pseudomonas Aeruginosa* Biosurfactant Production in Continuos Culture with Glucose as Carbon Source. **Applied and Env. Microbiology**, vol.48(2), p.301 - 305, aug.1984.
- SINGH,M. ; SAINI, V.S. ; ADKIHARI,D.K. Production of emulsifiers by SCP Producing of *Candida tropicalis* during hidrocarbon fermentation. **Biotechnology Letters**, vol.12(10), p.743 -746, 1990.
- 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**,vol.61(9), p.3240 - 3244, sept.1995.
- ZHOU, Q. ; KOSARIC,N. Utilization of Canola Oil and Lactose to Produce Biosurfactant with *Candida Bombicola*. **J. Am. Oil Chem. Society**, vol.72(1), 1995.
- WATKINSON,R.J.; MORGAN,P. Physiology of aliphatic hydrocarbon. degrading microorganisms. **Biodegradation**, vol.I, p.79 - 92, 1990.
- ZHANG,Y.; MILLER,R.M. Effect of Rhamnolipid (Biosurfactant) Structure on Solubilization and Biodegradation of n- Alkanes. **Applied and Env. Microbiology**, p.2247 - 2251, jun.1995.