

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

CRISTIANO JOSÉ DE ANDRADE

**ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DO GLICEROL ORIUNDO DA CADEIA DO
BIODIESEL POR *BACILLUS SUBTILIS* PARA A PRODUÇÃO DE
BIOSSURFACTANTES, ENZIMAS E AROMAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos para a obtenção do
título de Mestre em Ciências de Alimentos

Orientadora: Gláucia Maria Pastore

Campinas

2011

i

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

An24e Andrade, Cristiano José de
Estudo da utilização do glicerol oriundo da cadeia do biodiesel por
Bacillus subtilis para a produção de biossurfactantes, enzimas e aromas
/ Cristiano José de Andrade. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Biotecnologia. 2. Resíduos agroindustriais. 3. Glicerol. 4.
Biossurfactantes. 5. Surfactina. I. Pastore, Gláucia Maria. II.
Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de
Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Study of the use of glycerol from biodiesel production by
Bacillus subtilis for production of biosurfactants, enzymes
and bioflavours

Palavras-chave em inglês (Keywords): Biotechnology, Agroindustrial wastes, Glycerol,
Biosurfactants, Surfactin

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore
Gabriela Alves Macedo
Diane Téó de Moraes

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida por Cristiano José de Andrade aprovado pela comissão julgadora em 29/07/2011.

Comissão julgadora:

Profa. Dra. Glaucia Maria Pastore (DCA/FEA/UNICAMP) - Orientadora

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo (DCA/FEA/UNICAMP) - Membro

Profa. Dra. Diane Téo de Moraes (DCA/FEA/UNICAMP) - Membro

Prof. Dr. José Guilherme Lembi Ferreira Alves (DCA/UFLA) - Suplente

Prof. Dr. Mário Roberto Maróstica Junior. (DEPAN/FEA/UNICAMP) - Suplente

AGRADECIMENTOS

A todos os contemporâneos e suas respectivas colaborações.

Absolon, Ana Luiza, Beatriz, Bia, Bianca, Daniele Carvalho, Diego, Dora, Elizabete, Emerson, Érica, Fabiano, Felipe, Gabriela, Gustavo Molina, Grethel, João Paulo Fernandes, Joyce, José Valdo, Juliana Bueno, Leandro, Luciana Malta, Marcio Barros, Marcelo, Mariana, Marlene, Nadir, Patricia Sampaio, Priscila, Profa. Gabriela, Profa. Hélia, Profa. Lúcia Durrant, Profa. Maria Isabel, Prof. Cesar Santana, Prof. Roy Bruns, Reginaldo, Rafaela Perna, Renata, Rosângela, Stanislau, Viviane.

A profa. Glaucia, pela confiança e desenvolvimento do projeto.

Aos sempre solícitos Paula Speranza, Fabiano Jares e demais pesquisadores do laboratório de bioquímica FEA/Unicamp.

Faço especial agradecimento, aos integrantes da linha de pesquisa de biossurfactantes do laboratório de bioaromas FEA/Unicamp, Ana Paula Simiqueli e Francisco Fabio Calvalcante Barros, com que tive o privilégio de trabalhar.

As empresas, que cederam os materiais utilizados no projeto.

A minha família, pelo apoio incondicional: José e Maria (pais), Elidia (avó) e Lidiane (irmã), esta com enorme participação nos momentos decisivos.

*A Estrada se deita debaixo dos pés para servir.
A gota de orvalho se desfaz na terra para servir.
O grão de areia que ninguém vê enterrando no alicerce, sustenta
nos ombros o arranha céu para servir.
No entanto, a pedra mais alta, soberba, no cimo da torre é,
aquela que menos nos serve, que menos peso carrega” .*

Adaptado **Padre Tarcísio Marchiori** (1963)

*“A sabedoria não nos é dada. É preciso descobri-la por nós
mesmos, depois de uma viagem que ninguém nos pode poupar ou fazer
por nós”.*

Marcel Proust (1871-1922)

*“Duvidar de tudo ou crer em tudo, são duas soluções igualmente
cômodas, que nos dispensam, ambas de refletir”.*

Henri Poincaré (1854-1912)

*“É certo que tempos difíceis existem para aperfeiçoar o
aprendiz”*

Elisa Lucinda

RESUMO

Atualmente há uma expectativa mundial para a continuidade do aumento da produção de biodiesel. O glicerol é um coproduto que corresponde aproximadamente a 10 % da reação de manufatura do biodiesel e contém em sua fase outros compostos tais como água, álcool, sabão e catalisador produzidos e/ou adicionados durante a produção. O uso de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos é vantajoso, devido à amortização dos custos e convergência em processos ambientalmente corretos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar as possibilidades de consumo de alguns resíduos agroindustriais e glicerol oriundo da produção de biodiesel por bactérias do gênero *Bacillus*, para a produção concomitante, de biossurfactantes e compostos de aromas. Biossurfactantes tem despertado interesse de pesquisadores devido à sua versatilidade em aplicações como agente emulsificante, surfactante, antimicrobiano e atividades funcional e biorremediativa. Um dos principais gêneros de micro-organismos produtores de biossurfactantes é o *Bacillus*, com destaque na produção industrial de proteases e, de maneira incipiente, de alguns compostos de aromas. Os bioaromas acetoína, diacetil, 2,3 butanediol, ácido acético e ácido propiônico são os principais nomes descritos na literatura ligados a cadeia leiteira, e sendo o glicerol um açúcar fermentecível, é possível que alguns micro-organismos produzam compostos de interesse industrial. Para os ensaios em fermentador de bancada, a análise dos resultados de consumo do glicerol que foi realizada por uma adaptação da técnica de indentificação da porcentagem de glicerol no biodiesel e indicou que a linhagem LB2b de *Bacillus subtilis* possivelmente não possui a enzima glicerol kinase, pois, a linearidade das curvas de absorção de glicerol não é condizente com a equação de *Michaelis-Menten* e a curva oxigênio dissolvido no meio. Portanto, provavelmente o glicerol não é utilizado como fonte de carbono. Entretanto, o meio de cultura composto por glicerol padrão analítico e peptona resultou na produção de 0,30 g de biossurfactante semipurificado/litro de meio de cultura. Além disso, foram identificadas as produções dos compostos de aroma 2,3 butanodiol e diacetil durante o processo fermentativo, usando como parâmetros os respectivos padrões em solução aquosa, banco de dados espectrais e cinética de produção.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, biossurfactantes, enzimas, aromas e glicerol

ABSTRACT

There is in the present, a worldwide expectation for continuity of increase of glycerol production. Glycerol is a by-product which corresponds to approximately 10 % volume of biodiesel reaction and contains in its phase other materials such as water, alcohol, soap and catalyst manufactured and/or added during the process. The use of waste of agroindustrial in the biotechnology process is advantageous because it reduces costs of production. Therefore, the aims of this research were to estimate the possibilities of consumption of some agroindustrial wastes and glycerol from biodiesel production per bacterias of *Bacillus* genus, to simultaneously production of biosurfactants and flavours compounds. Biosurfactants have awakened interest given its versatility as emulsifying agents, surfactants, antimicrobial and functional activities, and bioremediation. One of main genus of microorganisms, producers of biosurfactants is the *Bacillus*, which has an important role in the industrial production of proteases and in the incipient way some flavours compounds. The bioflavours acetoin, diacetyl, 2,3 butanediol acetic acid and propionic acid are the most relevant compounds described in the literature linked to the manufacture of dairy products, and being the glycerol a sugar which can be used as a carbon source by microorganisms, is possible the production of compounds of interest by fermentation processes. For the assays in bench fermentator, the analyze of results, which was made by the technique adaptation of identification of percentage of glycerol in the biodiesel, and indicates the LB2b strain of *Bacillus subtilis*, possibly, does not have the glycerol-kinase enzyme, due to the linearity of absorption glycerol curves, which is not consistent with Michaelis-Menten equation and curves of dissolved oxygen in the culture medium. Therefore, probably, the glycerol is not used as a carbon source. However, the culture medium composed by analytical standard glycerol and peptone has resulted in 0.3 grams of semipurified biosurfactant/liters of culture medium. Besides, were identified the production of flavours, 2,3-butanediol and diacetyl during the fermentative process, using as parameters the respective standards in water solution, spectral bank data and kinetic of production.

Key-words: *Bacillus subtilis*, biosurfactants, enzymes, flavours and glycerol.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

- ✓ Estudo da utilização dos resíduos agroindustriais malte de cevada, manipueira e glicerol (oriundo da produção de biodiesel) como substratos na produção de biomoléculas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Selecionar uma linhagem de *Bacillus subtilis* com potencial de metabolizar o glicerol oriundo da produção de biodiesel;
- ✓ Estudo do processo fermentativo e identificação do consumo do glicerol na produção de biossurfactantes;
- ✓ Identificação da coprodução de enzimas e aromas no processo fermentativo de produção de biossurfactantes.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Introdução - Biotecnologia agroindustrial – tendências e possibilidades | 20 |
| Figura 1 - Proposta de fluxograma com processo integrado na produção de biodiesel e bioprodutos. | 24 |
| Figura 2 - Possíveis vias metabólicas de assimilação de glicerol por micro-organismos e seus possíveis produtos como: ácidos orgânicos e compostos aromáticos | 25 |
| | |
| Capítulo 1 - Revisão bibliográfica: biossurfactantes, enzimas e aromas produzidos por <i>Bacillus subtilis</i> em resíduos agroindustriais como substrato | 27 |
| Figura 1 - Estrutura bidimensional da principal isoforma da surfactina..... | 31 |
| Figura 2 - Estrutura da surfactina | 33 |
| Figura 3 - Estrutura da Iturina. | 33 |
| Figura 4 - Estrutura química dos principais compostos aromáticos na indústria láctea | 40 |
| Figura 5 - Evolução mundial da produção de biodiesel. | 43 |
| Figura 6 - Média de geração de resíduos em uma cervejaria de 10^6 h.L cerveja/ano . | 47 |
| | |
| Capítulo 2 - Seleção da linhagem de <i>Bacillus subtilis</i> , estudos de meios de cultura e produção de biossurfactante com uso do glicerol..... | 59 |
| Figura 1 - Tensão superficial da linhagem selecionada (LB2b) para os ensaios com o meio mineral pós otimização | 71 |
| Figura 2 - Placa de ágar sangue inoculado com a linhagem LB2b | 71 |
| Figura 3 -Cinéticas das tensões superficiais das espumas, obtidas, a partir de meios de cultura complexos em 24, 48 e 72 horas | 77 |
| Figura 4 - Cinéticas das tensões superficiais e respectivas diluições (CMD^{-1} e CMD^{-2}) para a confirmação do melhor meio de cultura para a produção de biossurfactantes .. | 79 |

| | |
|---|-----|
| Capítulo 3 - Produção de biossurfactantes em fermentador de bancada e análise do consumo de glicerol por <i>Bacillus subtilis</i> | 85 |
| Figura 1 - Curva cinética do oxigênio dissolvido no meio para os ensaios realizados com glicerol padrão .analítico | 97 |
| Figura 2 - Curva cinética do oxigênio dissolvido no meio para os ensaios realizados com glicerol parcialmente purificado, oriundo da produção do biodiesel | 98 |
| Figura 3 - Curvas das fermentações (oxigênio dissolvido e células viáveis)..... | 99 |
| Figura 4 - Cinética das medias do consumo de glicerol no meio de cultura..... | 100 |
| Figura 5 - Tensões superficiais (TS, CMD^{-1} e CMD^{-2}) do meio de cultura..... | 105 |
| Figura 6 - Tensões superficiais e suas respectivas diluições para soluções (1 mg.mL ⁻¹) preparadas com biossurfactante bruto e semipurificado | 106 |
| Figura 7 - Determinação da (CMC) das frações dos biossurfactante semipurificado das fermentações com glicerol p.a e oriundo da cadeia do biodiesel, através da medida da tensão superficial (mN/m) de diluições sucessivas. | 107 |
| | |
| Capítulo 4 - Produção de diacetil e 2,3 butanodiol, integrada ao processo fermentativo na produção de biossurfactantes por <i>Bacillus subtilis</i> | 113 |
| Figura 1 - Sistema de coleta de voláteis para os ensaios erlenmeyers..... | 119 |
| Figura 2 - Sistema de coleta de voláteis, acoplado ao fermentador..... | 119 |
| Figura 3 - Placas de ágar leite (esquerda) e ágar rodamina (direita), inoculadas com a linhagem LB2b. | 122 |
| Figura 4 - Cromatograma para a identificação do tempo de retenção da acetoína.... | 123 |
| Figura 5 - Curva analítica diacetil e 2,3 butanediol..... | 124 |
| Figura 6 - Cinética fermentativa da produção do diacetil .. | 125 |
| Figura 7 - Cinética fermentativa da produção do 2,3 butanediol | 126 |
| Figura 8 - Cromatograma da etapa inicial da fermentação com glicerol padrão analítico adicionado ao meio de cultura..... | 127 |

| | |
|--|-----|
| Figura 9 - Cromatograma da fermentação com glicerol padrão analítico adicionado ao meio de cultura | 128 |
| Figura 10 Cromatograma com diferentes concentrações de diacetil | 129 |
| Figura 11 - Cromatograma (CG-EM) dos compostos voláteis inerentes ao meio de cultura contendo glicerol padrão analítico.. | 131 |
| Figura 12 - Cromatograma (CG-EM) dos compostos volatéis inerentes ao meio de cultura contendo glicerol purificado oriundo da produção de biodiesel. | 132 |
| Figura 13 - Cromatograma (CG-EM) solução aquosa 2,3 butanodiol 10 mg/L | 133 |
| Figura 14 - Cromatograma (CG-EM) dos compostos voláteis produzidos com o glicerol padrão analítico adicionado ao meio de cultura com o uso do fermentador de bancada..... | 134 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Capítulo 1 - Revisão bibliográfica: biossurfactantes, enzimas e aromas produzidos por <i>Bacillus subtilis</i> em resíduos agroindustriais como substrato | 27 |
| Tabela 1 - Composição do óleo soja e glicerol bruto oriundo do biodiesel produzido com soja..... | 29 |
| Tabela 2 - Cronologia entre o número de patentes relacionadas a enzimas | 36 |
| Tabela 3 - Exemplos de enzimas comerciais obtidas a partir de <i>Bacillus subtilis</i> | 37 |
| Tabela 4 - Gêneros de micro-organismos e seus respectivos aromas produzidos | 38 |
| Tabela 5 - Vantagens e desvantagens do uso do metanol e etanol para a produção de biodiesel. | 44 |
| Tabela 6 - Composição centesimal da manipueira | 48 |
| | |
| Capítulo 2 - Seleção da linhagem de <i>Bacillus subtilis</i> , estudos de meios de cultura e produção de biossurfactante com uso do glicerol..... | 59 |
| Tabela 1 - Meio sintético padrão: Fonte de interesse e concentração..... | 61 |
| Tabela 2 - Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado 2^{8-4} | 62 |
| Tabela 3 - Valores utilizados no delineamento experimental <i>Plackett & Burman</i> 16 ensaios com 4 repetições no ponto central | 63 |
| Tabela 4 - Substratos utilizados e suas respectivas concentrações no meio de cultura para a produção de biossurfactantes. | 64 |
| Tabela 5 - Concentração dos sais do meio mineral, após otimização..... | 64 |
| Tabela 6 - Médias das tensões superficiais em (mN/m) para a escolha da linhagem | 68 |
| Tabela 7 - Análise de variância para as tensões superficiais das linhagem de <i>Bacillus</i> em 24 horas para os ensaios com glicerol..... | 69 |
| Tabela 8 - Diferenças entre as tensões superficiais das linhagem para os ensaios realizados com glicerol em 24 horas..... | 70 |

| | |
|--|-----|
| Tabela 9 - Planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} concentrações e respostas | 72 |
| Tabela 10 - Resultados da análise estatística do planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} . | 73 |
| Tabela 11 - Valores utilizados no delineamento experimental <i>Plackett & Burman</i> 16 ensaios e 4 repetições repetições no ponto central | 74 |
| Tabela 12 - Resultados da análise estatística do delineamento experimental Plackett & Burman. | 75 |
| | |
| Capítulo 3 - Produção de biossurfactantes em fermentador de bancada e análise do consumo de glicerol por <i>Bacillus subtilis</i> | 85 |
| Tabela 1 - Composição do meio de cultura com glicerol resíduo | 95 |
| Tabela 2 - Células totais, viáveis e biomassa | 101 |
| Tabela 3 - Volumes das espumas produzidos..... | 102 |
| Tabela 4 - ANOVA para tensão superficial das espumas liquefeitas | 103 |
| Tabela 5 - Tensão superficial das espumas liquefeitas. | 103 |
| Tabela 6 - ANOVA para tensão superficial das espumas liquefeitas | 103 |
| | |
| Capítulo 4 - Produção de diacetil e 2,3 butanodiol, integrada ao processo fermentativo na produção de biossurfactantes por <i>Bacillus subtilis</i> | 113 |
| Tabela 1 - Composição do meio para a indentificação de lipase | 116 |
| Tabela 2 - Composição do meio para a indentificação de proteases | 116 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | vii |
| ABSTRACT | ix |
| OBJETIVOS | x |
| | |
| Introdução - Biotecnologia agroindustrial – tendências e possibilidades | 20 |
| | |
| 1 BIOPRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES, ENZIMAS E AROMAS, ASSOCIADA À UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS | 21 |
| 1.1 BIOPRODUÇÃO INTEGRADA A CADEIA DO BIODIESEL | 22 |
| | |
| OBRAS CONSULTADAS | 26 |
| | |
| Capítulo 1 - Revisão bibliográfica: biossurfactantes, enzimas e aromas produzidos por <i>Bacillus subtilis</i> em resíduos agroindustriais como substrato | 27 |
| | |
| 1 POSSIBILIDADES DE PRODUÇÃO COM O GÊNERO BACILLUS..... | 28 |
| | |
| 2 METABOLISMO DO GLICEROL..... | 28 |
| | |
| 3. BIOSURFACTANTES | 30 |
| 3.1 SUMÁRIO HISTÓRICO | 30 |
| 3.2 TENSOATIVIDADE E ESTRUTURA QUÍMICA | 30 |
| 3.2.1 Surfactina | 31 |
| 3.2.2 Iturina | 32 |
| 3.2.3 Sinergismo | 32 |
| | |
| 4 METABOLISMO DE PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES..... | 33 |
| | |
| 5 ENZIMAS | 35 |
| | |
| 6 AROMAS | 37 |
| 6.1 SUMÁRIO HISTÓRICO | 37 |
| 6.2 DEFINIÇÕES E POSSIBILIDADES | 39 |
| 6.3 AROMAS DA INDÚSTRIA LÁCTEA..... | 40 |
| 6.4 ACETOÍNA, DIACETIL E 2,3 BUTANODIOL..... | 41 |

7 USO DO GLICEROL ORIUNDO DA PRODUÇÃO DE BODIESEL, MALTE DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA E MANIPUEIRA NOS PROCESSOS SUPRACITADOS..... 42

| | |
|---|----|
| 7.1 BODIESEL, RESÍDUOS E CO PRODUTOS | 42 |
| 7.1.1 Sumário histórico do biodiesel | 42 |
| 7.1.2 Produção, atualidade, propeção e impactos econômicos..... | 42 |
| 7.1.3 Glicerol | 45 |
| 7.1.3.1 Tratamento do glicerol para utilização biotecnológica | 46 |
| 7.2 MALTE DE CEVADA | 46 |
| 7.3 MANIPUEIRA | 47 |
| CONCLUSÃO..... | 49 |
| OBRAS CONSULTADAS | 50 |

Capítulo 2- Seleção da linhagem de *Bacillus subtilis*, estudos de meios de cultura e produção de biossurfactante com uso do glicerol..... 59

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO..... | 60 |
| 1 MATERIAIS E MÉTODOS | 61 |
| 1.1 MEIOS DE CULTURA | 61 |
| 1.1.1 Composição do meio sintético | 61 |
| 1.1.2 Otimização do meio mineral para fermentação em <i>shaker</i> | 62 |
| 1.1.3 Utilização de resíduos agroindustriais..... | 63 |
| 1.2 CULTURAS UTILIZADAS | 65 |
| 1.2.1 Seleção da linhagem | 65 |
| 1.3 PRESERVAÇÃO DA LINHAGEM E PREPARO DO INÓCULO | 65 |
| 1.4 INCUBAÇÃO..... | 66 |
| 1.5 CURVA FERMENTATIVA E SELEÇÃO DA LINHAGEM..... | 66 |
| 1.5.1 Medidas de tensão | 66 |
| 1.6 INDICADOR DA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES | 66 |
| 1.6.1 Ensaio com ágar sangue e medidas de tensão | 66 |
| 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 67 |
| 2.1 Seleção da linhagem..... | 67 |
| 2.1.1 Hemólise | 71 |
| 2.1.2 Otimização do meio mineral para produção de biossurfactantes..... | 72 |
| 2.1.3 Utilização de meios complexos | 75 |

| | |
|----------------|----|
| CONCLUSÃO..... | 81 |
|----------------|----|

| | |
|-------------------------|----|
| OBRAS CONSULTADAS | 82 |
|-------------------------|----|

| | |
|--|----|
| Capítulo 3 - Produção de biossurfactantes em fermentador de bancada e análise do consumo de glicerol por <i>Bacillus subtilis</i> | 85 |
|--|----|

| | |
|-------------------------|----|
| INTRODUÇÃO | 86 |
|-------------------------|----|

| | |
|----------------------------|----|
| 1 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 87 |
|----------------------------|----|

| | |
|---|----|
| 1.1 Fermentação da linhagem selecionada em fermentador de bancada | 87 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| 1.1.1 Preservação da linhagem e preparo do inóculo | 87 |
|---|----|

| | |
|------------------------------------|----|
| 1.1.2 Meio de cultura | 88 |
|------------------------------------|----|

| | |
|--|----|
| 1.1.3 Purificação do glicerol | 88 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| 1.1.4 Consumo do glicerol durante a fermentação | 88 |
|--|----|

| | |
|-------------------------|----|
| 1.2 PROCEDIMENTOS | 89 |
|-------------------------|----|

| | |
|--|----|
| 1.3 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR..... | 92 |
|--|----|

| | |
|-----------------------------------|----|
| 1.3.1 Células totais | 92 |
|-----------------------------------|----|

| | |
|------------------------------------|----|
| 1.3.2 Células viáveis | 93 |
|------------------------------------|----|

| | |
|---|----|
| 1.3.3 Oxigênio dissolvido no meio de cultura | 93 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| 1.4 PURIFICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE | 94 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| 1.5 MEDIDAS DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE | 94 |
|--|----|

| | |
|-------------------------------|----|
| 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 95 |
|-------------------------------|----|

| | |
|-----------------------------------|----|
| 2.1 PURIFICAÇÃO DO GLICEROL | 95 |
|-----------------------------------|----|

| | |
|--|----|
| 2.2 COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA..... | 95 |
|--|----|

| | |
|--------------------------------------|----|
| 2.3 CINÉTICAS DAS FERMENTAÇÕES | 96 |
|--------------------------------------|----|

| | |
|--|-----|
| 2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA | 107 |
|--|-----|

| | |
|----------------|-----|
| CONCLUSÃO..... | 109 |
|----------------|-----|

| | |
|--------------------------------|------------|
| OBRAS CONSULTADAS | 110 |
|--------------------------------|------------|

| | |
|--|-----|
| Capítulo 4 - Produção de diacetil e 2,3 butanodiol, integrada ao processo fermentativo na produção de biossurfactantes por <i>Bacillus subtilis</i> | 113 |
|--|-----|

| | |
|-------------------------|-----|
| INTRODUÇÃO | 114 |
|-------------------------|-----|

| | |
|----------------------------|-----|
| 1 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 115 |
|----------------------------|-----|

| | |
|-------------------|-----|
| 1.1 Enzimas | 115 |
|-------------------|-----|

| | |
|---|-----|
| 1.1.1 Preservação da linhagem e preparo do inóculo | 115 |
|---|-----|

| | |
|--|------------|
| 1.2 IDENTIFICAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO DE ENZIMAS | 115 |
| 1.3 AROMAS | 117 |
| 1.3.1 Meio de cultura | 117 |
| 1.3.2 Preparo do inóculo | 118 |
| 1.3.3 Condições das fermentações | 118 |
| 1.3.4 Métodos de extração dos compostos voláteis | 118 |
| 1.3.5 Condições das corridas | 120 |
| 1.4 CURVAS ANALÍTICAS E CINÉTICAS DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS | 121 |
| | |
| 2 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 122 |
| 2.1 ENZIMAS | 122 |
| 2.2 AROMAS | 123 |
| | |
| CONCLUSÃO..... | 135 |
| | |
| OBRAS CONSULTADAS | 136 |
| | |
| SUGESTÕES | 139 |
| | |
| CONCLUSÃO GERAL | 140 |

INTRODUÇÃO:

BIOTECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL – TENDÊNCIAS E POSSIBILIDADES

1 BIOPRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES, ENZIMAS E AROMAS, ASSOCIADA À UTILIZAÇÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Entre as diversas definições de biotecnologia, a maioria engloba conceitos voltados à aplicação em processos biológicos, com o objetivo de criar possibilidades (novos produtos e processos) e resolver problemas ambientais, como a utilização de resíduos industriais. Esta embasada na agricultura, medicina e ciências de alimentos, esta última com infindáveis possibilidades como: novas linhagens, coprodução, engenharia metabólica, atividades fisiológicas e antimicrobiana de bioprodutos, suplementação de resíduos agroindustriais, etc.

Em geral, os processos da indústria alimentícia geram resíduos ricos nutricionalmente como, por exemplo, bagaço de cana de açúcar, água de maceração de milho, manipueira, palha de trigo, cevada, farelos (arroz, soja, trigo, etc.) entre outros, que são geralmente, despejados em cursos de água, queimados, vendidos como suplemento nutricional para ração animal ou tratados e descartados adequadamente ou não.

Entretanto, se os resíduos forem utilizados em sistemas biotecnológicos de maneira adequada, a indústria ingressaria em um novo mercado, podendo o novo processo tornar-se mais vantajoso do que a produção inicial. A manipueira, por exemplo, apresenta em sua composição açúcares complexos, mono e dissacarídeos e diversos minerais (NITSCHKE & PASTORE, 2003) que suprem as necessidades metabólicas de diversos micro-organismos, assim a integração de um bioprocessos à farinheira evita despesas de tratamento com a manipueira, não implica em gastos adicionais com transporte e gera bioprodutos de alto valor agregado. O malte residual da indústria cervejeira por sua vez, apresenta em média 10 % de proteína, 13 % de fibras e 60 % de carboidratos (FUJITA & FIGUEROA, 2003) sendo assim outro resíduo potencialmente utilizável como substrato microbiano.

Biossurfactantes, aromas e enzimas são exemplos destes biocompostos e apresentam alto valor agregado, devido sua especificidade e aplicabilidade industrial.

Bacillus subtilis é uma espécie de micro-organismo utilizada na produção de enzimas e linhas de pesquisas vem sendo desenvolvidas com o objetivo de viabilizar a produção de biossurfactantes em escala industrial.

Portanto, dependendo do requerimento nutricional do micro-organismo, os resíduos podem ser utilizados de maneira complementar, como, por exemplo, a manipueira (carboidratos e minerais) e o malte residual da indústria cervejeira (fibras e proteínas).

1.1 BIOPRODUÇÃO DE INTEGRADA À CADEIA DO BIODIESEL

O biodiesel é uma das alternativas mais viáveis, a curto prazo, para a substituição dos derivados do petróleo para motor a diesel, assim, a elaboração de processos que utilizem os subprodutos da cadeia é necessária, pois caso contrário, com os danos ambientais causados pelo grande volume de resíduos e coprodutos, o sentido maior de “fonte renovável” perde o verdadeiro valor. Assim abre-se um leque de possibilidades e oportunidades, para a utilização do glicerol em processos biotecnológicos.

Normalmente, no processo de transesterificação, um álcool de cadeia curta é adicionado em excesso, para garantir a reação de todos os ácidos graxos, sendo o produto final desta reação uma mistura de duas fases imiscíveis, uma mais densa (biodiesel) e outra contendo monoglicerídeos, diglicerídeos, glicerol, álcool e catalisador, em várias concentrações.

A legislação brasileira estabelece que os teores de ácidos graxos livres, álcool, glicerol e água devem ser mínimos, de modo, que a pureza do biodiesel seja superior a 96,5 % (KARAOSMANOGLU, AKDAG & CIGIZOGLU, 1996)

A produção brasileira utiliza o metanol e não o etanol como álcool para a reação de transesterificação devido principalmente suas vantagens técnicas, como, maior rendimento e menor tempo de reação, além da consolidação da indústria alcooleira no país. Entretanto apresenta desvantagens como, maior toxicidade, ser produzido principalmente a partir do petróleo, ter comercialização controlada, maiores detalhes estão apresentados na Tabela 5.

Para a utilização do glicerol como fonte de carbono é necessário a retirada do metanol, devido à toxicidade para os micro-organismos, além disso, o álcool pode ser reutilizado no processo inicial de transesterificação. A separação pode ser feita com aquecimento brando, já que

os dois produtos possuem volatibilidade bem diferentes (ponto de ebulição do metanol e glicerol respectivamente, 64 °C e 290 °C), que então evapora e é liquefeito em um condensador.

Para aumentar a pureza para sua reutilização, o álcool deve ser novamente purificado, pois as moléculas do mesmo podem carrear outras moléculas durante a destilação. Para o glicerol, pode se realizar a destilação fracionada, porém para produção biotecnológica esse processo nem sempre é necessário.

Os progressos em biotecnologia, podem levar à utilização de rejeitos da indústria produzindo compostos de alto valor e favorecendo processos cíclicos que compactuam com sustentabilidade ambiental. Portanto, devido à prospecção favorável à implementação de processos ambientalmente corretos, como por exemplo, o biodiesel, e crescente demanda por produtos “naturais”, a utilização do glicerol como componente do meio de cultura, possibilita não apenas a reutilização do álcool na transesterificação do lipídeo, como produção concomitante de enzimas, aromas e biossurfactantes.

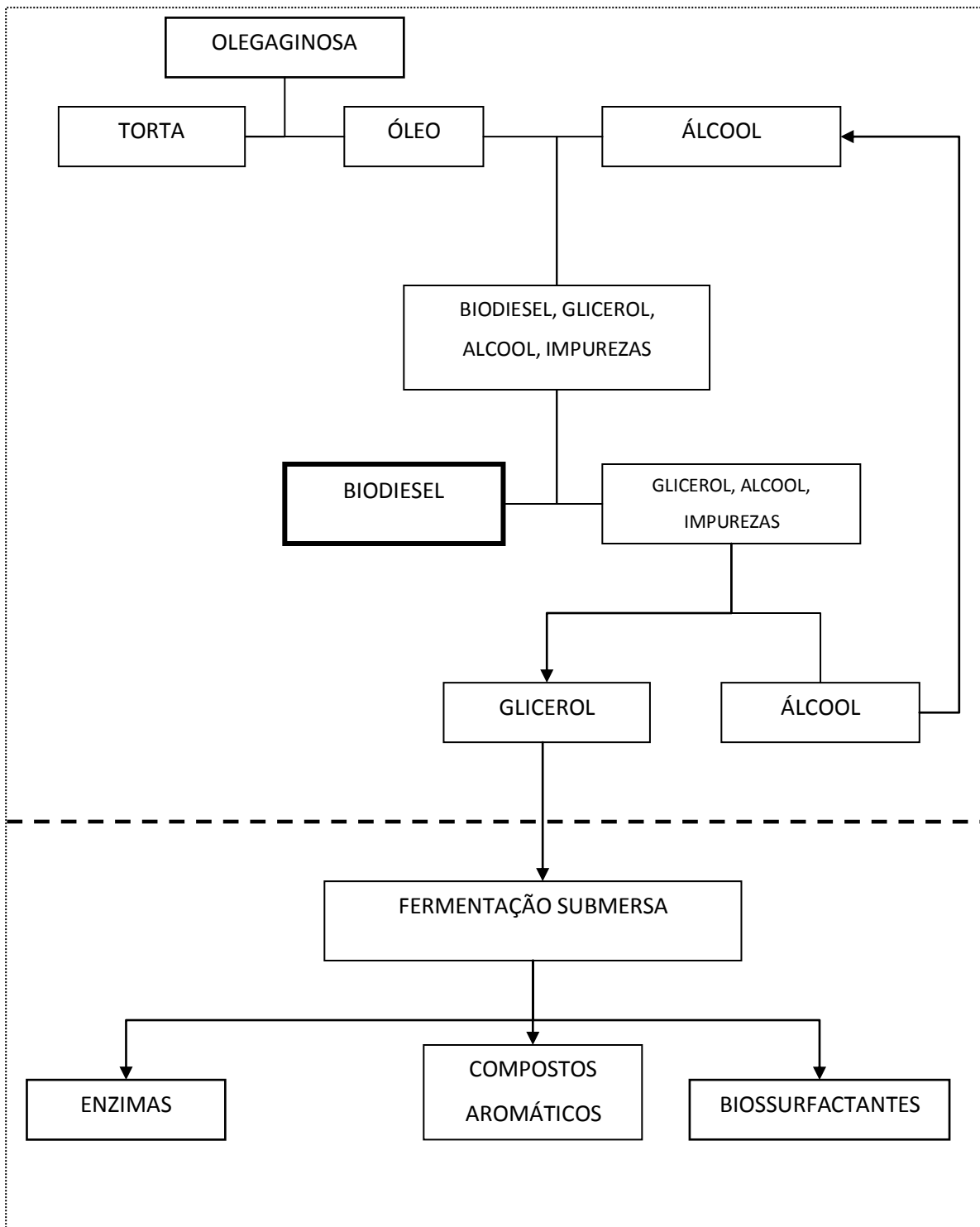


Figura 1 - Proposta de fluxograma com processo integrado na produção de biodiesel e bioprodutos. Fonte: baseado em RIVALDI; SARROUH & FIORILO, (2007).

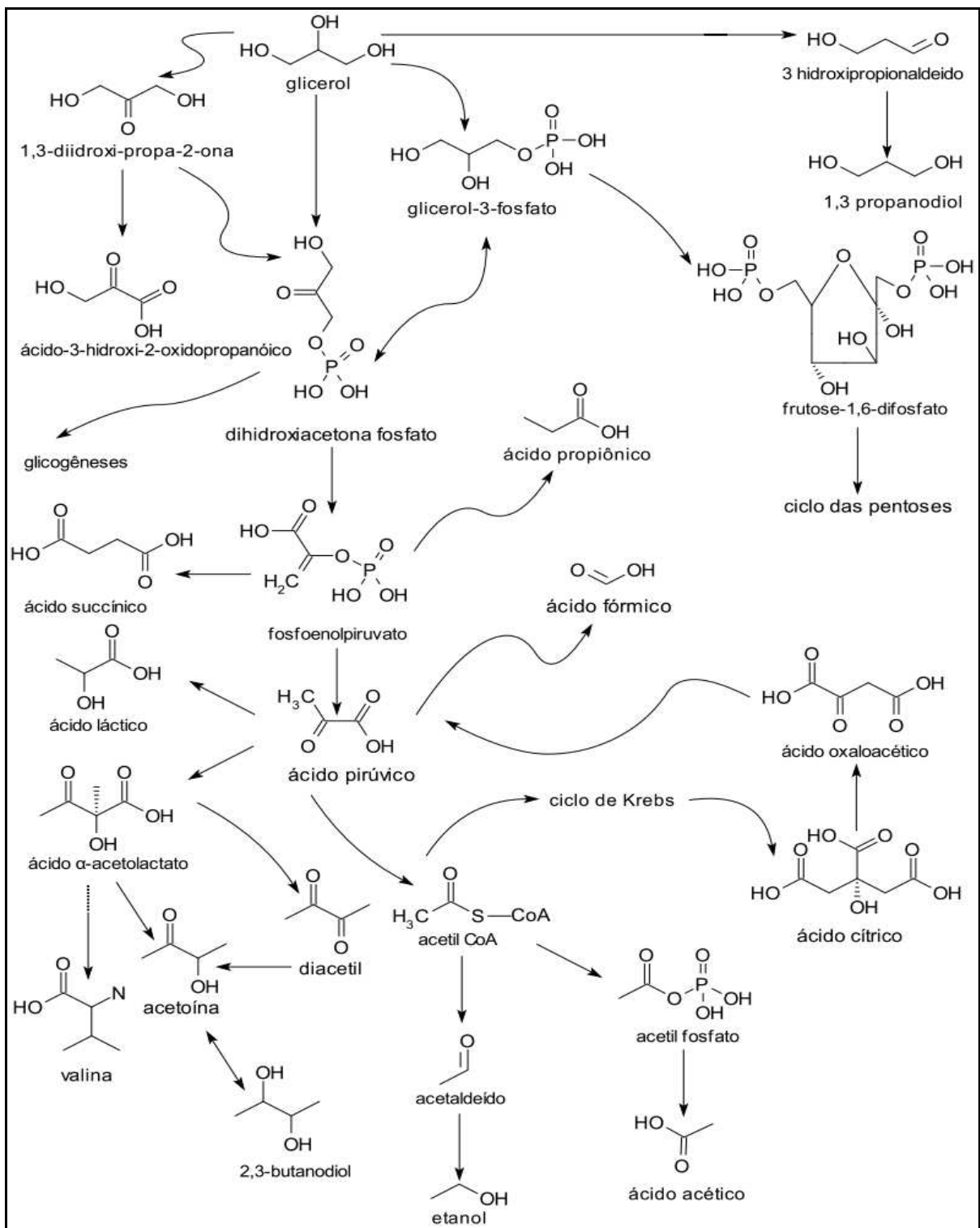


Figura 2. Possíveis vias metabólicas de assimilação de glicerol por micro-organismos e seus possíveis produtos como ácidos orgânicos e compostos aromáticos. Fonte: baseado em RIVALDI; SARROUH & FIORILO, (2007) e BARTOWSKY & HENSCHKE, (2004).

OBRAS CONSULTADAS

BARTOWSKY E. J.; HENSCHKE P, A. - The 'buttery' attribute of wine--diacetyl--desirability, spoilage and beyond. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 235-252, 2004.

FUJITA, H. A.; FIGUEROA, M. O. R. - Composição centesimal e teor de β -glucanas em cereais e derivados. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n .2, 2003

KARAOSMANOGLU F.; AKDAG, A.; CIGIZOGLU, K. B.- Biodiesel from rapeseed oil of Turkish origin as an alternative fuel. **Applied biochemistry and biotechnology**. v. 61, n. 3, p. 251-265, 1996.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. - Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 106, p. 295-302, 2003.

PELIZER, L, H.; PONTIERI, M, H.; MORAES, I, O. - Utilização de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management & Innovation**, v.2, n. 1, 2007.

RIVALDI, J, D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R - Glicerol de biodiesel - Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel, **Biociência & Desenvolvimento**, n. 37, p. 44 – 51, 2007.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:
BIOSURFACTANTES, ENZIMAS E AROMAS PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis* EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS COMO SUBSTRATO

1 POSSIBILIDADES DE PRODUÇÃO COM O GÊNERO *BACILLUS*

A espécie *Bacillus subtilis* é um dos principais micro-organismos produtores de biosurfactantes (CARRILLO & COOPER, 2003; FERNADEZ, 2007, KLUGE *et al.*, 2009; MULLIGAN, COOPER & NEUFELD, 1984) e o mais importante de proteases ANWAR & SALEEMUDDIN, (1998) e outras enzimas como amilases (BON, FERREIRA & CORVO, 2008). Além disso, de maneira incipiente, alguns aromas são referenciados ao gênero (MARIOTTO, 2007; BERGER, 1995).

São bactérias gram-positivas e, apesar de terem sido consideradas estritamente aeróbicas por muito tempo, estudos demonstram que esta espécie pode crescer em ambientes anaeróbicos (NAKANO & HULETT, 1997), passando então a obter energia através da respiração anaeróbica, utilizando o nitrogênio comoceptor final de elétrons.

Portanto, os biocompostos estão presentes em todas as células vivas exercendo a função de biocatalisadores nas reações que compõem as vias catabólicas e anabólicas do metabolismo microbiano.

2 METABOLISMO DO GLICEROL

O glicerol pode atuar como fonte de carbono e seguir diversas rotas metabólicas produzindo compostos como ácidos, álcoois, aldeídos e aromas como acetil, acetoina e 2,3 butanodiol e/ou influenciar diretamente na absorção de nutrientes, alterando a permeabilidade da membrana plasmática do micro-organismo.

A primeira etapa da utilização do glicerol por micro-organismos acontece com o transporte através de sua membrana celular, podendo acontecer de forma passiva ou ativa. O transporte passivo inclui a difusão simples (permeação não específica) e a difusão facilitada mediada por proteínas (permeases) localizadas nas camadas mais internas da membrana plasmática (RIVALDI, SARROUH & FIORILO, 2007). É um dos poucos substratos com a capacidade de atravessar a membrana celular por difusão facilitada. Em bactérias, como *Escherichia coli*, a proteína do tipo poro-canal-G1pF é ativa na presença de glicerol, não tendo a

mesma atuação para moléculas com carga como gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato (RIVALDI, SARROUH & FIORILO, 2007).

Estando no citoplasma pode seguir diversas rotas metabólicas, sendo a principal a fosforilação catalisada pelo glicerol quinase formando glicerol-3-fosfato e sequentes etapas da glicólise (RIVALDI, SARROUH & FIORILO, 2007; BARTOWSKY & HENSCHKE, 2004). Outra possibilidade ocorre com os gêneros *Bacillus e Glucobacter* em que o micro-organismo oxida seletivamente o segundo grupo hidroxila do glicerol e consequente formação de dihidroxiacetona pela enzima glicerol desidrogenase. Em seguida, a mesma é fosforilada a dihidroxiacetona fosfato pela enzima dihidroxiacetona quinase dependente de ATP. Esta molécula é importante intermediária para a gliconiogênese e também pode seguir a via das pentoses (pentose-fosfato). Portanto, a dihidroxiacetona fosfato é um intermediário de diversos compostos tais como, ácido cítrico, ácido succínico, ácido acético, ácido fórmico, ácido láctico, etanol entre outros (RIVALDI; SARROUH & FIORILO, 2007; RIBEIRO, 2009)

Os minerais pertencentes às oleoginosas utilizadas na produção do biodiesel, podem ser a razão da presença dos mesmos no glicerol bruto (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição do óleo soja e glicerol bruto oriundo do biodiesel produzido com soja. Adaptado de THOMPSON & HE, (2006).

| Concentração | | Óleo | Glicerol bruto |
|------------------------|------------|------|----------------|
| Parte por milhão (ppm) | Cálcio | 3,1 | 11 |
| | Potássio | N.D | N.D |
| | Magnésio | 1,2 | 6,8 |
| | Fósforo | 10 | 53 |
| | Enxofre | 22 | N.D |
| | Sódio | N.D | 1,2 |
| % | Carbono | 77 | 26 |
| v/v | Nitrogênio | 0,22 | 0,04 |

*N.D: não detectado

A utilização do glicerol oriundo da produção do biodiesel apresenta a vantagem de conter elementos nutricionais como, fósforo, enxofre, magnésio, cálcio, nitrogênio e sódio, que são essenciais e/ou factíveis de serem utilizados por micro-organismos, mais especificamente para a

produção de surfactina por *Bacillus*, como descrito por COOPER *et al.*, (1981) e PEYPOUX; BONMATIN & WALLACH, (1999).

3 BIOSSURFACTANTES

3.1 SUMÁRIO HISTÓRICO

JARVIS & JOHNSON, (1949) descreveram a surfactina como um composto cristalino que pode ser obtido do meio de cultura fermentado com algumas linhagens de *Bacillus subtilis*. Durante os anos 60, pesquisas realizadas por ARIMA, KAKINUMA & TAMURA, (1968), evidenciaram a inibição da formação de coágulos de fibrina, além de apresentar propriedades tensoativas. No ano seguinte, os trabalhos de KAKINUMA *et al.*, (1969a); KAKINUMA *et al.*,(1969b); KAKINUMA *et al.*,(1969c); KAKINUMA *et al.*,(1969d) elucidaram a estrutura primária total da surfactina (Figura 1), com a determinação do ácido graxo conjugado da estrutura heptapeptídica, utilizando técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN). Entretanto, foi na década de 80 que se iniciou efetivamente o interesse de pesquisadores vislumbrando os benefícios ambientais do uso de biossurfactantes quando comparados as surfactantes sintéticos, como evidenciado pelos trabalhos de COOPER & ZAJIC, (1987); MULLIGAN, COOPER & NEUFELD, (1984); MULLIGAN, MAHMOURIDES & GIBBS, (1989), Desde então, pesquisas no âmbito de produção e aplicações de biossurfactantes vem sendo realizadas (PERNA, 2009).

3.2 TENSOATIVIDADE E ESTRUTURA QUÍMICA

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas que podem interferir na miscibilidade de soluções como potentes emulsificantes e, em outras propriedades ainda não tão bem elucidadas, como bioremediadores e antimicrobianos. Estes compostos apresentam vantagens em relação aos surfactantes sintéticos como baixa toxicidade, maior biodegradabilidade e poder emulsificante, redutores da tensão superficial e interfacial, além de resistência a condições extremas de pH, temperatura e salinidade.

São classificados por sua composição química e origem microbiana, diferentemente dos surfactantes sintetizados que são agrupados de acordo com a natureza do seu grupo apolar (KARANTH, DEO & VEENANADIG, 1999). Basicamente, os biosurfactantes podem ser divididos em 7 classes: glicolípídeos, lipopeptídeos/lipoproteína, fosfolípídeos, lipídeos neutros e ácidos graxos substituídos (hidroxilados ou com ligação cruzada), lipopolissacarídeos complexos e biosurfactantes ligados à cadeia celular (KOSARIC, CAIRNS & SAINI, 1987), sendo que bactérias do gênero *Bacillus* produzem principalmente os lipopeptídeos, entre os quais estão surfactina, iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina e bacilomicina (BARROS *et al.*, 2007).

3.2.1 Surfactina

A surfactina é formada por uma cadeia carbônica e um anel lactona composto de heptapeptídeo com sequência quiral LLDLLDL (STACHELHAUS, MOOTZ & MARAHIEL, 2002) interligados em β -ligação a uma cadeia carbônica estruturada no formato de folha Beta pregueada.

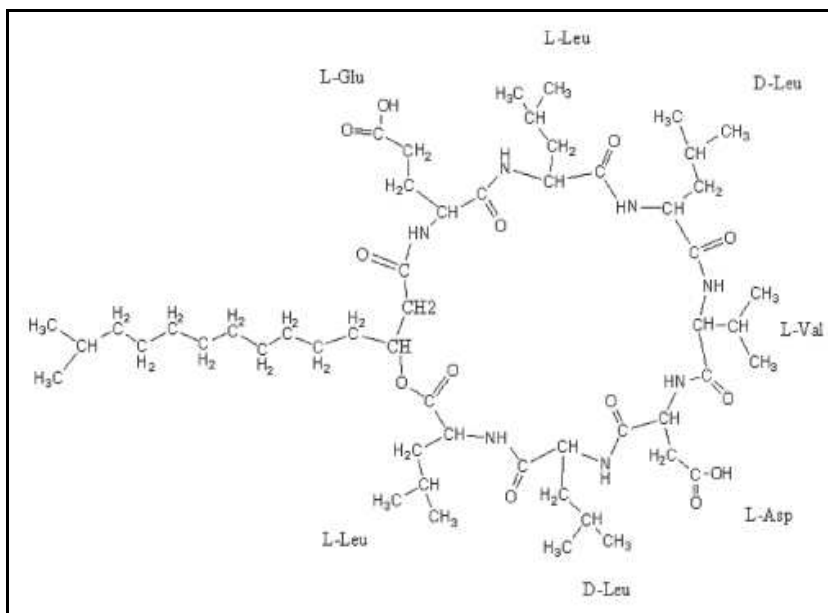


Figura 1 - Estrutura bidimensional da principal isoforma da surfactina (BARROS *et al.*, 2007)

A surfactina (1036 Da) é conhecida por ter excepcional atividade superficial, reduzindo a tensão superficial da água (20°C) de 72 para 27 mN/m em concentrações menores de 20 μ M,

além de reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43mN/m para valores menores que 25,27 mN/m (BARROS *et al.*, 2007).

3.2.2 Iturina A

A iturina A, assim como a surfactina, é composta por um grupo de heptapeptídeos com configurações D e L em sua parte polar. Porém, tanto os aminoácidos como a estrutura hidrofóbica são diferentes entre os dois biossurfactantes.

Até 2009, oito estruturas homólogas foram reportadas, sendo classificadas de A1 até A8 para os diferentes tamanhos e formas das cadeias (IWASE, RAHMAN & ANO, 2009). Apresenta concentração micelar crítica (CMC) de 40 μ M e amplo espectro de atividade antifúngica como inibição do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* (GRAU *et al.*, 2001), *Rhizoctonia solani*, *Candida albicans*, *Thricophyton mentagrophytes* e *Aspergillus fumigatus* (SCHULZ BONELLI & BATISTA, 2005), além de apresentar baixa toxicidade.

3.2.3 Sinergismo

As pesquisas realizadas por MAGET-DANA *et al.*, (1992) evidenciaram uma forte relação entre a surfactina e a iturina A produzidas por uma mesma linhagem, onde a concentração inativa de surfactina aumentou consideravelmente a hemólise quando associada a iturina A.

Dados recentes sobre a iturina A e sua capacidade de se ligar com cátion, forneceram uma introspecção adicional em seu modo de ação. Neste contexto, a surfactina apresenta boa estabilidade quando associado a outras moléculas como cátions, lipídeos, proteínas ou mesmo lipopeptídeos coproduzidos.

Essa interação entre a surfactina e a iturina A pode ser uma das razões pela qual o padrão de surfactina (SIGMA-ALDRICH, 99,99 %) tem difícil solubilização em meio aquoso, o que não ocorre com o denominado neste trabalho de biossurfactante semipurificado.

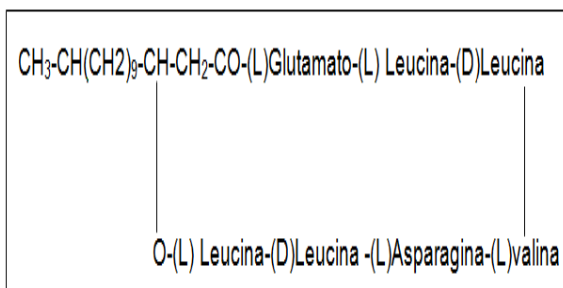


Figura 2 - Estrutura da surfactina (MULLIGAN, 2004).

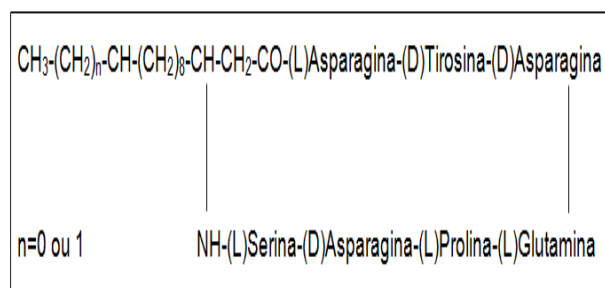


Figura 3 - Estrutura da Iturina A (GRAU *et al.*, 2001).

Os biossurfactantes em meio aquoso alinham-se primeiramente na superfície, com sua parte hidrofóbica fora do meio. Assim, após completar a monocamada, devido ao aumento da concentração, acontece um estado de equilíbrio dinâmico entre a camada superficial e formas agrupadas na solução, chamadas de micelas, que são formações esféricas, com a parte hidrofóbica de cada molécula voltada para o interior e a hidrofílica externada, de modo a diminuir a área de contato entre a cadeia apolar e o meio aquoso (ATTWOOD & FLORENCE, 2003). O ponto ou concentração micelar crítica (CMC) pode ser detectado por mudanças na inclinação da curva da tensão superficial, condutividade e dispersão da luz em função da concentração, permitindo assim o pesquisador se adequar em função dos equipamentos disponíveis e comparar resultados.

A fermentação com *Bacillus* é geralmente realizada aerobicamente e em meio aquoso. Assim, quando o ar tenta transpor a camada anfifílica, esta curva-se de modo a “encapsular” o ar e assim são formadas as bolhas de espuma, que concentram os biossurfactantes. As diferentes características dos tensoativos (catiônicos, aniônicos e não iônicos) influenciam no tamanho e no formato das micelas (ATTWOOD & FLORENCE, 2003).

4 METABOLISMO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

A biossíntese da surfactina é catalisada pela ação de um complexo multienzimático da família dos peptídeos sintetases, uma classe envolvida com os metabólitos secundários (PEYPOUX; BONMATIN & WALLACH, 1999). Ao contrário de muitos metabólitos secundários do *Bacillus*, cuja produção é induzida quando as células têm esgotado um ou mais nutrientes essenciais, a produção de surfactina é induzida por células em crescimento

(PEYPOUX; BONMATIN & WALLACH, 1999), sendo esta uma das razões para não se conseguir elevados rendimentos.

Estudos realizados por ARIMA; KAKINUMA & TAMURA, (1968), com caldo nutriente como meio de cultura obtiveram baixos rendimentos de produção de biossurfactantes (0,1 g.L⁻¹). COOPER, *et al.*, (1981), em um trabalho subsequente, demonstrou a importância da fonte de nitrogênio e os efeitos estimulatórios do ferro e manganês que culminaram no chamado “Cooper’s medium”, com taxa molar de 920:7,7:1,0, respectivamente para nitrogênio/ferro/manganês e aproximadamente 7,5 para C/N. Ainda neste âmbito, os trabalhos de NITSCHKE, (2004); COSTA, (2005) mostraram a predominância dos íons NH₄⁺ sobre os NO₃⁻. Outras vantagens da grande influência na produção de biossurfactantes por *Bacillus* são o tipo e concentração da fonte de carbono, concentração salina no meio e pH ácido que inibe o crescimento microbiano (FERNADEZ, 2007).

A sacarose e frutose apresentam bons resultados como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes PEYPOUX; BONMATIN & WALLACH, (1999). Além disso, as pesquisas realizadas por SANDRIN, PEYPOUX & MICHEL, (1990), não encontraram significância na suplementação com diferentes aminoácidos na produção de surfactina.

Como relatado por MULLIGAN, MAHMOURIDES & GIBBS, (1989), o fosfato tem relação metabólica direta com a produção de biossurfactantes influenciando a atividade das enzimas transhidrogenase (oxidação e redução), desidrogenase glicose-6-fosfato (via glicolítica) e fosfatase alcalina (remoção de grupos fosfato de moléculas como nucleotídeos, proteínas etc.).

As variações entre os rendimentos da produção de surfactina se deve principalmente às condições de processo e/ou nutricionais (SHEPPARD & COOPER, 2004). No entanto, estudos empíricos não contribuem substancialmente para uma melhor compreensão da regulação e controle do metabolismo celular, já que na maioria dos trabalhos faltam correlações diretas com as vias bioquímicas e os resultados obtidos. Como exceções a esta regra, os trabalhos de COOPER, *et al.*, (1981); SANDRIN, PEYPOUX & MICHEL, (1990); JENNY, DELTRIEU & DAPPELI, (1993); KLUGE *et al.*, (1998); PEYPOUX; BONMATIN & WALLACH, (1999) fornecem importantes informações bioquímicas. Este último reportando detalhadamente os passos da formação da surfactina. GOTTSCHALK, (1998) por sua vez, reportou de forma mais ampla as relações entre os nutrientes e suas funções no metabolismo microbiano bacteriano.

As necessidades de nutrientes que devem estar presente no meio de cultura são diferentes entre linhagens. Os fatores de crescimento para os micro-organismos geralmente não são conhecidos e por isso microbiologistas adicionam compostos complexos como extrato de levedura e peptona para garantir tais suprimentos. Os meio sintéticos são utilizados quando já se tem conhecimento das necessidades nutricionais (GOTTSCHALK, 1998). Pesquisas envolvendo a produção e nutrição de processos fermentativos para obtenção da surfactina vem sendo realizadas visando a suplementação dos minerais requeridos pelo micro-organismo em questão, bem como, otimizar as vias metabólicas objetivando maiores rendimentos. Além disso, como reportado por PEYPOUX; BONMATIN & WALLACH, (1999), a composição do meio de cultura tem influência na estabilidade da surfactina, que complexa-se com íons divalentes como Ca^{+2} e Mg^{+2} .

5 ENZIMAS

Devido à especificidade, forma de produção, impacto ambiental e outras vantagens sobre os catalisadores sintéticos a prospecção é favorável ao aumento da produção industrial de enzimas. Projeções realizadas por WOLGANG; KLAUS & KARLHEINZ, (2005), indicaram uma taxa de crescimento de 4,7 % no mercado mundial de metabólitos obtidos por fermentação microbiana, passando de US\$ 14,1 bilhões em 2004 para US\$ 17,8 bilhões em 2009. Esta produção é majoritariamente realizada por micro-organismos, embora alguns biocatalisadores sejam extraídos de tecidos animais (por exemplo, pancreatina, tripsina, pepsina e renina) e vegetais (por exemplo, papaína, bromelina, ficina malte e peroxidase).

As linhagens de *Bacillus subtilis* que fermentam em meios de cultura com diferentes pHs, temperaturas e outros parâmetros propiciam uma ampla oferta de processos e produtos biotecnológicos a serem pesquisados. A composição do meio de cultura é essencial para o crescimento microbiano, pois as células podem responder a estímulos químicos e físicos do meio externo, por meio de mecanismos bioquímicos, regulando assim os produtos formados. As fontes de carbono utilizadas no processo fermentativo podem ser essenciais para se obter altos rendimentos, pois os micro-organismos podem não possuir arsenal enzimático para metabolizá-las. A glicose, por exemplo, apesar de ser excelente fonte de energia para o crescimento

microbiano, tem sido reportada como repressora de α -amilase, celulase e invertase (BON, FERREIRA & CORVO, 2008).

Dentre as enzimas produzidas por micro-organismos destacam-se as amilases que são responsáveis por 23 % do grupo das carboidrases na indústria e projeções indicam crescimento de sua demanda. Segundo BON, FERREIRA & CORVO, (2008), as proteases são o principal grupo de enzimas produzidas comercialmente e são usadas na produção de detergente, proteínas, cerveja, carne, fotografia, couro, em laticínios, etc., (ANWAR & SALEEMUDDIN, 1998). Mesmo com eminente mercado, atualmente o mecanismo responsável pelo controle da síntese proteica no *Bacillus subtilis* não é conhecido. Entretanto, pesquisas indicam uma alta significância das fontes de nitrogênio e carbono utilizadas (MABROUK *et al.*, 1999).

O crescimento microbiano e consequente produção de metabólitos (bioprodutos) são proporcionais às necessidades nutricionais de cada micro-organismo como: água, fonte de carbono, nitrogênio e oxigênio, além de elementos minerais como fósforo, enxofre, potássio, cálcio, magnésio, sódio, ferro. De maneira geral, podem ser utilizados desde compostos de baixo peso molecular (mono ou dissacarídeos, metilamina) como compostos de alto peso molecular (amido, proteínas, lipídeos, celulose, hemicelulose, lignina) como fonte de carbono e energia, desde que os micro-organismos possuam arsenais enzimáticos capazes de metabolizar estes componentes (BON, FERREIRA & CORVO, 2008).

Devido à uma parcela significativa de micro-organismos não estar identificada e consequente potencial de uso e produção, há muitas enzimas a serem descobertas além do desafio de torná-las economicamente viáveis. Paralelamente a estas descobertas, a engenharia metabólica caracteriza e direciona vias metabólicas de certos micro-organismos que já se destacam na produção enzimática e assim passam a super expressar certas enzimas.

Tabela 2 - Cronologia entre o número de patentes relacionadas a enzimas (ASSUMPCÃO, 1999).

| Ano | 1995 | 1996 | 1997 | 1998 |
|---|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Patentes relacionadas com enzimas | 74 | 84 | 108 | 189 |
| Número total de patentes | 12.917 | 14.333 | 13.366 | 18.689 |
| Relação percentual (Enzimas/Total) | 0,6 | 0,6 | 0,8 | 1,0 |

Ainda nesse contexto, no período de 2004-2005 o Japão liderou as patentes de biocatálise com 43 % dos registros. Com relação ao depositante, 41 % são empresas, 38 % pessoas físicas e 21 % Universidades/Instituto de Pesquisa (BON, FERREIRA & CORVO, 2008).

Tabela 3 - Exemplos de enzimas comerciais obtidas a partir de *Bacillus subtilis* (BON, FERREIRA & CORVO, 2008).

| Enzimas | Microrganismos produtores |
|----------------|--|
| Aminopeptidase | <i>Aspergillus niger</i> , <i>A.oryzae</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus Subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> |
| Celulase | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus Subtilis</i> , <i>Humicola isolens</i> , <i>Streptomyces lividans</i> , <i>Trichoderma reesei</i> , <i>Trichoderma viridae</i> |
| Beta-Glucanase | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus aculeatus</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus Subtilis</i> , <i>Humicola isolens</i> , <i>Talaromyces emersonii</i> |
| Hemicelulase | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Bacillus subtilis</i> |
| Protease | <i>Bacillus halodurans</i> , <i>Aspergillus melleus</i> , <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Penicilium citrinum</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>Streptomices</i> , <i>Fradiaae</i> |
| Xilanase | <i>Aspergillus niger</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Humicola insolens</i> , <i>Penicilium funiculosum</i> , <i>Tricchoderma reesei</i> , |

6 AROMAS

6.1 SUMÁRIO HISTÓRICO

Existem indícios da produção comercial de aromas desde o século XVIII. No século XX houve um grande avanço na área, devido, principalmente, à técnica apurada de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, que permitiu a separação e identificação dos compostos com importantes funções nas respostas organolépticas (MARTINS, 2003).

Muitos compostos de aromas no mercado atual continuam sendo produzidos por síntese química ou extraídos de fontes animais e vegetais. Entretanto é observado um crescimento do mercado (cerca de 75 a 80 % em 1994) de bioaromas como relatado por MARTINS, (2003) e BERGER, (1995).

Diversos micro-organismos são capazes de produzir aromas, com destaque para bactérias e leveduras, como confirmado pela análise da Tabela 4, a seguir.

Tabela 4 – Gêneros de micro-organismos e seus respectivos aromas produzidos (MARIOTTO, 2007).

| Gênero | Espécie | Produtos |
|--------------------------|---------------------------|---|
| <i>Klebsiella</i> | <i>pneumoniae</i> | 2,3-butanodiol |
| | <i>oxytoca</i> | acetoína, 2,3-butanodiol |
| <i>Lactococcus</i> | <i>lactis ssp.</i> | acetoína, diacetil, lactato, acetato |
| | <i>diacetylactis</i> | ácido α -acetolactato, acetoína, diacetil |
| <i>Hanseniaspora</i> | <i>guilliermondii</i> | etanol, acetoína |
| <i>Kloeckera</i> | <i>apiculata</i> | |
| <i>Streptococcus</i> | <i>thermophilus</i> | acetoína, acetaldeído, acetona, diacetil, etanol |
| <i>Leuconostoc</i> | <i>oenos</i> | acetoína, diacetil, lactato, acetato, 2,3-butanodiol, |
| | <i>mesenteroides</i> | acetoína, acetato, diacetil, lactato |
| <i>Enterobacter</i> | <i>aerogenes</i> | acetoína, acetato, lactato, 2,3-butanodiol, etanol |
| <i>Bacillus</i> | <i>polymyxa</i> | ácido acético, etanol, acetato, 2,3-butanodiol, lactato |
| | <i>licheniformis</i> | 2,3-butanodiol, acetoína, acetato, etanol, formato, |
| <i>Propionibacterium</i> | <i>freudenreichi</i> | ácido propiônico, ácido acético |
| <i>Pseudomonas</i> | <i>jensenii/shermanii</i> | |
| <i>Acetobacter</i> | <i>hansenii</i> | diacetil, 2,3-butanodiol, acetoína |
| <i>Kloeckera</i> | <i>Apiculata</i> | acetoína, 2,3-butanodiol |
| <i>Saccharomyces</i> | <i>cerevisiae</i> | |
| <i>Candida</i> | <i>stellata</i> | |
| <i>Metschnikowia</i> | <i>pulcherrima</i> | |

6.2 DEFINIÇÃO E POSSIBILIDADES

Aromas são utilizados em alimentos, bebidas, rações, cosméticos, químicos e farmacêuticos, e apresentam mais de um grupo químico como, álcoois, éteres, cetonas, aldeídos, ésteres, isoprenóides, fenóis. São moléculas de baixo peso molecular (normalmente menores que 400 Dalton) que interagem de inúmeras maneiras com as células receptoras e estão presentes em quantidades ínfimas na composição dos alimentos. Em função da especificidade dos receptores olfativos, os compostos aromáticos são percebidos em baixas concentrações (BERGER, 1995). O diacetil, por exemplo, é um dos compostos produzidos durante a fermentação da cerveja que mais influencia no sabor e aromas, o qual pode conferir sabor *off flavor* em concentrações de 1ppm, (CARVALHO, 2005).

Conforme a Resolução nº 104, de 14 de Maio de 1999, os aromas são classificados como naturais ou sintéticos e definidos como substâncias ou misturas com propriedades odoríferas e/ou sápidas, capazes de conferir ou intensificar o aroma e/ou sabor dos alimentos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010). Excluem-se desta definição: substâncias que conferem exclusivamente sabor doce, salgado ou ácido, substâncias e produtos alimentícios com propriedades odoríferas e ou sápidas consumidas sem transformação, com ou sem reconstituição, matérias de origem vegetal ou animal que possuam propriedades aromatizantes intrínsecas, quando não sejam utilizadas exclusivamente como fonte de aromas.

Existem basicamente três métodos para a obtenção de compostos aromáticos (i) extração diretamente da natureza, (ii) transformações químicas, (iii) transformações vias biotecnológicas (FRANCO, 2004). O último método apresenta uma série de vantagens como utilização de resíduos agroindustriais como substrato, especificidade estrutural dos compostos formados, geração de resíduos não agressivos ao ambiente, degradação parcial de substratos em metabólitos importantes pelo controle dos caminhos das reações microbianas e extensão da estrutura do substrato pelo uso de reações de biossíntese (BERGER, 1995), independência variações externas (clima, doenças, fertilizantes), produção concomitante de voláteis (MARTINS, 2003).

6.3 AROMAS DA INDÚSTRIA LÁCTEA

Fermentados derivados da indústria leiteira tem boa aceitação por consumidores devido às suas propriedades como sabor, odor, cor, aroma, aparência, textura e por serem associados como alimentos saudáveis. Estas qualidades sensoriais são produtos de múltiplas fermentações, sendo as primeiras horas cruciais para o desenvolvimento de aromas. A lactose é metabolizada pelos micro-organismos em ácido láctico e os aromas produzidos dependem dos tipos de lactatos formados e dos subprodutos da glicólise (GARDINI *et al.*, 1999).

As bactérias propiônicas são responsáveis pela formação de “olhaduras” (buracos) nos queijos graças à produção de gás carbônico e, no desenvolvimento do aroma e sabor característicos nos queijos tipo suíço, devido, principalmente, aos ácidos propiônico e acético (HETTINGA & REINBOLD, 1972). A maioria dos produtos tem aromas complexos, como café, cacau, vinho e cerveja, que apresentam mais de 500 compostos voláteis, os quais, juntos, são responsáveis pela formação do aroma característico (BERGER, 1995). Em alguns casos, porém, os aromas de determinados alimentos podem resultar da ação basicamente de poucas ou mesmo de uma única substância, chamada de “composto de impacto”, que define o aroma característico da matriz. Exemplos são o acetato de isopropila, composto de impacto da banana e os aromáticos acetaldeído, etanol, diacetil, 2,3-butanodiol, acetoína e ácido láctico que têm um alto impacto no sabor do produto dos produtos lácteos e seus derivados fermentados (GARDINI *et al.*, 1999).

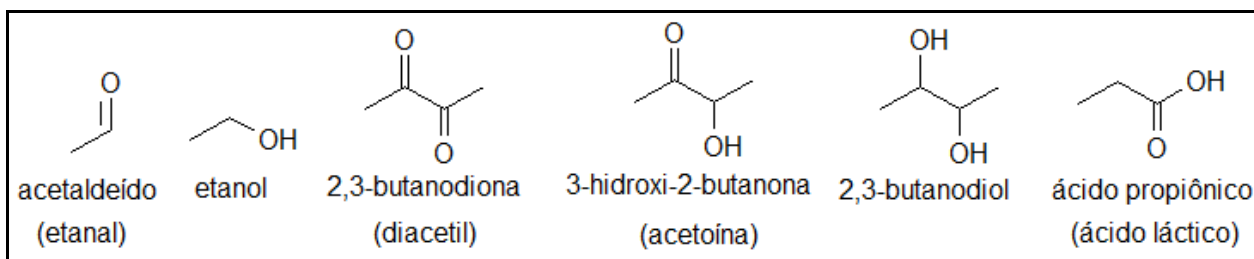


Figura 4 - Estrutura química dos principais compostos aromáticos da indústria láctea.

Na maioria dos processos fermentativos os bioprodutos de interesse geralmente estão em baixas concentrações, necessitando de etapas de purificação (downstream) e/ou não estarem suficientemente estáveis no meio, principalmente com relação as enzimas (pH ótimo) e/ou

coprodução de substâncias inadequadas. Assim, tais etapas elevam consideravelmente o custo, e, por outro lado, proporcionalmente o valor agregado.

6.4 ACETOÍNA, DIACETIL E 2,3-BUTANODIOL

Os aromas acetoína, diacetil e 2,3-butanodiol são normalmente produtos de processos fermentativos (MARIOTTO, 2007; BARTOWSKY & HENSCHKE, 2004). Apresentam estruturas químicas semelhantes, diferenciando-se na hidrogenação do(s) oxigênio(s). O diacetil têm melhor resposta sensorial (*threshold* 0,1 mg/L) que a acetoína e, portanto, tem uso preferencial na industrial, bem como pesquisas relacionadas ao tema (BERGER, 1995).

A acetoína está normalmente associada a outros compostos tais como diacetil, pois é produto da redução parcial do mesmo formando os aromas de muitos produtos lácteos, principalmente queijos e manteigas (CARVALHO, 2005).

A redução do diacetil a acetoína e 2,3 butanodiol é vantajosa devido aos mesmos produtos serem menos tóxicos e oxidarem as coenzimas NADH na presença de uma redutase (BARTOWSKY & HENSCHKE, 2004).

O diacetil pode ser produzido por via sintética a partir da butanona ou por via fermentativa através de diversos micro-organismos como bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Streptococcus* (CARVALHO, 1999).

O composto chave na produção do diacetil é o α -acetolactato, produto intermediário da síntese da valina. O α -acetolactato se descarboxila e se oxida quimicamente no mosto para originar o diacetil. O diacetil retorna ao interior da célula onde é reduzido por meio de redutases a acetoína e 2,3 butanodiol (CARVALHO, 2005).

7 SUBPRODUTOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO DE INSUMOS DE ALTO VALOR AGREGADO

7.1 BIODIESEL, RESÍDUOS E COPRODUTOS

7.1.1 Sumário histórico do biodiesel

A primeira demonstração pública do motor a diesel operando com óleo vegetal aconteceu em 1900 fomentada pelo governo francês objetivando beneficiar os agricultores ao prover seu próprio combustível, além da possibilidade de desenvolver áreas remotas do mundo (BIODIESEL..., 2010).

Em 1983, na Áustria, o Dr. Mittelbach desenvolveu o processo para transformar óleos alimentares utilizados em biodiesel. Em 1989, o Dr. Thomas Reed é creditado como pioneiro na produção do mesmo em pequena escala, com a empresa chamada “Pacific Biodiesel” (BIODIESEL..., 2010).

O biodiesel é um dos principais combustíveis alternativos no mundo seu futuro está na capacidade do mundo em produzir matérias-primas renováveis, como óleos vegetais e gorduras, sem suplantarem os terrenos necessários para a produção de alimentos, ou a destruição de ecossistemas. Esta indústria, desenvolvendo-se de forma sustentável, permitirá aliviar o mundo da crescente escassez de petróleo, proporcionando benefícios econômicos e ambientais no século XXI.

7.1.2 Produção, atualidades, prospecções e impactos econômicos

O biodiesel tem experimentado recentemente um grande impulso em todo o mundo. A rápida expansão da produção está sendo observado não apenas nos países desenvolvidos, como Alemanha, Itália, França e Estados Unidos, mas também, em países em desenvolvimento como Brasil, Argentina, Indonésia e Malásia. Em todos estes países a expansão foi promovida por

incentivos oferecidos pelo governo, preocupações com o meio ambiente e a corrente alta de preços do petróleo (LUCENA, 2008).

O Brasil conta com um plano governamental de acréscimo compulsório progressivo de biodiesel que deve ser misturado ao diesel de petróleo. Em Dezembro de 2004 foi autorizado o uso de uma mistura contendo 2 % (B2) de biodiesel, que logo passou a caráter compulsório em Janeiro de 2008 e a porcentagem de biodiesel aumentou para 3 % (B3) em Junho do mesmo ano, acarretando em uma produção aproximada de 190 milhões de litros por ano. Há ainda, a previsão de uma maior produção com a implementação de 5 % (B5) até 2013 (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2009).

O mercado mundial de biodiesel vem crescendo consideravelmente nos últimos anos, sendo o principal produtor e consumidor a União Européia (80 %), que vem fabricando o produto em larga escala desde 1992. Aproximadamente metade da capacidade produtiva da Europa está na Alemanha, que é o maior produtor (MELLO, PAULILLO & VIAN, 2007).

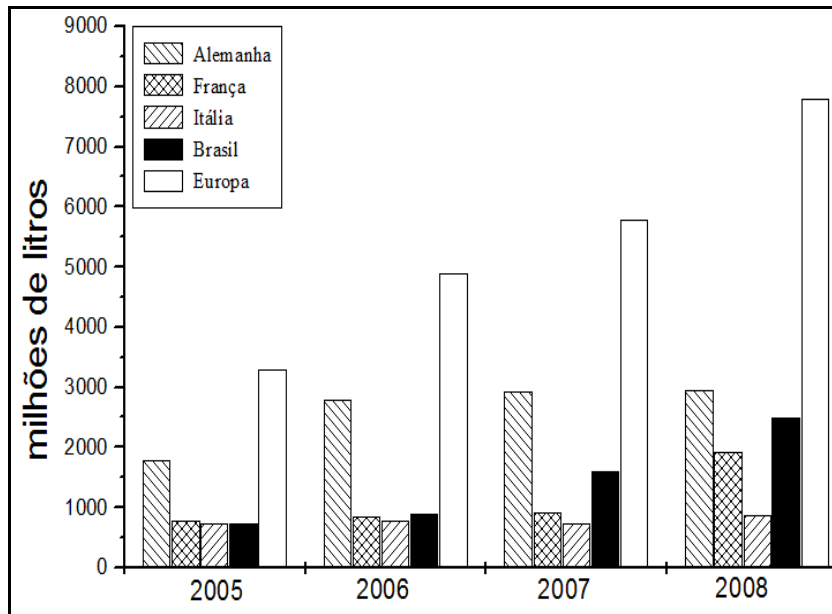


Figura 5 - Evolução mundial da produção de biodiesel (MELLO, PAULILLO & VIAN, 2007; E.B.B..., 2010; EMERGING...,2010).

O uso de 1 kg de biodiesel contribui para a redução de cerca de 3 kg de CO₂, gerando redução significativa das emissões de CO₂ (EBB..., 2010). Fatores como poluição do ar, mudanças climáticas, derramamentos de óleo, geração de resíduos tóxicos e constantes conflitos

políticos envolvendo os países do Oriente Médio, onde estão localizadas quase 80 % das reservas comprovadas de petróleo no mundo, com previsão de esgotamento nos próximos 40 a 50 anos (MELLO, PAULILLO & VIAN, 2007) geram a necessidade imediata no desenvolvimento tecnológico de fontes renováveis. A preocupação sobre o tema é um consenso e gera acordos mundiais, como o Protocolo de Quioto, que pode beneficiar o Brasil como credor de crédito de carbono.

Portanto, a manufactura de biodiesel, é consistente com a atual conjuntura, sendo que a melhor opção de álcool de cadeia curta para a reação de transesterificação para a produção de biodiesel no Brasil, ainda é discutível, pois a cadeia do etanol já está consolidada no país. Porém, a análise das vantagens técnicas do uso do metanol, indicadas na Tabela 5 revela esta preferência.

Tabela 5 - Vantagens e desvantagens do uso do metanol e etanol para a produção de biodiesel (FREITAS, 2008).

| METANOL | ETANOL |
|---|---|
| Pode ser produzido a partir da biomassa, porém é tradicionalmente um produto fóssil. | Quase toda produção brasileira é feita a partir da biomassa, e, por isso, fornece um combustível 100% renovável. |
| O consumo no processo de metanol é cerca de 45% menor do que o de etanol anidro. | Dependendo do preço da matéria-prima, o custo de produção de biodiesel etílico pode ser até 100% maior do que os do metílico. |
| A reação de transesterificação é mais rápida do que a do etanol | Os ésteres etílicos possuem maior afinidade com a glicerina, dificultando a separação. |
| Para as mesmas condições, o tempo de reação com o uso do metanol é menos da metade do necessário para o etanol. | A produção, no Brasil, já está consolidada. |
| Possui maior grau de toxicidade que o etanol | Não é tóxico como metanol. |
| É mais volátil e apresenta maior risco de incêndio. | Apresenta menor risco de incêndio. |
| O transporte é controlado pela polícia Federal, pois é usado também na fabricação de drogas. | Produz biodiesel com maior índice de cetano (usado como padrão na avaliação das propriedades ignitoras do diesel) e lubricidade se comparado ao combustível metílico. |

O Brasil se encontra em posição de destaque no cenário mundial de fontes de energia renováveis, com grande área ainda não cultivada, recursos hídricos abundantes, tropicalidade e diversidade de fontes de ácidos graxos como mamona, gordura animal, girassol, algodão, pinhão-

manso, óleo de cozinha e soja, já se observa o impacto sobre a economia do país com a geração de emprego e renda (LUCENA, 2008). Nesse contexto, vem ocorrendo a inserção no mercado de trabalho de pessoas, tanto na agricultura familiar quanto pelo aumento da indústria nacional de pesquisas e equipamentos, sendo notória a parcela de contribuição no desenvolvimento brasileiro em setores como:

- Liderança no comércio internacional de biocombustíveis - O Brasil reúne vantagens que lhe permite liderar o mercado internacional de biocombustíveis e implementar ações de promoção dos produtos energéticos derivados da agroenergia. A ampliação das exportações, além da geração de divisas, consolidarão o setor e impulsionarão o desenvolvimento do país.
- Desenvolvimento tecnológico e geração de empregos - Pesquisa e desenvolvimento de tecnologias agropecuárias e industriais integradas às cadeias produtivas da agroenergia, que proporcionem maior competitividade, agregação de valor aos produtos e redução de impactos ambientais, além da geração de empregos diretos e indiretos.
- Autonomia energética - Propicia às comunidades isoladas, aos agricultores, meios para gerar sua própria energia, em especial nas regiões remotas do território nacional, além da autonomia nacional de combustíveis.
- Desenvolvimento da agroenergia - Expansão da produção de álcool (metanol e etanol) e aproveitamento de seus respectivos resíduos.
- Desenvolvimentos regionais - Incentivo à instalação de projetos de agroenergia em regiões com oferta abundante de solo, radiação solar e mão de obra, e que apresentam baixos índices de desenvolvimento econômico.

7.1.3 Glicerol

Mesmo com as vantagens supracitadas, a produção de biodiesel inevitavelmente gera coprodutos, sendo o principal deles o glicerol, que devido à baixa demanda mundial (0,5 bilhões toneladas glicerol/ano) e baixo custo faz com que projeções indiquem um desequilíbrio econômico no setor (RIVALDI, SARROUH & FIORILO, 2007).

Nos Estados Unidos, por exemplo, o valor do glicerol bruto diminuiu de R\$1.048/tonelada em 2004 para aproximadamente R\$ 125/tonelada no ano 2006 (YAZDANI & GONZALEZ, 2007). Estima-se que a produção brasileira de biodiesel seja de 2,6 bilhões de

litros/ano em 2013 e considerando que 10 % (v/v) desta produção são de coprodutos (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2009), tem-se cerca de 260 milhões de litros de glicerol por ano.

O glicerol bruto apresenta em média teor de glicerol entre 65 a 70 % (p/p), além de diversas impurezas como álcool, monoacilglicerol, diacilglicerol, oligômeros de glicerol, polímeros, água e sabão sendo este último formado da reação de ácidos graxos livres com o excesso de catalisador (RIVALDI; SARROUH & FIORILO, 2007).

Considerando-se a tendência no uso biodiesel, dar uma finalidade para o glicerol torna-se importante para a viabilidade efetiva do biodiesel no âmbito ambiental. Além disso, caso se apresente realmente efetivo em processos biotecnológicos, seu baixo preço o torna vantajoso em relação a outros resíduos tradicionalmente utilizados como o melaço de cana-de-açúcar que no mercado mundial oscila entre R\$ 120 e 170/tonelada e o bagaço de cana R\$ 9,5 e 24/tonelada (RIVALDI; SARROUH & FIORILO, 2007).

7.1.3.1 Tratamento do glicerol para utilização biotecnológica

Em geral, o glicerol bruto é tratado inicialmente com ácido (HCl, H₂SO₄ ou H₃PO₄) até atingir pH entre 2 a 3, cujo processo tem como objetivo a liberação dos ácidos graxos e formação de sais (fosfato de sódio, na maioria dos casos). Formam-se três fases, sendo a intermediária composta principalmente por glicerol e álcool. Nesta fase, esta mistura pode alcançar certa de 80% de pureza. A solução intermediária é separada e posteriormente seu pH é ajustado até próximo a neutralidade e submetido a tratamento térmico. Estando parcialmente livre de impurezas, o glicerol pode ser utilizado como substrato de fermentação por várias espécies de micro-organismos (RIVALDI; SARROUH & FIORILO, 2007).

7.2 MALTE DE CEVADA

A malteação consiste em transformar internamente grãos de cereais, deixando-os com uma alta concentração de enzimas que posteriormente reduzirão o amido em mono, di e oligossacarídeos, que por sua vez serão as fontes de carbono das leveduras no processo

fermentativo. Além disso, a composição do malte utilizado na formulação da cerveja proporciona aromas, sabores característicos e cor da bebida. O principal cereal malteado utilizado na fabricação da cerveja é a cevada que contem carboidratos (59%), proteínas (10%), cinzas (1,7%) (FUJITA & FIGUEROA, 2003) e, portanto, com possibilidade de ser utilizada em processos biotecnológicos.

No processo cervejeiro, os resíduos sólidos são gerados principalmente nas etapas de filtragem, envase e tratamento de água e efluentes líquidos. Os principais resíduos sólidos são aqueles oriundos do aproveitamento do conteúdo dos grãos de malte, constituídos de restos de casca e polpa dos grãos, misturados, em suspensão ou dissolvidos no mosto (CANADÁ ENVIRONMENT, 1997; UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME/ INDUSTRY AND ENVIRONMENT, 1996).

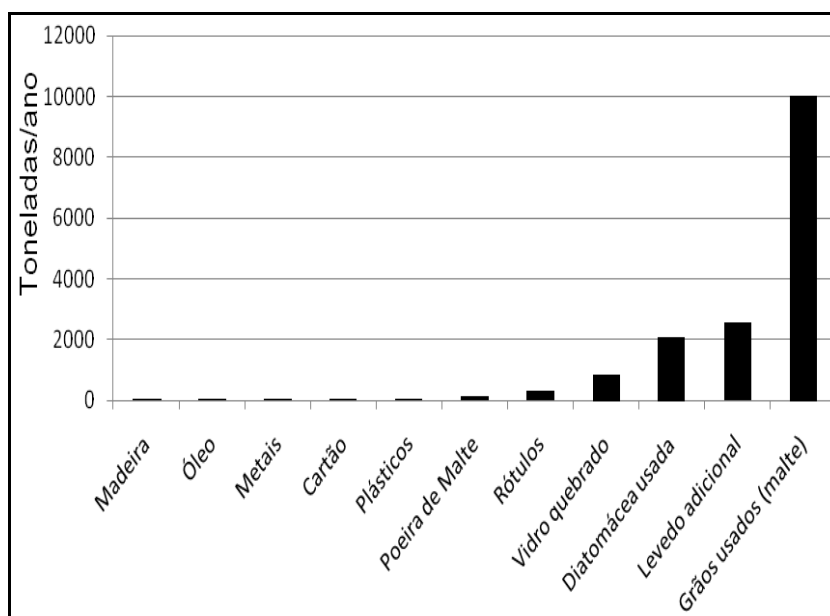


Figura 6 - Média de geração de resíduos em uma cervejaria de 10⁶ h.L. cerveja/ano (EUROPEAN COMMISSION, 2003).

7.3 MANIPUEIRA

A manipueira é o resíduo líquido originado da prensagem das raízes raladas da mandioca para a produção de farinha, representando cerca de 30 % da massa da matéria-prima (BARROS, 2007).

A manipueira possui consideráveis teores de manganês, ferro, zinco, cobre e nitrogênio que são importantes na produção de surfactina (COOPER *et al.*, 1981) além conter carboidratos simples e complexos. Trata-se de um composto com alto teor de nutrientes.

A produção de mandioca situa-se entre os nove primeiros produtos agrícolas do Brasil em termos de área cultivada, e o sexto em valor de produção (CENI *et al.*, 2009). Em 2005, a produção mundial de raízes de mandioca foi de aproximadamente 204 milhões de toneladas (CENI *et al.*, 2009), sendo que o Brasil participou com mais de 15 % da produção mundial, aproximadamente, 26,6 milhões de toneladas (BARROS, 2007).

A maioria das farinheiras atualmente não utiliza a manipueira, descartando-a diretamente em leitos ou realizando tratamentos brandos como decantação, para diminuir o alto impacto ambiental, sendo os resíduos sólidos depois da secagem aplicados principalmente como fertilizantes ou alimentação animal (SRIROTH *et al.*, 2000).

Tabela 6 - Composição centesimal da manipueira (NITSCHKE & PASTORE, 2003).

| Componente | Concentração | Componente | Concentração |
|--------------------------|---------------------|-------------------|---------------------|
| Sólidos totais (g/L) | 62 | Cálcio (mg/L) | 293 |
| DQO (g/L) | 55,8 | Magnésio (mg/L) | 519 |
| Amido (%) | 41,45 | Enxofre (mg/L) | 154 |
| Açúcares redutores (g/L) | 23,3 | Ferro (mg/L) | 7,8 |
| Nitrogênio total (g/L) | 2,08 | Zinco (mg/L) | 2,8 |
| Fósforo (mg/L) | 245 | Manganês (mg/L) | 1,7 |
| Potássio (mg/L) | 3472 | Cobre (mg/L) | 1,0 |

A literatura tem relatado que a manipueira é um potencial meio de cultura que pode ser utilizado em diversos processos biotecnológicos para a obtenção de álcool (SRIROTH *et al.*, 2000), biomassa (SRIROTH *et al.*, 2000; BARROS, 2007) bioaromas frutais (DAMASCENO *et al.*, 2003), biotransformação (MARÓSTICA & PASTORE, 2006), produção de metano RIBAS & BARANA, (2003), insumo agrícola FILHO, (2002) e biossurfactantes (BARROS, 2007; BARROS, QUADROS, & PASTORE, 2008; NITSCHKE & PASTORE, 2003). Seu uso é conveniente devido à mandioca ser originária e cultivável em todo Brasil ao longo do ano, garantindo o suprimento de matéria-prima, além do benefício ambiental.

CONCLUSÃO

Os diferentes teores de nutrientes encontrados em resíduos agroindustriais possibilitam a sua utilização como complemento para a suplementação do requerimento metabólico microbiano em processos biotecnológicos. Essa conjuntura gera uma animadora expectativa sobre o Brasil, que conta com grande diversidade e quantidade de recursos a serem explorados e pesquisados.

Aliado às vantagens decorridas no texto, há o benefício da utilização de resíduos ou coprodutos agroindustriais, que podem ser um problema ambiental e amortizam o custo de produção como, por exemplo, os custos do meio de cultura que representam aproximadamente 10-30 % do total da produção dos biosurfactantes (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

Portanto, a tendência mercadológica por sistemas sustentáveis faz com que, possivelmente, de forma unilateral, os avanços biotecnológicos busquem novos substratos ou misturas dos mesmos com o menor custo, além da variação de parâmetros nos processos fermentativos como temperatura, pH, rotação, aeração, fermentação mista, micro-organismos etc, e conseqüente melhorias de rendimentos ou novos produtos para uma competição econômica com os demais meios de produção.

OBRAS CONSULTADAS

AGENCIAS NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/104_99.htm>
[Acesso em: 18 de Julho de 2010].

ANWAR, A.; SALEEMUDDIN, M. - Alkailine proteases: a review. **Bioresource technology**, v. 64, p. 175-183, 1998.

ASSUMPÇÃO, E. **Nota breve sobre pateteamento de Enzimas industriais**. INPI, 1999.

ARASHIRO, E. Y.; DEMARQUETTE, N. R. - Use of the pendant drop method to measure interfacial tension between molten polymers. **Materials Research**. v. 2, n. 1, p. 23-32, 1999.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. - Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 31, p. 488-494, 1968.

ATTWOOD, D.; FLORENCE, A. T. - Princípios físico-químicos em farmácia. **São Paulo- SP, (Ed) Edusp**, Capítulos 6 e 7, 2003.

ÁVILA FILHO, S.; MACHADO, A. S.; SANTOS, E. P. - Purificação da Glicerina Bruta Vegetal. Disponível em:
<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congressso2006/CoProdutos/Purificacao4.pdf>
[Acesso em: 19 de Abril 2010]

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. - Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v.30, n.2, p.409-414, 2007.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. - Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**., v.28, n.4, p.979-985, 2008.

BARTOWSKY, E. J; HENSCHKE, P. A. - The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. **Internacional Journal of Food Microbiology**, v. 96, p. 235-252, 2004.

BIODIESEL - PACIFIC BIODIESEL. HISTORY OF BIODIESEL. Disponível em:
<http://www.biodiesel.com/index.php/biodiesel/history_of_biodiesel_fuel>
[Acesso em: 01 de Julho de 2010]

BERGER, R. G. - Aroma biotechnology. **Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag.** p. 5 -240, 1995.

BODOUR, A. A.; MILLER-MAIER, M. R. - Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. **Journal of Microbiological Methods.** v.32, p. 273–280, 1998.

BON, E. P. S.; FERREIRA, M. A.; CORVO, M. L. - ENZIMAS EM BIOTECNOLOGIA PRODUÇÃO, APLICAÇÃO E MERCADO, **Rio de Janeiro: Interciência;** Capítulos 1, 4, 5, 8, 9, 11, 14, 19 e 20, 2008.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. - Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology.**, v.50, n.3, p.520-529, 1998.

CANADA/ ENVIRONMENT CANADA. - Technical pollution prevention guide for brewery and winery operations in the lower frasier basin, **Environment Canada,** Vancouver, 1997.

CARRILLO, P.G.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S.I.; GIULIETTI, A.M. - Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World journal of Microbiology and biotechnology, oxford,** v.12, p.82-84, 1996.

CARVALHO, D, S. - **Aceleração do Processo Fermentativo de Chope tipo Pilsen.** f.67. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, Pelotas, Brasil, 2005).

CAVALERO, D. A.; COOPER, D. G. - The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. **Journal of Biotechnology.** v.103, n.1, p.31-41, 2003.

CENI, G. C.; COLET, R.; PERUZZOLO, M.; WITSCHINSKI, F.; TOMICKI, L.; BARRIQUELLO, A. L.; VALDUGA, E. - Avaliação de componentes nutricionais de cultivares de mandioca (*M ANIHOT ESCULENTA* CRANTZ). **Alimentos e.Nutrição,** Araraquara. v.20, n.1, p. 107-111, jan./mar. 2009.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. - Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environment Microbiology**. v.42, p. 408-412, 1981.

COSTA, G. A. N. - **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações**. f.87. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil, 2005.

DAMASCENO, S.; CEREDA, M. P.; PASTORE, G. M.; OLIVEIRA, J. G. - Production of volatile compounds by *Geotrichum fragans* using cassava wastewater as substrate. **Process Biochemistry**. v.39, p. 411-414, 2003.

EBB - European Biodiesel Board. Statistics. The EU biodiesel industry. Disponível em: <<http://www.ebb-eu.org/stats.php>>
[Acesso em: 30 de Junho de 2010]

EMERGING. Disponível em: <<http://www.emergingarkets.com/biodiesel/swf/US%20Biodiesel%20Production%20and%20Capacity.html>>
[Acesso em: 19 de Abril 2010]

EUROPEAN COMMISSION; DIRECTORATE GENERAL JRC- JOINT RESEARCH CENTRE; INSTITUTE FOR PROSPECTIVE STUDIES; EUROPEAN INTEGRATED POLLUTION PREVENTION AND CONTROL (IPPC) BUREAU, **Draft Reference Document on Best Available Techniques in the Food, Drink and Milk Industries**, IPPC, Sevilha, 2003.

FRANCO, M. R. B. – Aroma e Sabor dos Alimentos: Temas Atuais. **São Paulo: Livraria Varela**. 2004.

FERNADEZ, L. P. - **Produção de biossurfactantes por *Bacillus sp.* Em condições anaeróbicas**. f.68. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Ambiental) – Universidade Federal de Viçosa, Faculdade de Engenharia de Agrícola, Viçosa, Brasil, 2007.

FILHO, J. J. P. - Produção de manipeira em pó para utilização como insumo agrícola: defensivo e fertilizante. **C05F 5/00. Br. PI0203896-0**. 18 de Set de 2002.

FUJITA, H. A.; FIGUEROA, M. O. R. - Composição centesimal e teor de β -glucanas em cereais e derivados. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n. 2, 2003.

GARDINI, F.; LANCIOTTI, R.; GUERZONI, M. E.; TORRIANI, S. - Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. **International Dairy Journal**, v.9, p. 125-134, 1999.

GRAU, A.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; PEYPOUX, F.; ORTIZ, A. - Aggregational behavior of aqueous dispersions of the antifungal lipopeptide iturin A. **Peptides**. v.22, p 1-5, 2001.

GOTTSCHALK, G. - Bacterial Metabolism. Second Edition. **Springer-Verlag**, Capítulos 1, 2, 1988.

HETTINGA, D. H. ; REINBOLD, G. W. -. Propionic-Acid Bacteria - a review .2. Metabolism. **Journal of Milk Food Technology**, v. 35, p. 358-372, 1972.

IWASE, N.; RAHMAN, M. S.; ANO, T. - Production of iturin A homologues under different culture conditions. **Journal of Environmental Sciences**. v.21, p. 28-32, 2009.

JYOTI, V.; AVNEET, K. - Yeast lipases: **Enzyme purification, biochemical properties and gene Cloning**. Electronic Journal of Biotechnology. v.9, n.1, p.69-85, 2006.

JENNY, K.; DELTRIEU, V.; KAPPELI, O. – Lipopeptide production by *Bacillus licheniformis*. In: Kosaric N (ed) **Biosurfactants**. Dekker. New York, p. 135, 1993.

KAKINUMA, M.; HORI, M.; ISONO, TAMURA, G.; ARIMA, K. - Determination of aminoacids sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced for *Bacillus subtilis*. **Agriculture Biological Chemistry**. v.33, p.971-972, 1969a.

KAKINUMA, A.; HORI, M.; SUGIRO, H.; YOSHIDA, I.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K. - Determination of the location of lactone ring in surfactin. **Agricultural and Biological Chemistry**. v.33, p.1523-1524, 1969b.

KAKINUMA, A.; OUCHIDA, A.; SHIMA, T.; SUGIRO, H; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K. - Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.33, p.1669-1671, 1969c.

KAKINUMA, A.; SUGIRO, H.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K. - Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v.33, p.973-976. 1969d.

KAMEDA, Y.; OUIHARA, S.; MATSUI, K. - Antitumor activity of *Bacillus natto*. V. Isolation and characterization of surfactin in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 2311. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. v. 22, n. 4, p. 938-944, 1974.

KARANTH, N. G.K.; DEO, P. G.; VEENANADIG, N. K. - Microbial production of biosurfactants and their importance. **Current science**. v. 37, p. 116-126, 1999.

KLUGE, B; VATER , J; SALNIKOW, J; ECKART, K. - Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **FEBS Lett**. v. 231, p. 107–110, 1988.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; SAINI,V.S. - **Biosurfactant and technology**. New York. Marcel Dekker, v. 25, p. 342. 1987.

KRAAI, G. N.; SCHUURA,B.; VAN ZWOLA, F.; VAN DE BOVENKAMPA, H.H.; HEERES, H. J. - Novel highly integrated biodiesel production technology in a centrifugal contactor separator device. **Chemical Engineering Journal**, v. 154, p. 384- 389, 2009.

KRINGS, U.; BERGER, R. G. – Biotechnological production of flavours and fragrances. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 49, n. 1, p. 1-8, 1998.

KURT, H. M. - The past and present of starch chemistry. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.8, n.11, p.405-420, 1952.

LUCENA, T. K. - **IMPACTOS DO USO DE BODIESEL NA ECONOMIA BRASILEIRA: Uma Análise pelo Modelo Insumo-Produto**. f.93. Dissertação (Mestrado em Ciências Econômicas) – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2008.

MABROUK, S. S.; HASHEM, A. M.; EL-SHAYEB, N. M. A.; ISMAIL, A. M. S.; ABDEL-FATTAH, A. F. - Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. **Bioresource technology**, v. 69, p.155-159, 1999.

MAGET-DANA, R.; THIMON, L.; PEYPOUX, F.; PTAK, M. - Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. **Biochimie**, v. 74, p. 1047-1051, 1992.

MARIOTTO, J. R - **Produção de acetoina e 2,3-butanodiol por *Bacillus polymyxa***. f.75. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2007.

MARTINS, F. M. – **Estudo do processo de encapsulação do bioaroma de gongorzola em β -Ciclodextrina e em Lipossomas**. f.174. Tese (Doutorado em Processos biotecnológicos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil, 2003

MARÓSTICA JR, M. R.; PASTORE, G. M. - Production of R-(+)-terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. **Food Chemistry**. v.101, p. 345-350, 2007.

MELLO, F. O. T.; PAULILLO, L. F.; VIAN, C. E. F. - O BIODIESEL NO BRASIL: panorama, perspectivas e desafios. **Informações Econômicas, SP**. v.37, n.1. 2007.

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA. Disponível em:
<http://sigcti.mct.gov.br/fundos/rel/ctl/ctl.php?act=nav.prj_vis&idp=10478>
[Acesso em: 26 de Maio de 2009]

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - Diretrizes de Política de Agroenergia, 2006-2011[online].Brasília, DF:Ministério de Minas e Energia; 2005. Disponível em:
<[http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/programa/agroenergia/Diretrizes de Politica d e Agroenergia.pdf](http://www.mme.gov.br/mme/galerias/arquivos/programa/agroenergia/Diretrizes_de_Politica_d_e_Agroenergia.pdf)>
[Acesso em: 20 de Maio 2009]

MULLIGAN, C. N. - Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p.183-198, 2004.

MULLIGAN C. N.; COOPER D.; NEUFELD R. - Selection of microbes producing biosurfactants in media without hydrocarbons. **Journal of Fermentation Technology.**, v.62, n.4. p.311–314., 1984.

MULLIGAN, C.N.; MAHMOURIDES, G.; GIBBS, B. F. - The influence of phosphate metabolism on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v.12, n.3-4, p.199-209, 1989.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. – Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil.: **Engineering Geology**. v.60, n.1-4, p.371-380, 2001.

NAKANO, M. M.; HULETT, F. M. - Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation. **Microbiology Letters**. v.157, n.1, p. 1-7, 1997.

NITSCHKE, M. - **Produção e caracterização de biosurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato**. f.88. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. - Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v. 106, p. 295-302, 2003.

NOHA H. Y.; KATHLEEN E. D.; DAVID P. N.; KRISTEN, N. S.; ROY M. K.; MICHAEL J. M. - Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal of Microbiological Methods**. v. 56, p.339-347, 2004.

PAWLISZYN, J.; PAWLISZYN, B.; PAWLISZYN, M. - Solid Phase Microextraction (SPME). **The chemical educator**. n. 4, v. 2, p. 1-7, 1997.

PERNA, R. F. - **Fracionamento de surfactina em coluna de bolhas e espuma**. f.142. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química - Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química, Campinas, Brasil, 2009.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. - Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.51, p. 553-563, 1999.

PLANALTO FEDERAL. Disponível em:

<http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/ato2004-2006/2005/Lei/L11097.htm>

[Acesso em 27 de Junho de 2010]

PRINCE, R. C. - Petroleum spill bioremediation in marine environments. **Critical Reviews in Microbiology**, v.19, p.217-242, 1993.

RECEITA FEDERAL. Disponível em:

<<http://www.receita.fazenda.gov.br/Legislacao/Decretos/2004/dec5298.htm>>

[Acesso em 28 de Julho de 2010]

RIBAS, M. M. F.; BARANA, A. C. - Start-up adjustment of a plug-flow digester for cassava wastewater (manipueira) treatment. **Science Agriculture**.v.60, p. 223-229, 2003.

RIBEIRO, F. - **Estudo das transformações químicas da glicerina sob irradiação de micro-ondas visando seu reaproveitamento como aditivo ao biodiesel**. f...113.Dissertação (Mestrado em Física Ambiental) – Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, Brasil, 2009.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R - Glicerol de biodiesel - Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel, **Biociência**, n. 37, p. 44 – 51, 2007.

SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL G. - Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Applied Biochemistry**. n. 12, v.4, p. 370-375, 1990.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V - Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus* spp. para conservação e processamento de alimentos. **Alimentos e Nutrição.**, v.16, n.4, p. 403-411, 2005.

SCHULZ, D.; PASSERI, A.; SCHMIDT, M.; LANG, S.; WAGNER F.; WRAY, V.; GUNKEL, W. - Marine biosurfactants. Screening for biosurfactants among crude-oil degrading marine microorganisms from the North-Sea. **Z Naturforsch (C)**. v. 46, p.197–203, 1991.

SHEPPARD, J. D.; COOPER, D. G. - The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 1, v. 35, p. 72-76, 2004.

SIGMA. Disponível em:

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=pt&N4=S3523|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC

[Acesso em 10 de Março de 2011]

SILVA, C. F. - **Produção biológica de surfactant por *Serratia marcescens***. f.92. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil, 2002.

SRIROTH, K.; CHOLLAKUP, R.; CHOTINEERANAT, S.; PIYACHOMKWAN, K. ; OATES, G. C. - Processing of cassava waste for improved biomass utilization. **Bioresource Technology**, v.71, p. 63-69, 2000.

STACHELHAUS, T.; MOOTZ, H. D.; MARAHIEL, M. A. - Nonribosomal assembly of peptide antibiotics on modular protein templates. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cell. **American society for microbiology**. Washinton, ASM Press, 2002.

TSUKAGOSHI, N.; TAMURA, G.; ARIMA, K. - A novel protoplast-bursting factor (surfactin) obtained from *Bacillus subtilis* IAM 1213. I. The effects of surfactin on *Bacillus megaterium* KM. **BBA - Biomembranes**. v. 196, n. 2, p. 204-210, 1970.

UNEP/ IE- UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME/ INDUSTRY AND ENVIRONMENT. - Environmental management in the brewing industry, **UNEP Technical Report Series n°33**, UNEP, Paris, 1996.

VOLLENBROICH, D.; OZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R. M.; PAULI, G. - Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, v. 25, p. 289-297, 1997.

WOLGANG, L.; KLAUS, H.; KARLHEINZ, D. - Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospect. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 1, p. 1-8, 2005.

YAZDANI, S. S.; GONZALEZ, R. - Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Current Opinion in Biotechnology**. n. 3, v. 18, p. 213-219, 2007.

CAPÍTULO 2:
**SELEÇÃO DA LINHAGEM DE *BACILLUS SUBTILIS*, E ESTUDOS DE MEIOS
DE CULTURA PARA A PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE**

INTRODUÇÃO

As formulações dos meios sintéticos utilizados para a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* descritos na literatura apresentam diversidade de composição. Basicamente, os íons utilizados são Ca^{+2} , Zn^{+2} , NH_4^+ , NO_3^- , NH_4^+ , Mg^{+2} , Fe^{+3} e Mn^{+2} (COOPER *et al.*, 1981; NITSCHKE, FERRAZ & PASTORE, 2004; ROBERT *et al.*, 1989; SHEPPARD & COOPER, 1991). Entretanto, quando as fontes diferem, os íons associados podem influenciar na bioprodução e, portanto, deturpar os resultados. Por exemplo, os compostos CaF_2 , CaCl_2 , CaH_2 , Ca(OH)_2 , CaI_2 , $\text{Ca(NO}_3)_2$, podem ser utilizados como fontes de cálcio. Assim, o Ca(OH)_2 alterará o pH para basicidade, porém CaSO_4 acidificará o meio. Além disso, caso o CaI_2 seja empregado ocorrerá fornecimento concomitante de iodo, que pode ser um composto significativo no processo. Esta questão se torna mais complexa quando são avaliados simultaneamente todos os nutrientes, parâmetros do processo, além da correlação entre os mesmos, resultando em problemas de repetibilidade.

Alternativa às dificuldades citadas acima, a utilização de meios de cultura complexos podem suprir os requerimentos microbianos como a maniveira que contém fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, ferro, zinco, manganês, cobre, boro, nitrogênio e carbono (NITSCHKE & PASTORE, 2003) ou malte de cevada com proteínas, carboidratos e cinzas (FUJITA & FIGUEROA, 2003).

A escolha do micro-organismo é fundamental para a obtenção de altos rendimentos, os principais gêneros produtores de biossurfactantes são *Pseudomonas* e *Bacillus* (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998; DAS, MUKHERJEE & SEN, 2009), este apresenta baixo requerimento nutricional, alta taxa reprodutiva, esporulado e produtor de enzimas (BANAT, 1993; CAMEOTRA & MAKKAR 1998; DAS, MUKHERJEE & SEN, 2009; GHOJAVAND *et al.*, 2008).

Produto de alto valor agregado, a surfactina produzida por *Bacillus subtilis* com pureza > 98 % é comercializada em média à R\$ 66,17/mg e a iturina A R\$ 434/mg (SIGMA,...2011). Entretanto, atualmente os biossurfactantes não são competitivos economicamente com seu equivalente sintético devido principalmente aos baixos rendimentos, custos de produção e

purificação, ainda que os avanços tecnológicos dos últimos anos tenham resultado em rendimentos entre 10 à 20 vezes maiores (MUTHUSAMY, *et al.*, 2008).

Portanto, este trabalho teve como objetivo elaborar um meio de cultura adequado para a produção de biossurfactantes, e que, preferencialmente não contivesse fonte de carbono, além do glicerol.

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 MEIOS DE CULTURA

1.1.1 Composição do meio sintético

As concentrações e fontes do meio sintético para a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* foram baseadas em resultados descritos na literatura (NASCIMENTO, 2007; COOPER *et al.*, 1981; ASGHER *et al.*, 2007, SHARIFF *et al.*, 2007). Entretanto, devido às diferentes concentrações e fontes utilizadas em cada um dos trabalhos supracitados, foram estabelecidos teores próximos aos mesmos e fontes de acordo com a disponibilidade do laboratório de bioaromas.

Tabela 1 - Meio mineral sintético, fonte de interesse e concentração.

| Fonte | Fonte de interesse | Concentração | Fonte | Fonte de interesse | Concentração |
|---|---|--------------|---------------------|--------------------|--------------|
| CaCl ₂ | Ca ⁺² | 2 mM | MgSO ₄ | Mg ⁺² | 2 mM |
| ZnSO ₄ | Zn ⁺² | 1 mM | FeCl _{3,6} | Fe ⁺³ | 0,1 mM |
| NH ₄ NO ₃ | NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻ | 2,0 mM | MnSO ₄ | Mn ⁺² | 1 mM |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | NH ₄ ⁺ | 0,5 mM | | | |

Como fonte de carbono, foi utilizado glicerol 1 % (m/v) e com o objetivo de comparar a cinética de produção de tensoativos em relação à outra fonte de carbono, foi utilizada a glicose na mesma concentração.

O meio foi ajustado para pH 7,0 com NaOH 0,05N, para o melhor desenvolvimento do *Bacillus* e para evitar a precipitação do biosurfactante.

1.1.2 Otimização do meio mineral para a fermentação em shaker da linhagem selecionada

Para a identificação das possíveis variáveis significativas na produção de biossurfactantes foi utilizada, neste trabalho, uma estratégia sequencial de planejamentos que consistiu de dois delineamentos 2^{8-4} e *Plackett & Burman* (NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2002; RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Delineamento experimental:

Para a identificação das possíveis variáveis não significativas, foram realizados experimentos com delineamento fatorial fracionado 2^{8-4} em um total de 16 experimentos (NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2002). As variáveis estudadas foram: $MgSO_4$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, $CaCl_2$, $ZnSO_4$, $MnSO_4$, NH_4NO_3 , NH_4SO_4 . Na Tabela 2, é apresentada a faixa de valores investigados para cada variável do delineamento, enquanto a Tabela 9 apresenta a matriz do planejamento com as respostas, nesse caso, a medida de tensão superficial (mN/m) do meio de cultura ao final do período de 24 horas de incubação. Os resultados foram analisados no programa *Statistica* TM 7.0 no qual foi realizada uma estimativa dos efeitos das variáveis sobre a resposta analisada.

Tabela 2 - Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado 2^{8-4} .

| Variáveis | | Níveis | |
|--|----------------|--------|------|
| | | - | + |
| Glicerol % (m/v) | X ₁ | 0,8 | 1,2 |
| MgSO ₄ (mM) | X ₂ | 1,6 | 2,4 |
| FeCl ₃ .6H ₂ O (mM) | X ₃ | 0,08 | 0,12 |
| CaCl ₂ (mM) | X ₄ | 1,6 | 2,4 |
| ZnSO ₄ (mM) | X ₅ | 0,8 | 1,2 |
| MnSO ₄ (mM) | X ₆ | 0,8 | 1,2 |
| NH ₄ NO ₃ (mM) | X ₇ | 1,6 | 2,4 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (mM) | X ₈ | 0,4 | 0,6 |

Para o segundo delineamento experimental *Plackett & Burman*, foram realizados 16 experimentos, dos quais 4 são repetições no ponto central (RODRIGUES & IEMMA, 2005). As variáveis estudadas foram as mesmas que no delimento 2^{8-4} . A Tabela 3 apresenta os valores usados em cada nível das variáveis, enquanto a Tabela 10 apresenta a matriz do planejamento com as respostas avaliadas, neste caso a tensão superficial (mN/m) do meio de cultura ao final do período de 24 horas de incubação. Novamente os resultados foram analisados no programa *Statistica* TM 7.0 em que foi realizada uma estimativa dos efeitos das variáveis sobre a resposta analisada.

Tabela 3 - Valores utilizados no delineamento experimental *Plackett & Burman* 16 ensaios e mais 4 repetições no ponto central.

| Variáveis | | Níveis | | |
|--|----------------|--------|------|------|
| | | - | 0 | + |
| Glicerol % (m/v) | x ₁ | 0,0 | 0,4 | 0,8 |
| MgSO ₄ (mM) | x ₂ | 0,0 | 0,8 | 1,6 |
| FeCl ₃ .6H ₂ O (mM) | x ₃ | 0,0 | 0,04 | 0,08 |
| CaCl ₂ (mM) | x ₄ | 0,0 | 0,8 | 1,6 |
| ZnSO ₄ (mM) | x ₅ | 0,0 | 0,4 | 0,8 |
| MnSO ₄ (mM) | x ₆ | 0,0 | 0,4 | 0,8 |
| NH ₄ NO ₃ (mM) | x ₇ | 1,6 | 2,4 | 3,2 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (mM) | x ₈ | 0,0 | 0,2 | 0,4 |

1.1.3 Utilização de resíduos agroindustriais e meio sintético, adicionados ao glicerol para aumentar a produção de biossurfactantes

Os meios utilizados nos ensaios foram manipueira, malte de cevada, peptona e meio mineral sintético.

1.1.3.1 Tratamentos

1.1.3.1.1 Manipueira

A manipueira foi fervida com o objetivo de retirar traços de cianetos e gelatinizar o amido. Em seguida foi centrifugada a $15,68 \times 10^3$ g por 10 minutos e 5 °C (Hitachi, CR21GII) sendo o sobrenadante utilizado nos ensaios de acordo com BARROS *et al.*, (2008) e NITSCHKE, (2004).

1.1.3.1.2 Malte de cevada

O malte de cevada foi obtido junto a uma indústria cervejeira. Este resíduo é oriundo do processo pós fermentativo da produção, tendo sido seco em temperatura ambiente. O teste com o mesmo objetivou fornecer aminoácidos, vitaminas, minerais e carboidratos, de maneira suplementar para a linhagem LB2b.

Tabela 4 – Substratos utilizados e suas respectivas concentrações no meio de cultura para a produção de biossurfactantes.

| Fonte | Concentração |
|-----------------|--------------|
| Manipueira | 100 % (v/v) |
| Malte de cevada | 1 % (m/v) |
| Meio Mineral | 100 % (v/v) |
| Peptona | 1 % (m/v) |
| Glicerol | 1 % (v/v) |

Tabela 5 - Concentração dos sais do meio mineral, após otimização.

| Fonte | Concentração |
|--------------------------------------|--------------|
| MgSO ₄ | 1,6 mM |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | 0,08 mM |
| CaCl ₂ | 1,6 mM |
| ZnSO ₄ | 0,8 mM |
| MnSO ₄ | 0,8 mM |
| NH ₄ NO ₃ | 3,0 mM |
| NH ₄ SO ₄ | 0,5 mM |

Os 31 ensaios foram realizados, com todas as possibilidades de interações entre os 5 fatores manipulada, glicerol, meio mineral, malte de cevada e peptona, sendo as respostas obtidas por meio da medida da tensão superficial do meio de cultura.

1.2 CULTURAS UTILIZADAS

Foram utilizadas as seguintes linhagens de *Bacillus subtilis*: LB1a, LB114, LB117, LB5a, LB2a, LB157, LB2b, LB115, LB262 e ATCC21332, pertencentes à coleção do Laboratório de Bioaromas, DCA/FEA/Unicamp.

1.2.1 Seleção da linhagem

Os resultados das medidas de tensão superficial de cada um dos ensaios realizados com o meio sintético (glicerol e glicose para 24 e 48 horas) foram examinados através da análise de variância (ANOVA) para um único fator, com o objetivo de verificar a existência de diferenças significativas nas médias entre as tensões superficiais de cada linhagem.

Em seguida, foi realizado o teste de comparação múltipla de médias (Tukey) para definir se há ou não diferença significativa entre as amostras.

1.3 PRESERVAÇÃO DAS LINHAGENS E PREPARO DO INÓCULO

As culturas foram mantidas em tubos de ágar nutriente inclinado sob refrigeração (4 a 6 °C) e em períodos regulares, repicadas para outros tubos e placas de ágar nutriente, incubados a 30 °C por 24 h e armazenados.

Os inóculos foram preparados a partir de alças de culturas retiradas de placas de ágar nutriente, contendo as linhagem de *Bacillus* e transferidas para erlenmeyers contendo 50 mL de caldo nutriente (peptona bacteriológica 5 g.L⁻¹ (Himedia) e extrato de carne 3 g.L⁻¹(Biolife) estéril. A seguir, foram incubados à 150 rpm e 30 °C, durante 24 h, em agitador rotatório (Shaker Tecnal Te-480). Após este período, foi realizada a diluição com caldo nutritivo estéril até se obter

uma densidade óptica de 0,5 medida a 660 nm (ROCHA *et al.*, 2007). Posteriormente, foram retiradas alíquotas de 3,5 mL (7% v/v do meio), que inocularam os erlenmeyers contendo 50 mL de meios mineral.

1.4 INCUBAÇÃO

Os erlenmeyers com os meios sintéticos, contendo os inóculos, foram incubados em agitador rotatório (shaker Tecnal TE-480) a 30 °C e agitação de 150 rpm por até 72 horas. Após o período de incubação, os substratos foram centrifugados à $10,08 \times 10^3$ g por 10 minutos e 5 °C (Beckman Coulter, Alegria X-22r), para a eliminação de células, seguida da respectiva medida de tensão superficial.

1.5 CURVA FERMENTATIVA E SELEÇÃO DE LINHAGEM

1.5.1 Medidas de tensão

As amostras de cada uma das linhagens foram coletadas (15 mL) em intervalos de 24 até 72 horas, sendo inicialmente centrifugadas a $10,08 \times 10^3$ g por 10 minutos e 5 °C (Beckman Coulter, Alegria X-22r). As medidas de tensão superficial foram determinadas com o sobrenadante pelo método da placa (KRÜSS - Processor Tensiometer, K12) até um desvio padrão menor que 0,2 ou 50 repetições para cada análise.

1.6 INDICADOR DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

1.6.1 Ensaio com ágar sangue

Placas contendo ágar sangue (Oxoid) adicionado de 5 % (v/v) de sangue de carneiro desfibrinado (Laborclin), foram inoculadas em três pontos equidistantes com a agulha de platina com a linhagem selecionada e incubadas em estufa a 30 °C para visualização de halos (indicam hemólise dos eritrócitos, podendo esta atividade ser originada por biossurfactantes) ao final de 72 horas pós inoculação (BANAT, 1993; CARRILO *et al.*, 1996, SILVA, 2002).

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 SELEÇÃO DA LINHAGEM

Encontrar um meio sintético, sem a presença de componentes complexos é tarefa árdua. COOPER *et al.*, (1981), por exemplo, encontraram bons resultados para a produção de biossurfactantes com o meio mineral suplementado com glicose. GHOJAVAND, *et al.*, (2008) relataram produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* somente com meio mineral e sacarose. Entretanto, ambos os trabalhos utilizaram diversos tipos de sais, sendo alguns possivelmente não necessários. Além disso, esses requerimentos metabólicos podem diferir das do micro-organismo em questão.

Na literatura normalmente são encontrados trabalhos que focam na exatidão dos componentes minerais do meio de cultura. Entretanto, adicionam meios complexos como extrato de levedura, peptona, extrato de carne etc., que então podem distorcer o real fornecimento desses nutrientes no processo fermentativo, além das possibilidades de tais compostos serem utilizados como fonte de carbono, como ilustrado pelos trabalhos de MUTALIK, *et al.*, (2008); VIEIRA *et al.*, (2005) e SILVA, (2002).

As linhagens não produziram significativas quantidades de biossurfactantes devido à proximidade dos valores de tensão superficial aos do controle (rodapé Tabela 6).

As fontes e teores dos sais, utilizados para a formulação do meio sintético mineral, foram baseadas nos trabalhos de COOPER *et al.*, (1981), NITSCHKE, FERRAZ & PASTORE, (2004), ROBERT *et al.*, (1989), SHEPPARD & COOPER, (1991), objetivando a utilização do menor número de minerais. Provavelmente, os resultados obtidos decorreram devido à falta de algum(ns) nutriente essencial para o metabolismo dos micro-organismos, e consequente ausência de co-fatores enzimáticos, durante a biossíntese da surfactina.

COOPER *et al.*, (1981) reportaram a significância na produção de surfactina por meio da concentração micelar diluída 1/10 de sais como $MnSO_4$, $FeSO_4$ e $Fe_2(SO_4)_3$. Outros sais como $MgSO_4$, $CaCl_2$, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 e $NaNO_3$ não tiveram efeito sobre a biomassa ou produção de surfactina. O $ZnSO_4$ suprimiu o crescimento do *Bacillus* e os sais $CuSO_4$, $NiSO_4$, $CoSO_4$, $Al_2(SO_4)_3$ causaram inibição.

Com relação ao ferro, o meio mineral sintético, Tabela 1, conteve $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,1 mM), enquanto COOPER *et al.*, (1981) utilizaram FeSO_4 (0,004 mM). Portanto considerando somente os íons ferro, a suplementação deste último foi menor. Além disso, as fontes utilizadas são diferentes Fe^{+3} e Fe^{+2} , respectivamente, e a falta destes íons divalentes pode ser uma das razões pela qual não se obteve valores significativos de produção de surfactina com o meio mineral sintético, bem qual outro fonte de mineral essencial para as vias metabólicas de produção de surfactina.

As médias da tensões superficiais dos ensaios com todas as linhagem e respectivos tempos de fermentação e fonte de carbono utilizada estão apresentadas na Tabela 6, com os valores de desvio padrão indicados na segunda linha.

Tabela 6 - Médias das tensões superficiais em (mN/m) para a escolha da linhagem.

| 24 horas Glicose | | | | | | | | | |
|--------------------------|-------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-------------|
| LB1a | LB2b | ATCC 21332 | LB157 | LB114 | LB115 | LB117 | LB2a | LB262 | LB5a |
| 58,75 | 52,68 | 64,70 | 65,72 | 64,94 | 63,24 | 65,64 | 53,68 | 56,35 | 56,25 |
| 2,169 | 1,263 | 5,000 | 2,384 | 2,281 | 2,585 | 2,056 | 3,052 | 2,177 | 9,623 |
| 48 horas Glicose | | | | | | | | | |
| 58,37 | 54,19 | 63,77 | 63,01 | 58,81 | 63,38 | 65,33 | 52,63 | 58,69 | 61,00 |
| 3,846 | 3,565 | 5,159 | 4,478 | 5,534 | 5,123 | 5,542 | 4,174 | 4,668 | 4,030 |
| 24 horas Glicerol | | | | | | | | | |
| 59,97 | 55,72 | 54,35 | 61,53 | 58,02 | 63,89 | 58,21 | 55,71 | 52,97 | 59,28 |
| 2,012 | 5,141 | 3,845 | 3,139 | 1,628 | 1,610 | 7,362 | 3,573 | 0,715 | 2,127 |
| 48 horas Glicerol | | | | | | | | | |
| 58,69 | 57,75 | 60,22 | 63,23 | 62,69 | 59,52 | 62,73 | 50,72 | 53,79 | 54,95 |
| 4,436 | 3,677 | 7,765 | 1,491 | 1,445 | 4,402 | 1,231 | 7,989 | 3,731 | 2,851 |

*controle glicose 59,91 mN/m, controle glicerol 54,07 mN/m

Estes valores das tensões superficiais (TS) são semelhantes aos encontrados por NITSCKE, FERRAZ & PASTORE, (2004), utilizando as mesmas linhagens mas com diferente composição do meio mineral e fonte de carbono (glicose). Além disso, são próximos aos dos controles, e conseqüentemente, distantes da concentração micelar crítica (CMC) 27 mN/m, (NITSCHKE, 2004; BARROS, 2007), o que evidência produção nula ou baixa de biosurfactantes.

Tabela 7 - Análise de variância para as tensões superficiais das linhagens de *Bacillus* em 24 horas para os ensaios com glicerol.

| Fonte de variação | Soma de Quadrados | Graus de liberdade | Quadrados médios | F cal | p-valor | F tab |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------|----------------|--------------|
| Entre linhagens | 730,578881 | 9 | 81,17543122 | 3,820 | 0,00601 | 3,46* |
| Entre à linhagem | 424,9060973 | 20 | 21,24530487 | | | |
| Total | 1155,484978 | 29 | | | | |

*Significativo ao nível de 1%

A análise de variância somente apresentou significância para os ensaios realizados com glicose em 24 horas, evidenciando possíveis diferenças entre as linhagens na produção de tensoativos. Portanto, foi rejeitada a $H_{nula,e}$, em seguida, realizado um teste de comparações múltiplas (Tukey) com 10 % de significância para a comprovação das diferenças entre as médias de tensão superficial.

Teste de Comparações

Teste Tukey para significância de 10% diferença mínima significativa (d.m.s). = 12,00182

Os valores das diferenças entre as médias das tensões superficiais do meio de cultura em 24 horas de fermentação com o glicerol como única fonte de carbono entre as linhagens (tratamentos) estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Diferenças entre as tensões superficiais (mN/m) das linhagens para os ensaios realizados com glicerol em 24 horas.

| Linhagens | Valor | Linhagens | Valor | Linhagens | Valor |
|------------------|--------------|------------------|----------------|------------------|---------------|
| LB5a - LB1a | -2,498 | LB1a - LB117 | -6,900 | ATCC - LB262 | 0,782 |
| LB5a - LB2B | 3,564 | LB1a - LB2a | 5,065 | LB157 - LB114 | 2,484 |
| LB5a - ATCC | -8,451 | LB1a - LB262 | 2,390 | LB157 - LB115 | 0,074 |
| LB5a - LB157 | -9,472 | LB2b - ATCC | -12,015 | LB157 - LB117 | 12,039 |
| LB5a - LB114 | -8,690 | LB2b - LB157 | -13,036 | LB157 - LB2a | 9,364 |
| LB5a - LB115 | -6,988 | LB2b - LB114 | -12,254 | LB157 - LB262 | 1,702 |
| LB5a - LB117 | -9,398 | LB2b - LB115 | -10,552 | LB114 - LB115 | -0,708 |
| LB5a - LB2a | 2,567 | LB2b - LB117 | -12,962 | LB114 - LB117 | 11,257 |
| LB5a - LB262 | -0,108 | LB2b - LB2a | -0,997 | LB114 - LB2a | 8,582 |
| LB1a - LB2b | 6,062 | LB2b - LB262 | -3,672 | LB114 - LB262 | -2,410 |
| LB1a - ATCC | -5,953 | ATCC - LB157 | -1,021 | LB115 - LB117 | 9,555 |
| LB1a - LB157 | -6,974 | ATCC - LB114 | -0,239 | LB115 - LB2a | 6,880 |
| LB1a - LB114 | -6,192 | ATCC - LB115 | 1,463 | LB115 - LB2a | 11,965 |
| LB1a - LB115 | -4,490 | ATCC - LB117 | -0,947 | LB117 - LB2a | 9,290 |

*ATCC21332 *Em destaque as diferenças significativamente diferentes.

*O teste de média (tukey) consiste em calcular a diferença entre duas médias (tratamentos) indicando significância quando o valor encontrado em módulo for superior a diferença mínima significativa.

A linhagem LB2b foi estatisticamente diferente das ATCC1332, LB 157, LB114 e LB 117. Além disso, somente a linhagem LB157 diferiu da LB117. Portanto, a linhagem LB2b foi escolhida para as etapas posteriores., visto que os demais micro-organismos não apresentaram indícios de diferença de produção de tensoativos. Entretanto, os valores das tensões superficiais encontradas estão acima da concentração micelar crítica (CMC) da surfactina, que é de 27 mN/m, (NITSCHKE, 2004; BARROS, 2007), região em que qualquer concentração de surfactantes tem forte influência na tensão superficial.

A análise da Figura 1 revela perfis semelhantes entre os ensaios com glicose e glicerol para a linhagem selecionada para os experimentos de otimização.

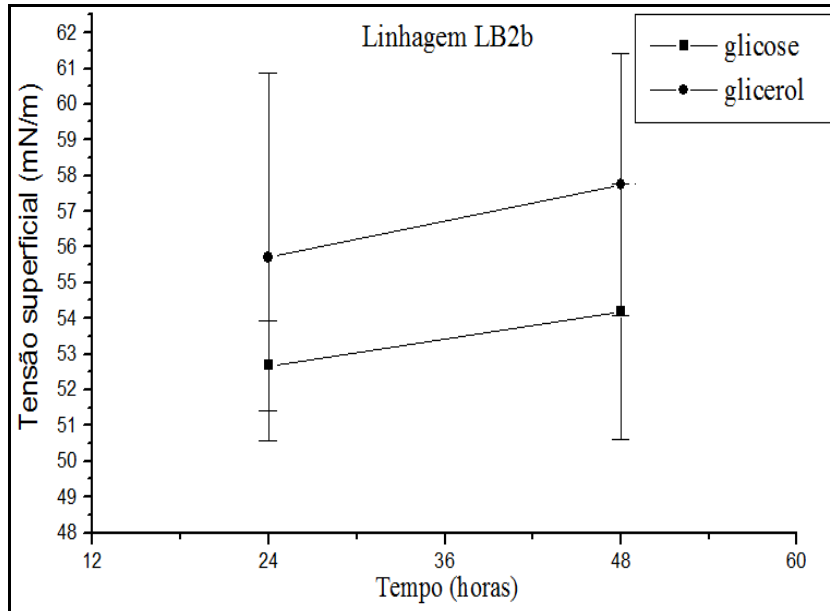


Figura 1 - Tensão superficial da linhagem selecionada (LB2b) para os ensaios com o meio mineral pós otimização.

2.1.1 Hemólise

A formação de halos nos ensaios com ágar sangue, indicam a hemólise dos eritrócitos (Figura 2)



Figura 2 - Placa de ágar sangue inoculado com a linhagem LB2b.

Esta técnica não assegura que o micro-organismo seja produtor de biossurfactantes, pois, enzimas extracelulares podem lisar as hemácias indicando um falso positivo, além da baixa difusão dos biossurfactantes no meio dificultar a formação de halos (CARRILLO *et al.*, 1996).

Portanto, os resultados sugerem a produção de biossurfactantes pela linhagem LB2b, cujo histórico indica produção de biossurfactantes pela mesma (NITSCHKE, FERRAZ & PASTORE, 2004).

2.1.2 Otimização do meio mineral para a produção dos biossurfactantes

Os ensaios do planejamento fatorial fracionado foram elaborados de acordo com os níveis indicados na Tabela 2 e compostos de acordo com a Tabela 9, que ainda contem os resultados de tensão superficial do meio após 24 horas de fermentação.

Tabela 9 – Planejamento fatorial fracionado 2⁸⁻⁴ (NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2002) concentrações e respostas

| Ensaio | NH ₄ SO ₄ | CaCl ₂ | NH ₄ NH ₃ | MgSO ₄ (=1x2) | FeCl ₃ . 7H ₂ O (=1x3) | MnSO ₄ (=2x3) | ZnSO ₄ (=1x2x3) | Glicerol | Tensão superficial (mN/m) |
|--------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------|-----------------------------|---|-----------------------------|-------------------------------|----------|------------------------------|
| 1 | - | - | - | + | + | + | - | + | 60,068 |
| 2 | + | - | - | - | - | + | + | + | 52,983 |
| 3 | - | + | - | - | + | - | + | + | 66,724 |
| 4 | + | + | - | + | - | - | - | + | 61,222 |
| 5 | - | - | + | + | - | - | + | + | 51,9 |
| 6 | + | - | + | - | + | - | - | + | 54,126 |
| 7 | - | + | + | - | - | + | - | + | 61,193 |
| 8 | + | + | + | + | + | + | + | + | 57,951 |
| 9 | + | + | + | - | - | - | + | - | 69,851 |
| 10 | - | + | + | + | + | - | - | - | 56,155 |
| 11 | + | - | + | + | - | + | - | - | 59,064 |
| 12 | - | - | + | - | + | + | + | - | 63,87 |
| 13 | + | + | - | - | + | + | - | - | 62,305 |
| 14 | - | + | - | + | - | + | + | - | 65,454 |
| 15 | + | - | - | + | + | - | + | - | 68,951 |
| 16 | - | - | - | - | - | - | - | - | 71,926 |

A análise dos resultados do planejamento fatorial fracionado (Tabela 10) revela que apenas o NH_4NO_3 (x_7) foi significativo e seu efeito negativo, o que indica menores valores de tensão superficial.

Tabela 10 – Resultados da análise estatística do planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} (NETO, SCARMINIO & BRUNS, 2002).

| Variáveis | Efeito | t_{cal} | p-valor |
|---|-----------------|------------------|------------------|
| Média | 61,4839 | 48,10967 | 0,00000 |
| CaCl₂ | -1,3546 | -2.45784 | 0,608950 |
| ZnSO₄ | 2,2459 | -0,52998 | 0,402429 |
| MgSO₄ | -4,4404 | 0,87867 | 0,116354 |
| FeCl₃,6H₂O | -2.7766 | -1.73724 | 0,305575 |
| MnSO₄ | -0.4304 | -1,08632 | 0,870008 |
| NH₄NO₃ | -2.2459* | -0,87867* | 0,033085* |
| (NH₄)₂SO₄ | 1,4531 | 0,56852 | 0,583589 |
| Glicerol | -6.4261 | -2,51414 | 0,402429 |

*Termos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em destaque

Este resultado é condizente com a literatura de COOPER *et al.*, (1981); DAS, MUKHERJEE & SEN, (2009); PEYPOUX, BONMATIN & WALLACH, (1999) que reportaram a importância metabólica do nitrogênio para produção de biossurfactantes.

Devido aos resultados obtidos nos experimentos de planejamento fatorial 2^{8-4} , foi realizado um segundo planejamento experimental com delineamento *Plackett & Burman*, tendo sido os teores de todas as variáveis reduzidos, excetuando-se o NH_4NO_3 (Tabela 5).

Os ensaios do delineamento experimental *Plackett & Burman*, foram elaborados de acordo com os níveis indicados na Tabela 3 e compostos de acordo com a Tabela 11, a qual ainda contém os resultados de tensão superficial do meio após 24 horas de fermentação.

Tabela 11 - Valores utilizados no delineamento experimental *Plackett & Burman* 16 ensaios e 4 repetições repetições no ponto central.

| Ensaio | NH ₄ SO ₄ | CaCl ₂ | NH ₄ NH ₃ | MgSO ₄ | FeCl ₃ ·7H ₂ O | MnSO ₄ | ZnSO ₄ | Glicerol | Variável inerte I | Variável inerte II | Variável inerte III | Tensão superficial (mN/m) |
|--------|---------------------------------|-------------------|---------------------------------|-------------------|--------------------------------------|-------------------|-------------------|----------|-------------------|--------------------|---------------------|---------------------------|
| 1 | + | - | + | - | - | - | + | + | + | - | + | 58,407 |
| 2 | + | + | - | + | - | - | - | + | + | + | - | 55,858 |
| 3 | - | + | + | - | + | - | - | - | + | + | + | 55,582 |
| 4 | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | + | 50,173 |
| 5 | + | + | - | + | + | - | + | - | - | - | + | 54,665 |
| 6 | + | + | + | - | + | + | - | + | - | - | - | 42,711 |
| 7 | - | + | + | + | - | + | + | - | + | - | - | 55,807 |
| 8 | - | - | + | + | + | - | + | + | - | + | - | 47,48 |
| 9 | - | - | - | + | + | + | - | + | + | - | + | 44,52 |
| 10 | + | - | - | - | + | + | + | - | + | + | - | 41,862 |
| 11 | - | + | - | - | - | + | + | + | - | + | + | 53,713 |
| 12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 59,545 |
| 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 57,234 |
| 14 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 55,182 |
| 15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 50,373 |
| 16 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 55,182 |

A análise dos resultados do delineamento experimental *Plackett & Burman* (Tabela 12) revela que o ZnSO₄ e NH₄NO₃ (x₇) foram significativos nos valores obtidos de tensão superficial para o meio de cultura com 24 horas de fermentação.

Tabela 12 – Resultados da análise estatística do delineamento experimental *Plackett & Burman*.

| Variáveis | Efeito | t _{cal} | p-valor |
|---|------------------|------------------|-------------------|
| Média | 52,00700 | 98,55498 | 0,000000 |
| CaCl ₂ | -2,16183 | -1,77394 | 0,150745 |
| ZnSO ₄ | 2,72483 | 2,23593 | 0,089023 |
| MgSO ₄ | -0,00050 | -0,00041 | 0,999692 |
| FeCl ₃ .6H ₂ O | -0,55283 | -0,45364 | 0,673610 |
| MnSO ₄ | -7,78050 | -6,38447 | 0,308907 |
| NH ₄ NO ₃ | -7,12517* | -5,84672* | 0,0426806* |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0,59083 | 0,48482 | 0,653156 |
| Glicerol | -2,49083 | -2,04391 | 0,110452 |

*Termos estatisticamente significativos (p < 0,1) em destaque

Provavelmente o NH₄NO₃ foi estatisticamente significativo nos experimentos fatorial fracionado e delineamento *Plackett & Burman*, devido à este composto prover duas fontes distintas de nitrogênio e ser importante na bioprodução da surfactina como relatado por COOPER *et al.*,(1981); DAS, MUKHERJEE & SEN, (2009); PEYPOUX, BONMATIN & WALLACH, (1999).

De acordo com a Tabela 12, o ZnSO₄ foi outro fator significativo. Para isso, o valor da confiança utilizado foi de 10 %, e o valor de seu efeito foi positivo, indicando ação inibitória de produção de tensoativos.

Portanto, devido aos altos valores de tensão superficial encontrados nos experimentos fatorial fracionado e delineamento *Plackett & Burman*, este trabalho optou por utilizar meios complexos com o objetivo de suplementar as necessidades metabólicas da linhagem LB2b.

2.1.3 Utilização de meios complexos

A análise dos resultados da Figura 3 revela que 21 entre os 31 meios de cultura apresentaram tensão superficial próxima à concentração micelar crítica (CMC) 27 mN/m (NITSCHKE, 2004; BARROS, 2007). Além disso, os experimentos nesta faixa obtiveram

menores desvios padrões devido às oscilações que normalmente acontecem em medidas acima da CMC.

Em todos os ensaios em que a manípueira esteve presente foram encontrados baixos valores de tensão superficial. Isso se deve provavelmente à sua composição centesimal que contém açúcares e minerais e suprem as necessidades metabólicas do gênero *Bacillus* como reportado nos trabalhos NITSCHKE & PASTORE, (2003); BARROS, (2007); BARROS, QUADROS, & PASTORE, (2008).

Entretanto, o problema da utilização da manípueira nos experimentos seguintes é a dificuldade técnica em identificar o uso ou não do glicerol como fonte de carbono, pois o micro-organismo pode utilizar preferencialmente a frutose e glicose, indicando um falso resultado sobre o consumo do glicerol.

Portanto, como os ensaios sem a presença de manípueira na composição do meio apresentaram baixos valores de tensão superficial como (15) glicerol + peptona; (24) glicerol + peptona + malte de cevada; (30) meio sintético + glicerol + peptona; (20) meio sintético + glicerol + malte; (26) glicerol + meio sintético + peptona + malte de cevada, os mesmos foram descartados.

Dessa forma, os meios (15) peptona + glicerol; (24) glicerol + peptona + malte de cevada; (30) meio sintético + glicerol + peptona foram escolhidos devido à conveniência na utilização de meios de cultura com menor quantidade de componentes e, conseqüentemente, facilidade na identificação da significância do glicerol na produção de biossurfactantes.

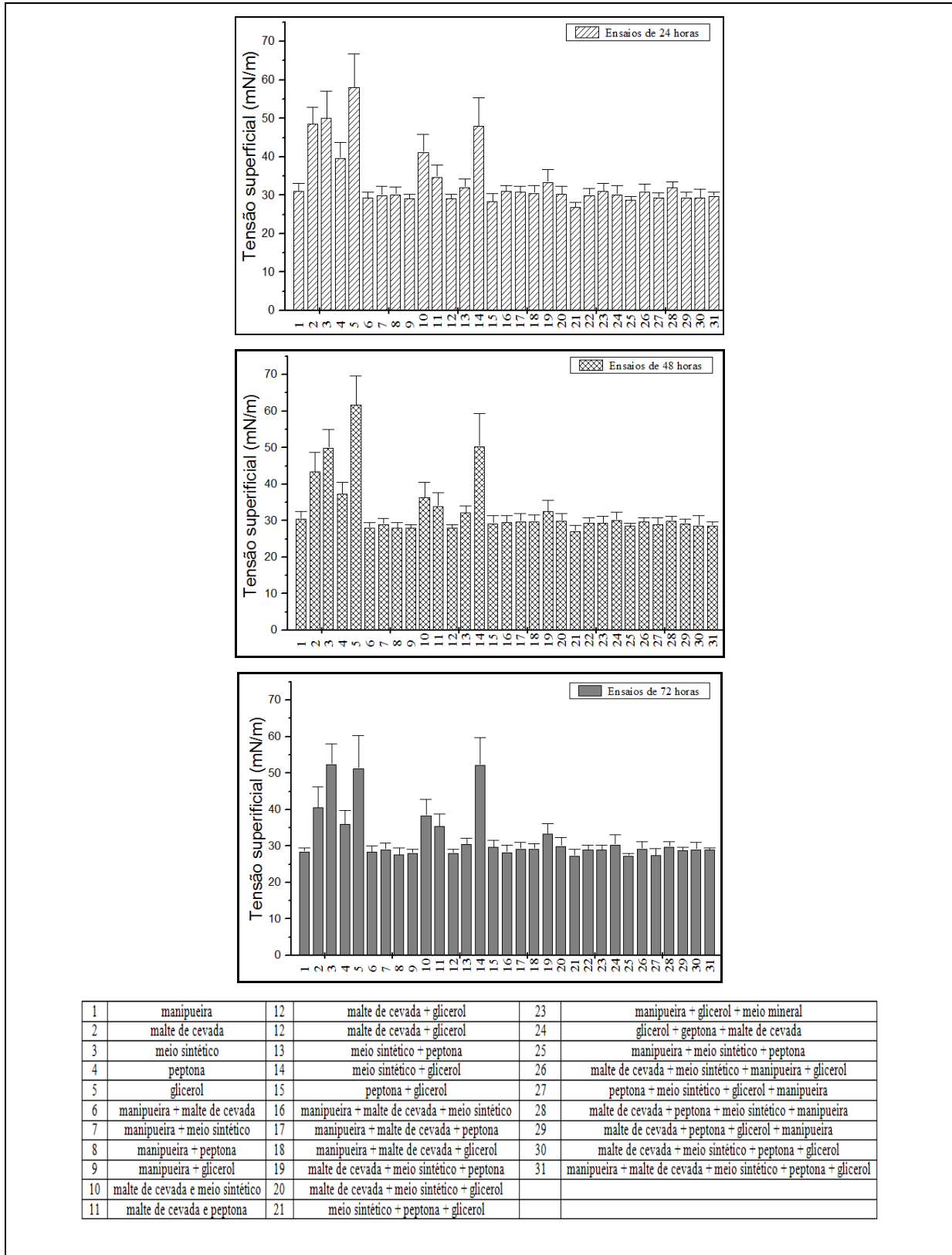


Figura 3 – Cinética das tensões superficiais das espumas obtidas a partir de meios de cultura complexos em 24, 48 e 72 horas.

Os meios de cultura peptona + glicerol; glicerol + peptona + malte de cevada; meio sintético + glicerol + peptona apresentaram valores de tensão superficial (TS) semelhantes. Entretanto, os ensaios realizados com o meio de cultura composto por glicerol e peptona, obtiveram resultados mais baixos para diluição micelar crítica 1/10 (CMD^{-1}) e 1/100 (CMD^{-2}) inferindo uma maior produção de biossurfactantes.

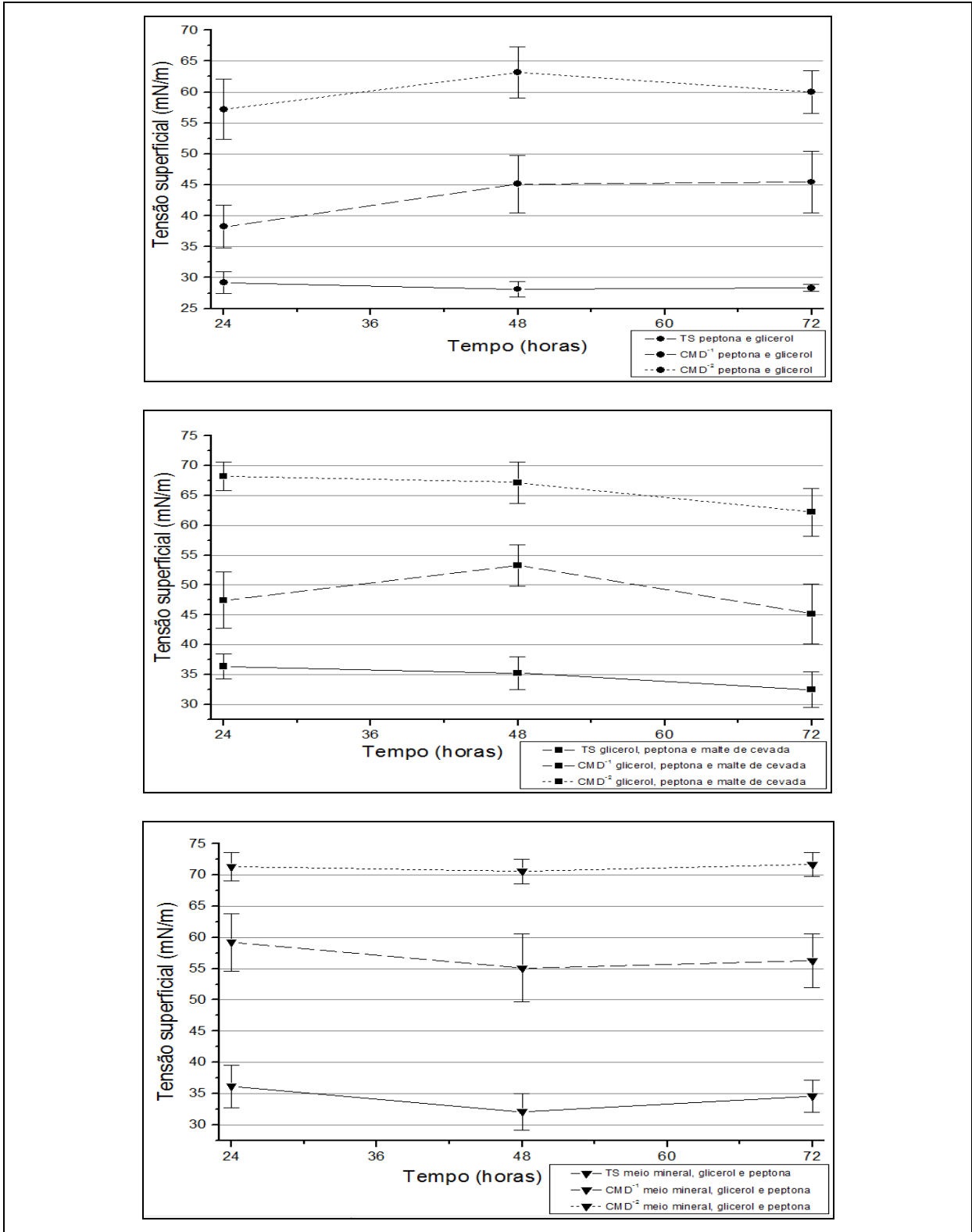


Figura 4 - Cinética das tensões superficiais e respectivas diluições (CMD⁻¹, CMD⁻²) para a confirmação do melhor meio de cultura para a produção de biossurfactantes.

Portanto, o meio de cultura composto por peptona e glicerol foi selecionado para os ensaios posteriores, realizados em fermentador de bancada (New Brunswick - Bio 310) com a linhagem LB2b.

Nos ensaios de seleção, o meio de cultura composto por glicerol + mineral + peptona apresentou menores valores de tensão superficial, o que não foi reproduzido nos ensaios subsequentes. Esta divergência pode ocorrer devido aos diversos parâmetros que envolvem os processos fermentativos. Além disso, a escolha do meio de cultura composto por glicerol + peptona foi conveniente, pois é o que utiliza menor quantidade de componentes entre os três, facilitando a identificação da significância do glicerol na produção de biossurfactantes.

CONCLUSÃO

A especificidade do requerimento metabólico dos micro-organismos dificulta pesquisas com meios de culturas sintéticos. Em concentrações de biossurfactantes acima da concentração micelar crítica (CMC), pequenos desvios na concentração de biossurfactantes resultam em grandes diferenças na tensão superficial, como revela a análise dos resultados dos ensaios com meio mineral.

Entretanto, os meios simples facilitam a identificação de fatores significantes para a bioprodução, como o NH_4NO_3 , que foi o único fator estatisticamente relevante em ambos experimentos de otimização, confirmando a importância do nitrogênio nesse processo (COOPER *et al.*, 1981; DAS, MUKHERJEE & SEN, 2009; PEYPOUX, BONMATIN & WALLACH, 1999). Portanto, a decisão de trabalhar com meios sintéticos exige embasamento técnico, disponibilidade de materiais e convergência destes fatores com as necessidades do micro-organismo, pois mesmo entre as linhagens pode existir diferenças metabólicas.

Entre as vantagens da utilização dos meios complexos está a suplementação total ou parcial das necessidades supracitadas. No entanto, os substratos utilizados podem influenciar diretamente o rendimento e a estrutura dos biocompostos (PEYPOUX, BONMATIN & WALLACH, 1999), além de dificultar a ação de inferir sobre a importância de algum componente sobre o bioprocessos, objetivando apenas o rendimento e não todo o processo.

OBRAS CONSULTADAS

ASGHER, M.; ASAD, M. M.; RAHMAN, S. U.; LEGGE, R. L. - A thermostable α amylase from a moderately thermophilic *Bacillus subtilis* strain starch processing. **Journal of Food Engineering**. v. 79, n.3, p. 950- 955, 2007.

BANAT, I. M. - The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus* species. **Biotechnology Letters**., v.15, n.6, p. 591-594, 1993.

BARROS, F. F. C. - **Estudo das variáveis de processo e ampliação de escala na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em manipueira**. 102 f.. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil, 2007.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. - Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**., Campinas. 2008, v.28, n.4, p.979-985.

CAMEOTRA, S.; MAKKAR, R. S. - Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology Biotechnology**., v.50, n.3, p.520-529, 1998.

CARRILLO, P. G.; MARDARAZ, C.; PITTA-ALVAREZ, S. I.; GIULIETTI, A. M. - Isolation and selection of biosurfactant-producing bacteria. **World journal of Microbiology and biotechnology, Oxford**., v.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 cation additions. **Applied Environment Microbiology**. v.42, p. 408-412, 1981.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. - Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine *bacterium*. **Bioresource Technology**, v .100, p. 1015 – 1019, 2009.

FUJITA, H. A.; FIGUEROA, M. O. R. - Composição centesimal e teor de β -glucanas em cereais e derivados. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n .2, 2003.

GHOJAVAND, H.; VAHAHBZADEH, F.; ROAYAEI, E.; SHAHRAKI, A. K. - Production and properties of biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **Journal of Colloids and interface Science**, n. 1-2, v. 324, p. 172-176, 2008.

MUTALIK, S. R.; VAIDYA, B. K.; JOSHI, R.; DESAI, K.; NEN, S.N. – Use of response surface optimization for the production of biosurfactant from *Rhodococcus spp.* MTCC 2574. **Bioresource technology**, n.16, v.99, p. 7875 –7880, 2008.

MUTHUSAMY, K.; GOPALAKRISHNAN, S.; RAVI, T. K.; SIVACHIDAMBARAM, P. - Biosurfactants: Properties, commercial production and application. **Current Science**. v. 94, n. 6, p. 736-747, 2008.

NASCIMENTO, W. C. A.; SILVA, C. R. S.; CARVALHO, R. V.; MARTINS, M. L. L. - **Otimização de um meio de cultura para a produção de proteases por um *Bacillus sp*, Termofílico.** Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 2007.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S; BRUNS, R. E. - **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**, 2. ed, 2002.

NITSCHKE, M. - **Produção e caracterização de biosurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato.** f.88. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil, 2004.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. - Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 81-85, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. - Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Applied Biochemistry Biotechnology**. v. 106, p. 295-302, 2003.

PIMENTEL-GOMES, F. – **Curso de estatística experimental**, p. 428-429, 14. Ed, 2000.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. - Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.51, p. 553-563, 1999.

ROBERT, M.; MERCADÉ, M. E., BOSH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J.- Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology. Letters**, v. 1, p. 871-874, 1989.

RODRIGUES, M. I. & IEMMA, A. F. - **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**, Editora Casa do Pão: Campinas, 2005, Capítulos 4 e 5.

ROCHA, M. V. P.; MENDES, J. S.; GIRO M. E.; GONÇALVES, L. R. B. - ESTUDO DA ESTABILIDADE DO BIOSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* EM SUCO DE CAJU, 4º PDPETRO ,Campinas-SP, 6.3.0232-1, 21-24 de outubro de 2007.

SHARIFF, F. M.; LEOW, T. C.; MUKRED, T. C.; SALLEH, A. B.; BASRI, M.; RAHMAN, R. N. Z. R. - Production of L2 lipase by *Bacillus* sp. strain L2: nutritional and physical factors. **Journal of basic microbiology**, v.47, n. 5, p. 406-412, 2007.

SHEPPARD, J.D.; COOPER, D.G. The response of *Bacillus subtilis* ATCC21332 to manganese during continuous-phased growth. *Applied. Microbiology.and Biotechnology*, v. 35, p. 72-76, 1991.

SIGMA. Disponível em:

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=pt&N4=S3523|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC.

[Acesso em: 25/05/2011]

SILVA, C. F. - **Produção biológica de surfactant por *Serratia marcescens***. f..92. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil, 2002.

VIEIRA, R. B.; LIMA, C. J. B.; FRANÇA, F. P.; SÉRVULO, E. F. C.; CARDOSO, V. L. - Estudo da produção de biossurfactante empregando culturas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. In: **VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica**, p. 1-6, 2005.

CAPÍTULO 3:
PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES EM FERMENTADOR DE BANCADA E
ANÁLISE DO CONSUMO DE GLICEROL POR *BACILLUS SUBTILIS*

INTRODUÇÃO

Alternativas de biocombustíveis vem sendo desenvolvidas no mundo todo, devido a iminente declínio da produção de petróleo, pressões ambientais e determinações governamentais. Projeções de CAMPBELL & LAHERRE (1998) indicam o fim das reservas, próximo ao ano de 2050. O Brasil vem se destacando nas pesquisas de fontes alternativas à dependência petroquímica, foi pioneiro a implementar o etanol combustível e mais recentemente vem realizando pesquisas sobre a utilização do biodiesel, utilizando diferentes fontes oleaginosas como: soja, girassol, mamona e em especial pinhão-manso (BiODIESELBR...2010). Entretanto, a produção de biodiesel em escala industrial necessita ser cautelosa com os subprodutos gerados, principalmente com o glicerol, já que o substituto dos combustíveis fósseis deve ser eficiente tecnologicamente e ecologicamente correto.

A utilização biotecnológica do glicerol oriundo da produção de biodiesel é vantajosa, pois resulta em produtos de alto valor agregado, além de não necessariamente depender de etapas de purificação.

Dentro as possibilidades de aplicação, a produção de biossurfactantes tem despertado especial interesse devido às propriedades tensoativas, complexantes e antimicrobianas. Considerando-se o fim dos recursos de petróleo, a produção de biossurfactantes utilizando o glicerol oriundo do biodiesel se enquadra perfeitamente, já que a principal característica deste bioproduto é sua ação redutora de tensão superficial e interfacial, que pode substituir a produção de detergentes derivados do petróleo. Além disso, o gargalo para a consolidação da produção de biossurfactantes em escala industrial e o custo de produção em que 30% do mesmo se concentra sobre o substrato utilizado (CAMEOTRA & MAKKAR, 1998).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi aumentar a escala da produção de biossurfactantes (fermentador de bancada), utilizando a linhagem (LB2b) e o meio de cultura selecionado no capítulo 2 (peptona + glicerol).

1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.1 FERMENTAÇÃO DA LINHAGEM SELECIONADA EM FERMENTADOR DE BANCADA

Nos experimentos em fermentador de bancada (Bioflo® & Celligen® 310 - New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) foram utilizadas as seguintes condições 150 rpm, pH inicial 7, aeração 2 L/minuto, 30 °C, volume de meio 3,5 litros. Os parâmetros rotação, pH inicial e temperatura foram definidos de acordo com os trabalhos de BARROS, (2007) e NITSCHKE, (2004); e a aeração em função da capacidade da bomba e o volume do meio de acordo com SCHMIDELL et al., (2001).

2.1.1 Preservação da linhagem e preparo do inóculo

A cultura foi mantida em tubo de ágar nutriente inclinado sob refrigeração (4 a 6 °C) e em períodos regulares repicadas para outros tubos, incubados a 30 °C por 24 h e armazenados.

Antes da fermentação a linhagem de *Bacillus subtilis* LB2b foi repicada em placas de ágar nutriente e colocadas em estufa à 30 °C por 24 horas. As placas repicadas foram então utilizadas para o preparo do inóculo.

Alçadas da cultura foram transferidas para erlenmeyers contendo 300 mL de caldo nutritivo (peptona bacteriológica 5 g.L⁻¹(Himedia) e extrato de carne 3 g.L⁻¹(Biolife) estéril. A seguir, foram incubados à 150 rpm e 30 °C, durante 24 h, em agitador rotatório (Shaker Tecnal Te-480). Após este período, o inóculo foi diluído com caldo nutritivo estéril até se obter uma densidade óptica de 0,5, medida a 660 nm (ROCHA, *et al.*, 2007). Posteriormente, uma alíquota de 245 mL (7 % v/v), foi utilizada para inocular o meio de cultura contido em fermentador de bancada (Bioflo® & Celligen® 310 - New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA).

1.1.2 Meio de cultura

Um volume de 3,5 litros de meio selecionado no capítulo 2, contendo peptona bacteriológica (Himedia) 10 g.L⁻¹ e glicerol 10 g.L⁻¹ (Synth) teve o pH previamente ajustado para 7 com solução de NaOH 0,05 e adicionado ao fermentador (Bioflo® & Celligen® 310 - New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) para esterilização.

1.1.3 Purificação do glicerol

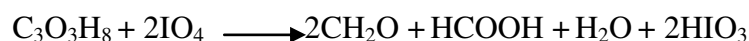
As amostras de glicerol da produção de biodiesel foram ajustadas com ácido fosfórico (Synth) e permaneceram em pH entre 3 e 4 durante 24 horas. A fase central foi separada com o uso do funil de decantação e, em seguida, colocada no rotaevaporador por 4 horas a 50°C (Fischer Scientific-05-ST 1 P-B) para a retirada do metanol (RIVALDI, SARROUH & FIORILO, 2007). O produto remanescente foi utilizado na elaboração dos meios de cultura objetivando a comparação do mesmo com os ensaios que utilizaram o glicerol padrão analítico.

2.1.4 Consumo do glicerol durante fermentação

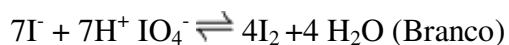
Devido à utilização de um meio contendo outra fonte de carbono (peptona) que o glicerol, foi necessário adaptar uma metodologia para a identificação do consumo de glicerol no decorrer da fermentação. A metodologia selecionada, esta embasada nas normas brasileiras de controle de qualidade do biodiesel de mamona, apresenta praticidade e exatidão (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2010). O detalhamento segue abaixo.

A cada intervalo de 24 horas foi retirada uma alíquota de 130 mL do meio, que posteriormente foi centrifugada a 10,08 x 10³ g por 10 minutos e 5 °C (Beckman Coulter, Alegria X-22r) para a retirada de células e peptona que pudessem interferir na análise.

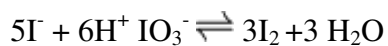
Os cálculos foram realizados em função da diferença entre a quantidade de iodo formado entre os agentes oxidante ácido periódico e ácido iódico, sendo esse último formado apenas na reação do glicerol com ácido periódico, como descrito na reação abaixo:



Se o meio não contiver glicerol então o iodo (4 moles) titulado é proveniente exclusivamente do ácido periódico.



Se o meio contiver glicerol haverá formação de ácido iódico e formação de 3 moles de iodo.



1.2 PROCEDIMENTO

Preparo de soluções

Dicromato de potássio

Uma massa de 4,9035 gramas de dicromato de potássio (Synth) foi moída e seca em estufa a 55 °C durante 24 horas. Em seguida, foi adicionada ao balão volumétrico, o qual foi completado com água até o volume de 1 litro.

Solução de amido

10 gramas de amido solúvel foi umedecida com água fria até a obtenção de uma pasta homogênea. A seguir, foi adicionado 1 litro de água fervente. A solução foi misturada e armazenada.

Solução de ácido periódico-acético

Foram dissolvidos 5,4 gramas de ácido periódico (Vetec) em 100 mL e adicionado a 1,9 litros de ácido acético glacial (Synth).

Solução de iodeto de potássio

Foram dissolvidos 150 gramas de iodeto de potássio (Synth) em um balão volumétrico e adicionado água destilada até o volume de 1 litro.

Soluções de tiosulfato de sódio

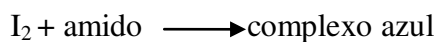
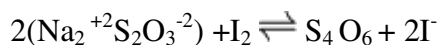
Foram dissolvidos 12,4 gramas de tiosulfato de sódio em água destilada até completar 1 litro em balão volumétrico e em seguida padronizado.

Padronização do tiosulfato

Uma mistura de 25 mL da solução padrão de dicromato de potássio, 5 mL de ácido clorídrico e 10 mL da solução de iodeto de potássio foi colocada em um béquer de 400mL e agitada.

Após exatos 5 minutos foram adicionados 100 mL de água destilada. Em seguida a solução foi titulada com a solução de tiosulfato de sódio previamente preparada até que a cor amarela torna-se clara. Logo, foram adicionados 1,5 mL da solução de amido e seguiu-se a titulação com a mesma solução de tiosulfato de sódio até o desaparecimento da cor azul.

Com o volume de tiosulfato de sódio utilizado (antes e após a adição de amido) foi calculado a normalidade da solução e utilizada nos cálculos do teor de glicerol.



Cada mol de dicromato de potássio produz três moles de iodo que reagem com 6 moles de tiosulfato de sódio de modo que a quantidade de tiosulfato de sódio é igual a dicromato de potássio multiplicada por 6.

Logo a normalidade real da solução de tiosulfato de sódio é 2,5 (equivalente à 25 mL da solução de dicromato de sódio) dividido por volume de tiosulfato consumido na titulação em mL.

Titulação do glicerol

Para cada análise, foi medida a densidade do meio centrifugado e em seguida adicionou-se 50 mL do mesmo em erlenmeyer.

A seguir, pipetou-se 25 mL da solução de ácido periódico em 4 erlenmeyeres de 400 mL. Em dois deles foi adicionado 50 mL de água deionizada e nos dois restantes, 50 mL do meio. Após 30 minutos foram adicionados 20 mL da solução de iodeto de potássio, aguardados 2 minutos e diluído em 105 mL de água.

Todos os erlenmeyeres foram titulados como a solução de tiosulfato de sódio até se obter uma coloração amarelo-claro. Em seguida foram adicionados 1,5 mL da solução de amido e titulou-se até a translucidez.

Cálculos

Com os valores médios dos volumes de tiosulfato de sódio utilizados nos ensaios com a água e com o meio centrifugado, normalidade exata da solução de tiosulfato de sódio e a densidade do meio centrifugado, pode-se calcular a porcentagem em massa de glicerol na solução.

$$\% \text{ glicerol} = 2071,8.(B-A).N/(P.V)$$

B = volume médio da titulação do branco (mL)

P = massa inicial de amostra (gramas)

A = volume médio da titulação da amostra (mL)

V = volume de meio utilizado (mL)

N = normalidade exata da solução de tiosulfato

1.3 PARÂMETROS DE CRESCIMENTO CELULAR

A utilização combinada das técnicas espectrofotométrica, biomassa, células viáveis e oxigênio dissolvido no meio de cultura fornecem bons conhecimentos sobre a cinética fermentativa.

1.3.1 Células totais

Espectrofotometria no infravermelho

Instantes anteriores a inoculação, uma amostra do meio de cultura foi retirada assepticamente e armazenada na geladeira para ser o branco nas análises de absorvância durante a fermentação. A cada 24 horas uma alíquota foi retirada do meio e analisada em espectrofotômetro (Beckman Coulter DU 640) à 600nm (ROCHA *et al.*, 2007).

Biomassa

Em intervalos de 24 horas foram recolhidas amostras para o acompanhamento do desenvolvimento celular do *Bacillus subtilis*.

Inicialmente, os tubos da centrífuga foram deixados abertos em uma estufa (Onion 515) por 24 horas para a retirada de umidade, sendo colocados no dessecador logo em seguida. Instantes antes da análise mediu-se a massa dos tubos e a densidade do meio. Assim, adicionou-se uma massa conhecida do meio em dois tubos para posterior centrifugação a $10,08 \times 10^3$ g por 20 minutos a 5 °C (Beckman Coulter, Alegria X-22r). Em seguida, retirou-se o sobrenadante e novamente os tubos foram colocados na estufa por 48 horas.

Os tubos foram novamente colocados no dessecador, agora por 3 horas, para posterior medida das massas dos mesmos.

A diferença entre a massa dos tubos forneceu a biomassa seca produzida no volume de meio adicionado em cada tudo. Assim, com a densidade do meio podemos calcular a biomassa em cada amostragem por volume de meio.

1.3.2 Células viáveis

Testes em placas

Amostras retiradas em tubos previamente esterilizados foram recolhidas a cada 24 horas de modo a evitar qualquer forma de contaminação em ambos, fermentador e frascos. Em seguida, utilizou-se a técnica de diluição seriada para posterior inoculação em placas de ágar nutriente, que foram colocadas em estufa (Onion 515) a 30 °C por 24 horas.

Para a análise em 0 horas os ensaios foram realizados de forma simples com três diluições. Nas demais análises os ensaios foram realizados com duas diluições em duplicatas.

1.3.3 Oxigênio dissolvido no meio de cultura

O sensor de oxigênio para medição em meios líquidos (INPRO 6830/12/320) foi calibrado em 0 % estando desconectado ao fermentador e 100 % após o meio de cultura permanecer durante 6 horas em estágio de agitação, a 200 rpm e com vazão de ar de 3 l/min.

1.4 PURIFICAÇÃO DO BIOSSURFACTANTE

A espuma recolhida durante todo processo fermentativo foi liquefeita e centrifugada (Beckman Coulter, Alegra X-22r) a $10,08 \times 10^3$ g por 20 minutos a 5 °C para eliminação de células. Em seguida o pH foi ajustado para 2 com solução de ácido clorídrico (1N) e a espuma mantida sob repouso para decantação durante 24 horas. Em seguida foi novamente centrifugada a $10,08 \times 10^3$ g por 20 minutos a 5 °C (Beckman Coulter, Alegra X-22r) e o precipitado recolhido, seguido da neutralização com solução de NaOH (1N) até pH 7 e colocado em estufa a 50 °C para secagem. Utilizando 15 mg deste sólido, denominado de “biossurfactante bruto”, foi elaborada uma solução na concentração 1 mg.mL^{-1} (BARROS, QUADROS, & PASTORE, 2008) para as medidas de tensão superficial e suas respectivas diluições para todas as fermentações.

Em seguida, o restante do surfactante bruto foi pesado, triturado em almofariz, suspenso em solução de clorofórmio/metanol 81,25:18,75 (v/v) e filtrado em papel *Whatman* 11 μm (COSTA, 2005).

Após filtragem, o permeado foi seco em estufa a 50 °C. O sólido obtido após esta etapa foi denominado “biossurfactante semipurificado”, e o mesmo foi triturado e pesado.

Assim como com o surfactante bruto foi formulada uma solução na mesma concentração e realizadas análises de tensão superficial.

1.5 MEDIDAS DE PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Meio de cultura

Em intervalos de 24 até 72 horas amostras foram coletadas (15 mL) do meio de cultura, sendo centrifugadas (Beckman Coulter, Alegra X-22r) a $10,08 \times 10^3$ g por 10 minutos a 5 °C.

Bruto e semipurificado

Soluções de 1 mg.mL^{-1} foram formuladas com os biossurfactantes bruto e semipurificado.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1 PURIFICAÇÃO DO GLICEROL

Tratamento ácido

As amostras do glicerol obtidas da indústria de biodiesel, após o tratamento com ácido fosfórico, separam-se em três fases. Na superfície com coloração marrom escura estavam os ácidos graxos, no centro estava o glicerol e no fundo, os sais de fosfato, este último com a possibilidade de ser utilizado como adubo.

Tratamento térmico

Retirou-se em média 55,55 % (v/v) de metanol das amostras de glicerol pós tratamento ácido com o uso do rotaevaporador por 4 horas a 50 °C.

2.2 COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Uma amostra do meio de cultura contendo peptona (Himedia) e glicerol oriundo da produção de biodiesel foi analisada após tratamento térmico (20 minutos, 121 °C) para aproximação das condições utilizadas durante a fermentação.

Tabela 1 - Composição do meio de cultura com glicerol resíduo (mg/L).

| Nutriente | Concentração | Nutriente | Concentração | Nutriente | Concentração |
|-----------|--------------|-----------|--------------|-----------|--------------|
| P | 0.3 | Mg | 0.02 | Cu | <0.01 |
| K | 0.1 | S | 0.1 | Fe | <0.01 |
| Ca | <0.01 | B | 8.0 | Mn | <0.01 |
| Zn | 0.8 | C* | 9.1 | N* | 1.2 |
| Amonia | 43.1 | Nitrato | 4.3 | | |

*C e N em g/Kg

-Teor Total (P,K,Ca,Mg,S,B,Cu,Fe,Mn,Zn) - Extração nítrico-perclórico e determinação: ICP-OES. , N Kjeldahl, Umidade 65 °C. C org: Walkley-Black.

-Métodos de determinação (amoniacal e nitrato) – destilação

Comparando-se à composição do glicerol oriundo do biodiesel (Tabela 1, Capítulo 1), com o meio de cultura elaborado com o mesmo (Tabela 1), observa-se um aumento dos seguintes minerais: potássio, enxofre e nitrogênio. Esses valores podem ser atribuídos à adição de peptona ao meio de cultura. Os valores de cálcio e fósforo tem concentrações maiores no glicerol oriundo do biodiesel do que no óleo de soja, 11 e 10; 3,1 e 53 ppm, respectivamente, fazendo com que a utilização deste resíduo ainda seja mais interessante para processos biotecnológicos.

O meio de cultura desse trabalho apresentou concentração de nitrogênio de 1,2 ppm enquanto COOPER *et al.*, (1981) utilizaram 1360 ppm. Esse fator parece não ter influenciado nos resultados, possivelmente devido a concentração de amônia, 43,1 ppm, prevalecer sobre o nitrato, 4,3 ppm, (BARROS, 2007) e a limitação desse último, fator significativo na produção da surfactina (NITSCHKE, 2004), além do possível aumento da biodisponibilidade se tratando de uma fonte orgânica (peptona). Os demais minerais foram utilizados em maior concentração (Tabela 1) do que os utilizados por COOPER *et al.*, (1981) potássio (1140 ppm), ferro (0,21 ppm), magnésio (0,012 ppm) e cálcio (0,00027 ppm).

Ainda neste âmbito, não foi possível comprovar a relação do “Cooper’s medium” no meio de cultura com peptona e glicerol, já que os teores de ferro e manganês utilizados foram aquém do limite detecção, não obstante, a relação entre C/N foi similar.

COOPER *et al.*, (1981) reportaram a não significância da suplementação com caldo nutriente, extrato de levedura e aminoácidos ao meio contendo glicose. DAS, MUKHERJEE & SEN, (2009) obtiveram os melhores rendimentos de biosurfactante e biomassa com o glicerol entre as fontes de carbono analisadas. Portanto, o conhecimento em geral das rotas metabólicas dos micro-organismos é útil para delineamento experimental da pesquisa. Entretanto, a especificidade metabólica de cada linhagem é vital para a os rendimentos esperados.

2.3 CINÉTICAS DAS FERMENTAÇÕES – COMPARAÇÃO ENTRE OS MEIOS

A concentração de oxigênio dissolvido (O.D) no meio de cultura, como ilustrado nas Figuras 1 e 2, é um importante parâmetro para micro-organismos aeróbicos, pois afeta o metabolismo dos mesmos e consequente biossíntese de compostos, desejáveis e indesejáveis (DIAZ *et al.*, 1995).

A análise das Figuras 1 e 2 revela perfis semelhantes entre os ensaios com a mesma composição de meios de cultura.

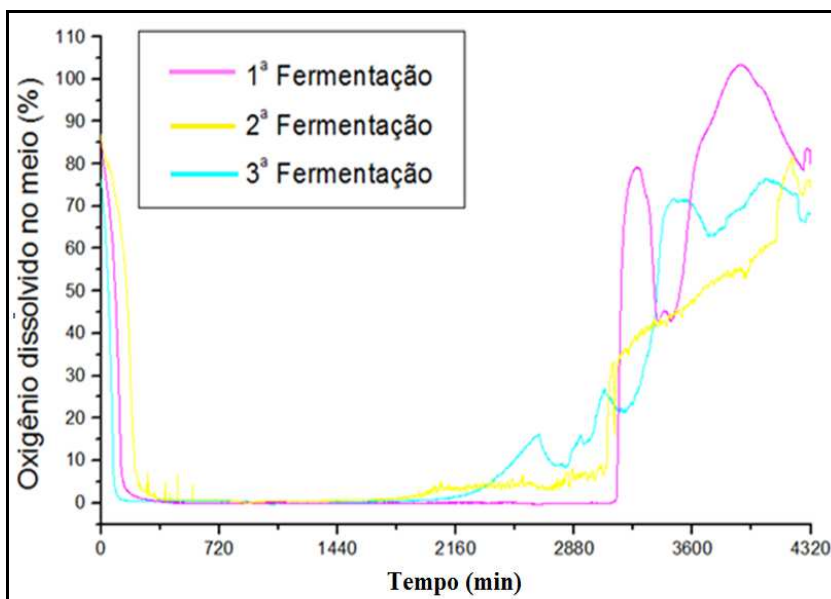


Figura 1 - Curva cinética do oxigênio dissolvido no meio para os ensaios realizados com glicerol padrão analítico.

A linhagem LB2b, como verificado nos ensaios realizados para a identificação do metabolismo aeróbico e/ou anaeróbico, oxidação/fermentação (O/F), é uma linhagem anaeróbia facultativa. Desta forma, mesmo em condições de anaerobiose, ela consegue se desenvolver, alterando seu metabolismo. As curvas de oxigênio dissolvido (O.D), ao redor de 0 % na maior parte do tempo durante os ensaios (glicerol padrão analítico e oriundo da produção de biosiesel), sugere que o fornecimento de oxigênio (2 L/minuto) para o meio de cultura (3,5 L) não foi suficiente para manter o processo estritamente aeróbio. Conseqüentemente, os micro-organismos podem ter oscilado entre o metabolismo oxidativo e fermentativo. Entretanto, mesmo que esta oscilação tenha ocorrido, houve produção de biosurfactantes, pois, segundo SHEPPARD & COOPER (1990), a transferência de oxigênio é parâmetro chave para a otimização e ampliação de escala.

As oscilações na parte final das fermentações (aproximadamente em 2880 minutos) na Figura 2, podem ter ocorrido devido à sucessivas lises celulares, que podem ter sido geradas devido à excesso de metabólitos e/ou escassez de substratos. Entretanto, como relatado por DIAZ

et al., 1995, o controle de O.D é difícil em biorreatores de escala laboratorial devido ao acúmulo de biomassa, síntese de produtos, aumento do volume de cultura, modificações no meio (*e.g* sintético ou complexo), condições da cultura (*e.g* pH e temperatura) ou amostragem que podem conduzir a imprevisíveis modificações na biodinâmica.

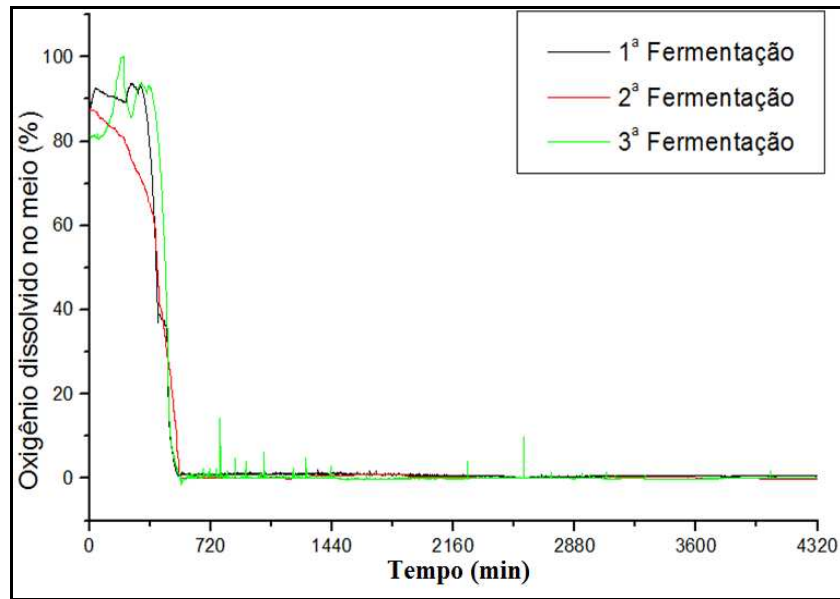


Figura 2 - Curva cinética do oxigênio dissolvido no meio para os ensaios realizados com glicerol oriundo da produção do biodiesel.

As curvas de O.D para os ensaios com glicerol padrão analítico apresentaram, em média, o intervalo de 220 à 3.500 minutos ao redor de 0 %, quando voltaram a elevados patamares, indicando uma saturação dos nutrientes ou alta concentração de metabólitos e consequente morte celular. Já nas fermentações utilizando o glicerol oriundo da produção de biodiesel, o início da curva de O.D ao redor de 0 % foi tardio, só alcançado em 540 minutos após o início do processo e estendendo-se até o final da fermentação.

Esta diferença pode ser resultante da presença de resíduos de metanol e/ou compostos da produção de biodiesel que interferem no metabolismo microbiano (RUSIG, 1974).

Para micro-organismo aeróbicos deve existir a relação entre o consumo de oxigênio e o crescimento e/ou multiplicação das células, como ilustrado pela Figura 3.

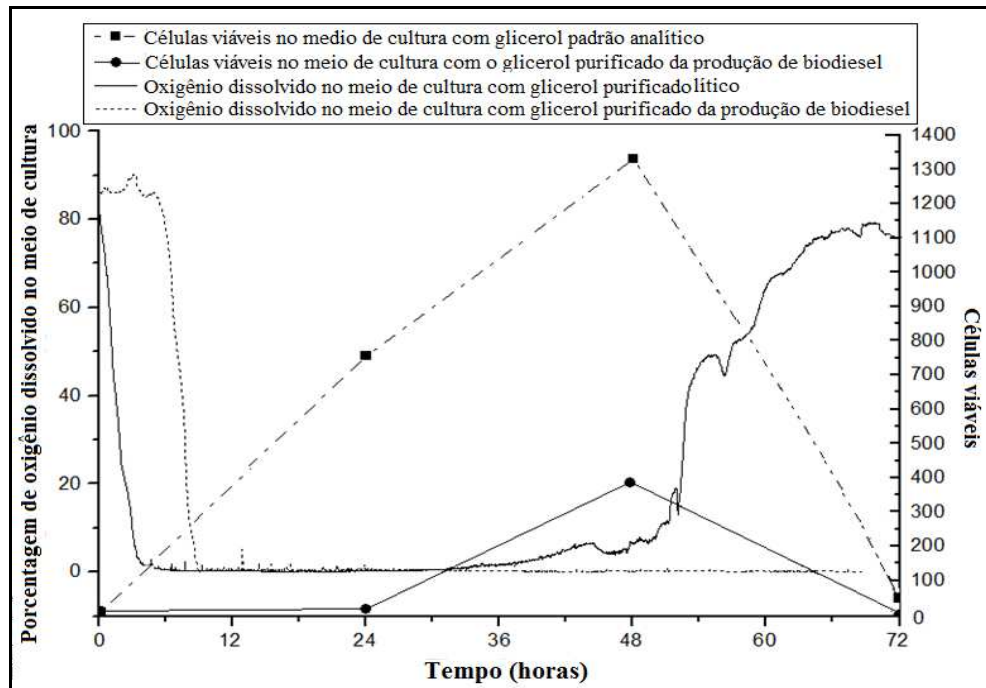


Figura 3 Curvas das fermentações (oxigênio dissolvido e células viáveis)

A análise dos dados apresentados na Figura 3 é coerente com as afirmações propostas anteriormente, já que altos valores de consumo de oxigênio indicam que as células podem ter aumentado de volume e/ou reproduzido, aumentando a biomassa. Porém, a biomassa não tem uma conformidade maior com a curva de oxigênio dissolvido devido à saída de espuma que inevitavelmente carrega células, dificultando a exatidão da biomassa produzida.

A adaptação da técnica de medida de glicerol (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, 2010) objetivou informar a quantidade do mesmo no meio e consequente consumo durante a fermentação, como ilustrado na Figura 4.

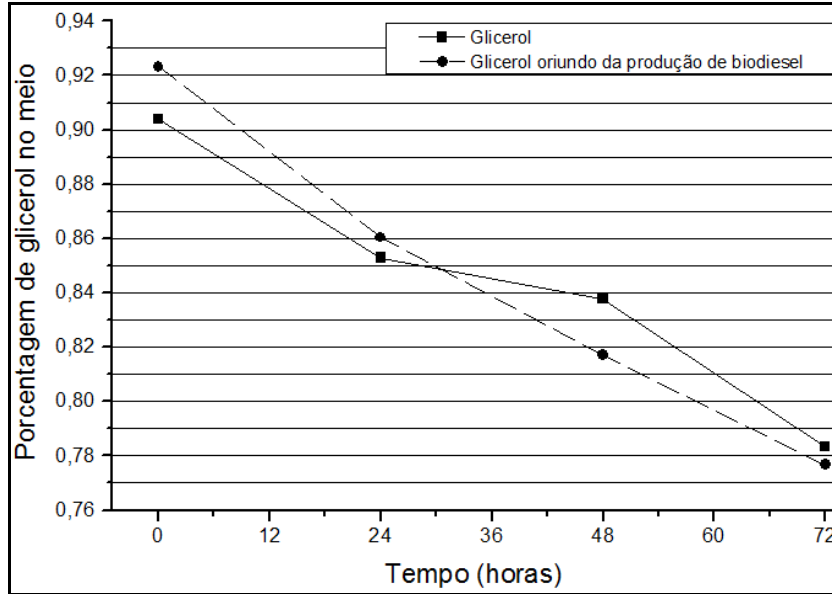


Figura 4 - Cinética das medias do consumo de glicerol no meio de cultura.

Como pode ser verificado na Figura 4, o perfil da porcentagem de glicerol em ambas as fermentações é similar e linear. Quando o glicerol é usado como fonte de carbono, ele é degradado principalmente em função da atividade da glicerol kinase (GK) (PASTERIS & STRASSER DE SAAD, 2005; RIVALDI; SARROUH & FIORILO, 2007), que é melhor expressada em condições aeróbicas e, portanto, a absorção deveria seguir a equação de *Michaelis–Menten* (PASTERIS & STRASSER DE SAAD, 2005; VIANA MARQUESA *et al.*, 2009). Devido à linearidade das curvas, comportamento oposto ao esperado, no qual a taxa de consumo do substrato é proporcional ao consumo de oxigênio para bactérias aeróbicas, talvez a linhagem utilizada não utilize o glicerol como fonte de carbono.

Os resultados das técnicas de cinética celular das fermentações com glicerol analítico e glicerol purificado da produção de biodiesel, adicionados ao meio de cultura, estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 - Células totais e viáveis

| Glicerol padrão analítico | | | |
|---|---|--|--|
| Tempo (horas) | Células totais por mL ($\times 10^8$) | Células viáveis por mL ($\times 10^8$) | biomassa (gramas de bactéria/L) |
| 0 | 1,630 | 44,35 | 2,994 |
| 24 | 747,11 | 159,86 | 4,571 |
| 48 | 1335,21 | 185,84 | 4,104 |
| 72 | 83,38 | 176,89 | 6,541 |
| Glicerol putificado da produção do biodiesel | | | |
| 0 | 16,2 | 4,875 | 1,16 |
| 24 | 511,36 | 12,85 | 2,282 |
| 48 | 787,38 | 355,25 | 4,278 |
| 72 | 727,78 | 20,875 | 2,697 |

É previsto que em diferentes proporções, o número de células totais sempre aumente, pois, independente da taxa de reprodutibilidade das células durante o processo fermentativo o número absoluto de células totais é sempre igual ou maior. Entretanto, fatores como deterioração do branco (células totais), temperatura, cubeta e a centrifugação de componentes do meio de cultura como peptona, podem ter conferido erros, além de que neste trabalho deve se considerar o arraste de células (viáveis e mortas) durante a retirada de espuma. A análise dos dados revela que esta tendência crescente aconteceu. Entretanto, como supracitado, os valores podem ter sido subestimados. Entre as técnicas utilizadas, as curvas de biomassa estão condizentes com o esperado, fato não observado nas células totais, onde os valores são menores que seus anteriores, e que apresenta grande diferença com relação aos ensaios com glicerol analítico.

A técnica de células viáveis geralmente é a mais utilizada, pois resulta sobre os micro-organismos metabolicamente ativos. Além disso, informam sobre ocorrência de contaminação. Os ensaios parecem estar condizentes com a curva de oxigênio dissolvido, para os ensaios com glicerol padrão analítico.

A análise da Tabela 2 demonstra que altos valores de UFC no meio de cultura foram alcançados, as mesmas, apresentam formato semelhante com pico ao redor de 48 horas e queda em 72 horas.

Os maiores valores das concentrações de biomassa, $6,541 \text{ g.L}^{-1}$ e $4,278 \text{ g.L}^{-1}$ para os ensaios com glicerol padrão analítico e glicerol oriundo da produção de biodiesel, respectivamente, foram próximos aos obtidos por DAS, MUKHERJEE & SEN, (2009) de 5 g.L^{-1} . Entretanto, o último valor dos ensaios com glicerol padrão analítico não é condizente com a curva de oxigênio dissolvido da Figura 3.

A análise da cinética de crescimento dos ensaios com glicerol oriundo da produção de biodiesel revela um retardo e menor desenvolvimento celular. Essa diferença pode ter sido em função de resíduos de metanol absorvidos pelos micro-organismos que então o oxidam enzimaticamente (álcool desidrogenase) formando formaldeído que conseqüentemente altera o ácido desoxirribonucléico (ADN) microbiano podendo levá-lo a processos de estaticidade ou morte (RUSIG, 1974).

As tensões superficiais dos ensaios com glicerol padrão analítico e oriundo da produção do biodiesel foram, em média, $34,32 \text{ mN/m (+/-}3,04)$ e $37,64 \text{ mN/m (+/-}4,27)$, respectivamente. Esses baixos valores de tensão superficial representam o potencial dos biossurfactantes mesmo sem processos de purificação.

As espumas foram coletas ao final de cada fermentação, centrifugadas e seus volumes medidos (Tabela 3).

Tabela 3 - Volumes de espumas produzidos.

| | Repetição 1 | Repetição 2 | Repetição 3 |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Ensaio com glicerol padrão | 730 | 640 | 600 |
| Ensaio com glicerol resíduo | 321 | 387 | 372 |

A análise de variância (ANOVA) com 95 % de confiança (Tabela 4) foi a técnica estatística escolhida para verificar se existe indicativos de diferença entre os volumes de espuma produzidos com os meios com glicerol padrão analítico e glicerol purificado da produção do

biodiesel. O teste Tukey foi utilizado para confirmação dessa diferença. Os valores de F tabelado e da diferença mínima significativa (teste Tukey) estão apresentando no rodapé da Tabela 4.

Tabela 4 - ANOVA para os volumes de espuma.

| Fonte de variação | Soma de quadrados | Graus de Liberdade | Quadrados médios | Fcalculado |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------|
| Tratamentos | 132016,6667 | 1 | 132016,7 | 46,89479605 |
| Resíduo | 11260,66667 | 4 | 2815,167 | |
| Total | 143277,3333 | 5 | | |

*F tabelado 7,70 (95%) *Teste Tukey para significância de 5% d.m.s = 160,96

A diferença entre as médias dos volumes de espuma (296,66L) é maior que a diferença mínima significativa (d.m.s.). Portanto, existe diferença significativa entre os volumes de espuma produzidos utilizando o glicerol purificado oriundo da produção de biodiesel e o glicerol padrão analítico.

As tensões superficiais das espumas liquefeitas (Tabela 5) dos ensaios com o glicerol padrão analítico e purificado da produção do biodiesel foram analisadas estatisticamente (Tabela 6).

Tabela 5 - Tensão superficial das espumas liquefeitas.

| | Repetição 1 | Repetição 2 | Repetição 3 |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Ensaio com glicerol padrão | 35,34 | 32,28 | 35,36 |
| Ensaio com glicerol resíduo | 39,77 | 37,8 | 35,36 |

Tabela 6 - ANOVA para tensão superficial das espumas liquefeitas.

| Fonte de variação | Soma de quadrados | Graus de liberdade | Quadrados médios | Fcalculado |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-------------------------|-------------------|
| Tratamentos | 16,500 | 1 | 16,500 | 4,113 |
| Resíduo | 16,044 | 4 | 4,011 | |
| Total | 32,544 | 5 | | |

*F tabelado 7,70 (95%)

Como $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$, não existe evidência estatística de diferença entre as tensões superficiais das espumas liquefeitas. Portanto, possivelmente a utilização do resíduo não influencia no tipo de biossurfactante produzido. Entretanto, apresenta significância no volume de espuma produzido e consequente rendimento destes bioprodutos, como foi confirmado pela ANOVA de biossurfactantes bruto.

COOPER, *et al.*, (1981) mediram a produção de biossurfactantes utilizando como parâmetros volume de espuma colapsada e tensão superficial da diluição micelar crítica (CMD^{-1}). Os volumes de espuma produzidos nas fermentações com o resíduo, foram em média de 350 mL, para os ensaios com glicerol padrão analítico de 656,66 mL.

As espumas dos ensaios com glicerol padrão analítico, após precipitação ácida seguida de centrifugação, obtiveram massas de biossurfactante bruto em média de 5,16 g e, após extração por solventes (biossurfactante semipurificado) igual a 1,04 g, portanto, com rendimentos, respectivamente de, 7,85g/L e 1,58g/L de espuma. Considerando-se os rendimentos médios de biossurfactante semipurificado em função do volume do meio tem-se 0,30 g/L, valor aquém aos de GHOJAVAND *et al.*, (2008) 0,5 g/L e de BARROS, (2007) 0,64 g/L.

O valor médio dos volumes de espuma obtidos nos ensaios com glicerol purificado da produção de biodiesel foi 360 mL, sendo a massa de biossurfactante bruto de 1,76 g e a de semipurificado igual 0,41 g, respectivamente, rendimentos de 4,89 g/L e 1,13 g/L. Para os rendimentos médios de biossurfactante semipurificado em função do volume do meio, obteve-se o valor foi de 0,12 g/L.

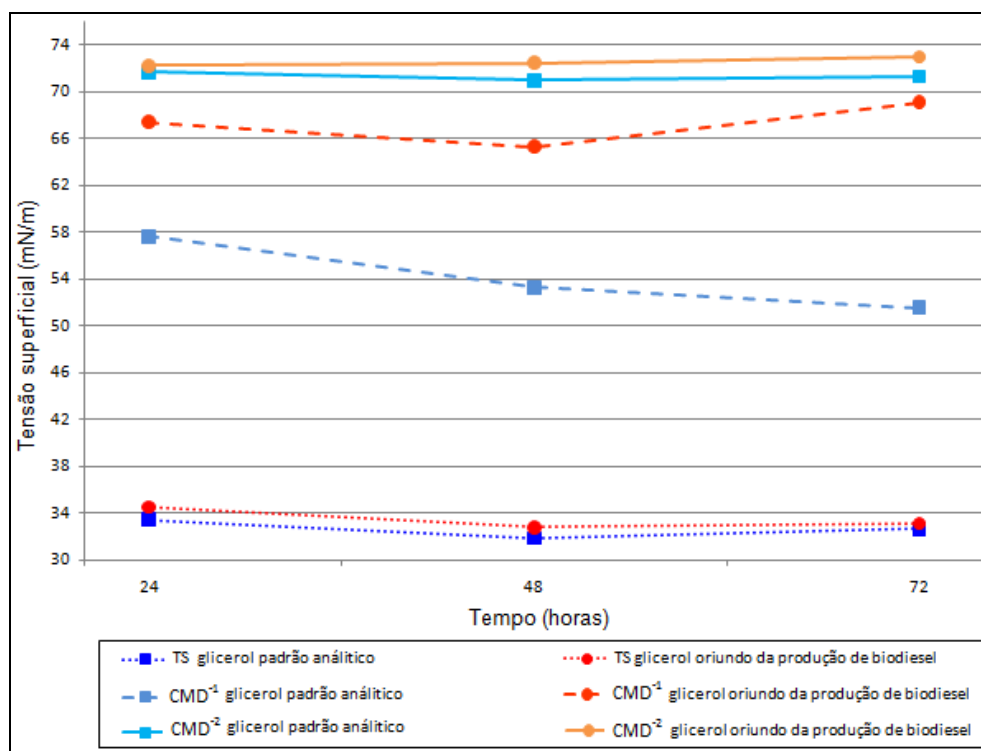


Figura 5 - Tensões superficiais (TS, CMD¹ e CMD²) do meio de cultura.

Os valores de tensão superficial dos meios de cultura (Tabela 5) foram semelhantes para os ensaios com o glicerol padrão analítico e oriundo da produção de biodiesel. Entretanto, a análise das curvas de tensão superficial da diluição micelar crítica 1/10 (CMD¹) revela diferença entre os dois processos fermentativos, indicando uma maior concentração de biossurfactantes nos ensaios com glicerol padrão analítico, sendo condizente com as curvas de O.D e crescimento celular, e, conseqüentemente, produção de metabólitos.

A análise da Figura 6 de tensão superficial (TS) demonstra a menor redução de tensão, para todas as análises TS, diluição micelar crítica 1/10 (CMD¹) e diluição micelar crítica 1/100 (CMD²) nos ensaios realizados com o glicerol oriundo da produção de biodiesel, o que, indica

maior concentração de biossurfactantes. Esses resultados eram esperados, já que o mesmo apresentou maior concentração micelar crítica (CMC), Figura 7. Esses resultados podem ser explicados também pelo maior grau de impureza e diferentes proporções produzidas de surfactina/iturina em função da presença de compostos como o metanol.

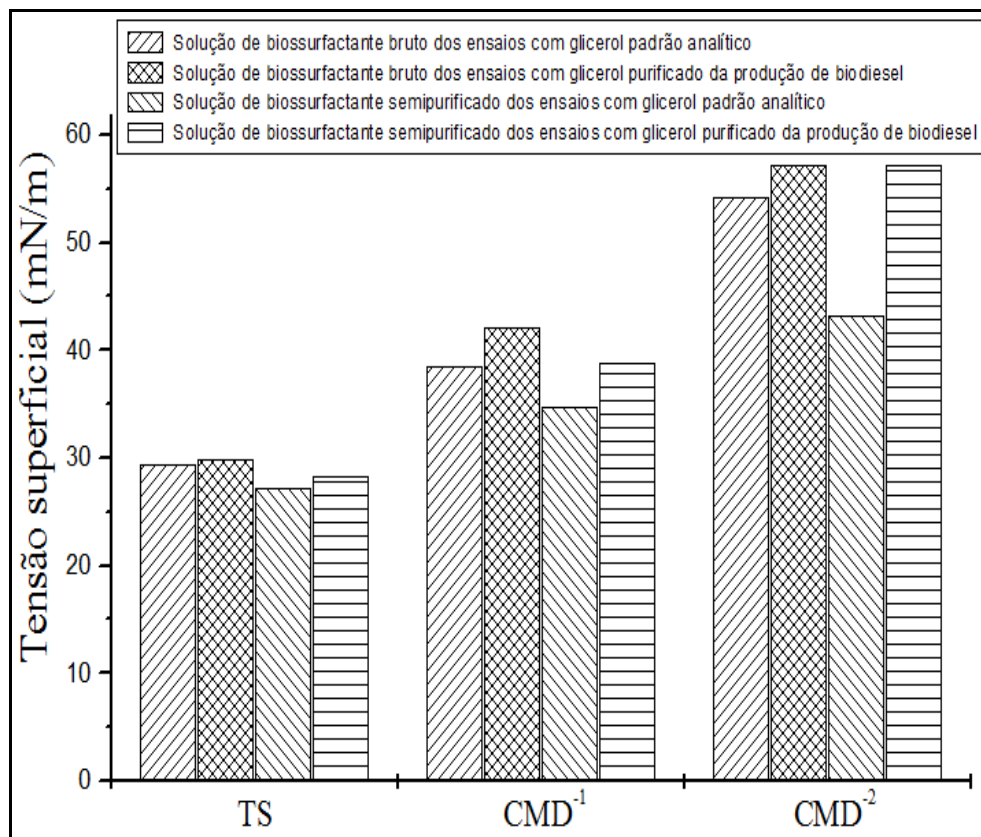


Figura 6 - Tensões superficiais e suas respectivas diluições para soluções (1 mg.mL^{-1}) preparadas com biossurfactante bruto e semipurificado.

2.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MICELAR CRÍTICA

Soluções com diferentes concentrações de biossurfactantes semipurificados dos ensaios com glicerol padrão analítico e resíduo foram preparadas e suas respectivas tensões superficiais medidas. O ponto de inflexão da curva indica a concentração micelar crítica (Figura 7).

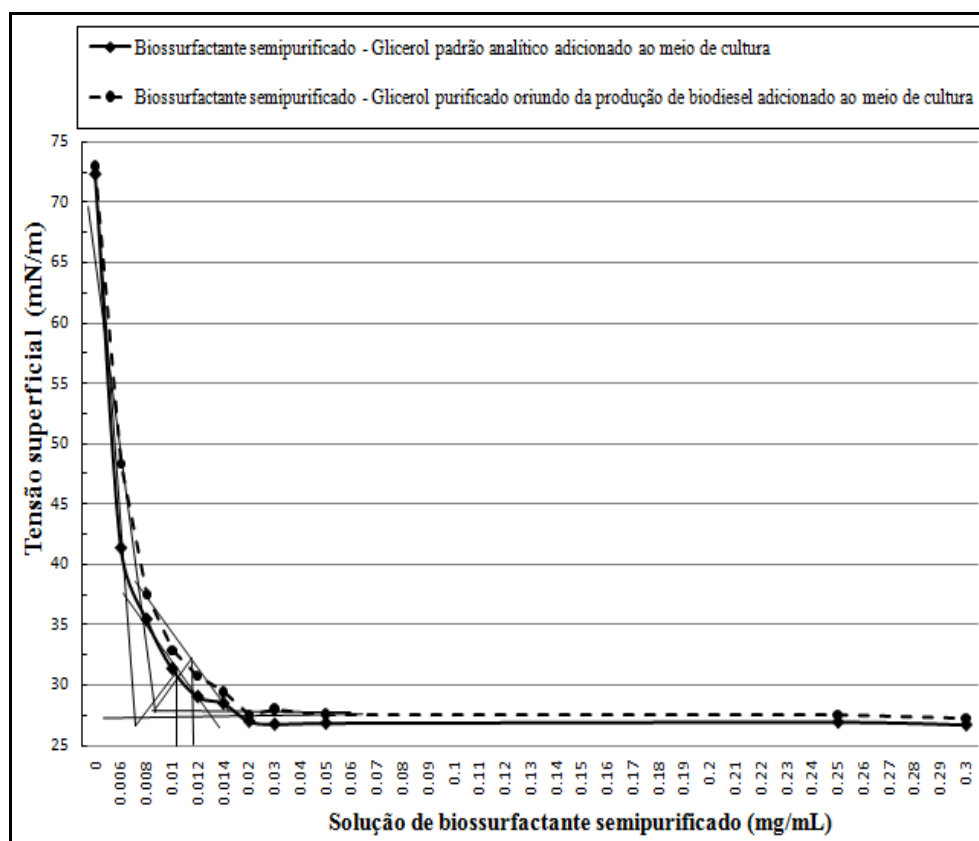


Figura 7 - Determinação da concentração micelar crítica (CMC) das frações do biossurfactante semipurificado das fermentações com glicerol padrão analítico e oriundo da produção de biodiesel, através da medida da tensão superficial (mN/m) de diluições sucessivas.

A CMC do biossurfactante dos ensaios com glicerol padrão analítico foi de 0,011 mg/mL e para as fermentações com glicerol oriundo da produção de biodiesel foi de 0,019 mg/mL, sendo estes valores semelhantes aos resultados encontrado na literatura como de BARROS, (2007), 0,011 mg/mL; COSTA, (2005), 0,01 mg/mL e NITSCHKE, (2004) 0,011 mg/mL. Tais resultados foram ainda melhores que os obtidos por PEYPOUX, BONMATIN & WALLACH, (1999), 0,02

mg/mL; COOPER *et al.*, (1981), 25 mg/mL, além de enquadrar-se na definição de MULLIGAN & GIBBS, (1993) com CMC na faixa de 0,001 a 2 mg/mL.

A análise das curvas pelo método de SHEPPARD & MULLIGAN (1987) revela perfis semelhantes. Entretanto, nos ensaios com glicerol padrão analítico, obteve menores valores de CMC. Tal diferença pode ser um indicativo de pureza, qualidade ou erros sistemáticos entre os ensaios.

CONCLUSÃO

A produção de biossurfactantes com o meio de cultura composto por peptona e glicerol se mostrou viável, provavelmente, devido à suplementação dos fatores metabólicos do micro-organismo. Assim, a peptona pode ter provido à linhagem LB2b com aminoácidos, enquanto o glicerol aumentado a permeabilidade da membrana e fornecido minerais.

A cinética fermentativa utilizando o glicerol padrão analítico e resíduo da produção de biodiesel apresentou conformidade em parâmetros como tensão superficial (TS , CMD^{-1} e CMD^{-2}), consumo de glicerol e concentração micelar crítica (CMC). Entretanto, em outros parâmetros, tais como curva cinética de oxigênio dissolvido, biomassa, volume de espuma produzido, células viáveis e totais, a análises dos dados são díspares. Talvez a linhagem LB2b tenha que se adaptar ao meio com o glicerol resíduo, devido à presença de compostos como metanol, aldeídos etc., que podem comprometer algumas vias metabólicas ou mesmo alterar geneticamente o ADN das bactérias, como por exemplo, o formaldeído que é produto da oxidação do metanol (RUSIG, 1974). Esta adaptação pode ocorrer com a formação de rotas metabólicas paralelas de produção de biossurfactantes, ou o micro-organismo necessita previamente metabolizar tais compostos indesejáveis para posteriormente desenvolver-se.

O consumo similar e linear de glicerol, em ambos ensaios, pode indicar que o transporte deste composto não é ativo. Entretanto, pode ter sido significativo no aumento da permeabilidade da membrana plasmática (RIVALDI; SARROUH & FIORILO, 2007) e consequente aumento na absorção de nutrientes.

Os volumes de espuma obtidos nos ensaios com glicerol padrão analítico e oriundo da produção de biodiesel foram estatisticamente significantes, o que indica a necessidade de outras etapas de purificação do glicerol resíduo. As quantidades de biossurfactante bruto foram aquém, das encontradas na literatura. Entretanto, em relação aos biossurfactante semipurificado, os valores foram superiores.

Dessa forma, a utilização do glicerol resíduo da produção de biodiesel pela linhagem LB2b é possível, não como fonte de carbono e energia, mas, como um significativo coadjuvante.

OBRAS CONSULTADAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETROLEO. Disponível em:

<http://nxt.anp.gov.br/nxt/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2004/novembro/ranp%2042%20-%202004.xml>

[Acesso em : 15 de Janeiro de 2009]

ANDRADE, N. B. J. C.; GODINHO, O. E. S.; BARONE, J. S. - **Química analítica quantitativa elementar.** Capítulo 4, p.234-258, 2001.

BARROS, F. F. C. - **Estudo das variáveis de processo e ampliação de escala na produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* em manipueira.** 102 f.. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil, 2007.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. - Propriedades emulsificantes e estabilidade do biosurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciências e Tecnologia de Alimentos.**, Campinas. 2008, v.28, n.4, p.979-985.

BIODISELBR. Disponível em:

<http://www.biodieselbr.com/blog/vedana/2006/biodiesel-oleo-pinhao-manso/>

[Acesso em: 2 de Outubro de 2010]

CAMEOTRA, S.; MAKKAR, R. S. - Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology Biotechnology.**, v.50, n.3, p.520-529, 1998.

CAMPBELL, C. J.; LAHERRERE, J. H. - The end of cheap oil. **Science American**, v.3, p.78-83, 1998.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B.; KOSARIC, N. - Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied Environment Microbiology.** v.42, p. 408-412, 1981.

COSTA, G. A. N. - **Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações.** f.87. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil, 2005.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. - Substrate dependent production of extracellular biosurfactant by a marine *bacterium*. **Bioresource Technology**, v .100, p. 1015 – 1019, 2009.

DIAZ, C.; DIEU, P.; FEUILLERAT, C.; LELONG, P.; SALOME, M. - Adaptive predictive control of dissolved oxygen concentration in a laboratory-scale bioreactor. **Journal of Biotechnology**, v.43, n.1, p. 21-32, 1995.

GHOJAVAND, H.; VAHAHBZADEH, F.; ROAYAEI, E.; SHAHRAKI, A. K. - Production and properties of biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). **Journal of Colloids and interface Science**, n. 1-2, v. 324, p. 172-176, 2008.

MULLIGAN, C. N.; GIBBS, B. F. - Factors influencing the economics of biosurfactants. In: Biosurfactants: production, properties, applications. Kosaric, N. ed., **Marcel Decker Inc., New York**, p. 392-371, 1993.

NITSCHKE, M. - **Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato**. f.88. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil, 2004.

RIVALDI, J. D.; SARROUH, B. F.; FIORILO, R. - Glicerol de biodiesel - Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel, **Biociência & Desenvolvimento**, n. 37, p. 44 – 51, 2007.

PASTERIS, S.E. STRASSER DE SAAD, A.M. - Aerobic glycerol catabolism by *Pediococcus pentosaceus* isolated from wine. **Food. Microbiology**, v. 22, p. 399–407.2005.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. - Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.51, p. 553-563, 1999.

ROCHA, M. V. P.; MENDES, J. S.; GIRO M. E.; GONÇALVES, L. R. B. - ESTUDO DA ESTABILIDADE DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Pseudomonas aeruginosa* EM SUCO DE CAJU, **4º PDPETRO ,Campinas-SP, 6.3.0232-1**, 21-24 de outubro de 2007.

RUSIG, O. - **Efeito sinérgico dos gases de brometo de metila e óxido de etileno na esterelização de pimenta preta em grão**. f..52. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de alimentos, Campinas, Brasil, 1974.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI. - Biotecnologia industrial (vol.2). São Paulo-SP, (Ed) Edgard Blucher Ltda. Capítulo 14, 2001.

SHEPPARD, J. D.; COOPER, D. G. - The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth. **Applied Microbiology and Biotechnology**, n. 1, v. 35, p. 72-76, 2004.

SILVA, C. F. - **Produção biológica de surfactant por *Serratia marcescens***. f.92. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil, 2002.

VIANA MARQUESA, D.A., OLIVEIRAA, R.P.S., PEREGO, P., PORTO, A.L.F., PESSOA JR, A., CONVERTI, A.- Kinetic and thermodynamic investigation on clavulanic acid formation and degradation during glycerol fermentation by *Streptomyces* DAUFPE 3060. **Enzyme. Microbiology Technology**, v. 45,p. 169-173, 2009.

CAPÍTULO 4:

PRODUÇÃO DE DIACETIL E 2,3 BUTANODIOL, INTEGRADA AO PROCESSO FERMENTATIVO NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES POR *BACILLUS SUBTILIS*

INTRODUÇÃO

A utilização de resíduos agroindustriais como substrato para processos fermentativos concilia a produção de compostos com alto valor agregado, sustentabilidade ambiental e economia em tratamentos visando o descarte adequado dos mesmos. Além disso, o uso de sistemas biotecnológicos vem se expandindo (ZABORSKY, 1995) com possibilidades de pesquisas como seleção de micro-organismos, utilização de novos substratos, modificações em processos, etc.

Visto que os micro-organismos durante seu desenvolvimento geram compostos resultantes de suas vias metabólicas, a bioprodução integrada passa a ser uma opção para a indústria aumentar seu lucro, caso as condições utilizadas resultem em rendimentos economicamente viáveis e o sistema de extração não comprometa a produção inicial.

A produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* com retirada da espuma pela parte superior do fermentador se enquadra nas condições supracitadas (Figura 2), excetuando-se a verificação das condições econômicas, pois o meio de cultura é descartado após finalização do processo fermentativo, e o mesmo pode conter compostos como enzimas (BON, FERREIRA & CORVO, 2008; JYOTI & AVNEET, 2006; SCHULZ, BONELLI & BATISTA, 2005), antibióticos, antioxidantes etc., além dos compostos voláteis onde apenas a recuperação do fase volátil é requerida.

Entre os bioprodutos citados acima as enzimas tem uma das maiores participações no mercado mundial - em 2006 foi estimado em cerca de US\$ 1,5 trilhões e com tendência em crescer 5 a 10 % por ano, segundo JYOTI & AVNEET, (2006). Aromas, por sua vez, tem a mesma estimativa - 9,5 bilhões de dólares e taxa de crescimento de 5,7 % entre 1990 e 1995, segundo KRINGS & BERGER, (1998).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi identificar a produção de proteases e amilases pela linhagem LB2b, além de caracterizar alguns compostos de aromas formados durante a produção de biossurfactantes (Capítulo 2).

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 ENZIMAS

1.1.2 Preservação das linhagens e preparo do inóculo

A linhagem LB2b foi mantida em tubos de ágar nutriente inclinado sob refrigeração (4 a 6 °C) e em períodos regulares, repicadas para outros tubos e placas, incubados a 30 °C por 24 h e armazenados.

1.2 IDENTIFICAÇÃO QUALITATIVA DA PRODUÇÃO ENZIMAS

Os meios de cultura para os ensaios visando a identificação de lipase, protease e amilase foram preparados e esterilizados em autoclave (121 °C por 20 minutos) e adicionados à placas de Petri estéreis. Em seguida, a linhagem LB2b foi inoculada no centro das placas de Petri com agulha de platina e a cada 24 horas, num total de 72 horas, foi medido, vertical e horizontalmente, o diâmetro da colônia e halo formados.

Lipase

A composição do meio está indicada na Tabela 1, onde apenas a rodamina B (termolábil) foi adicionada ao mesmo depois de ter sido esterilizada em filtro *Whatman* 11 µm.

Tabela 1 - Composição do meio para a indentificação de lipase
(SHUEN-FUH, CHIEN-MING & YING-CHIEH, 1995)

| Componentes | g.L⁻¹ |
|--------------------------------------|-------------------------|
| Azeite de oliva | 0,2 |
| Peptona | 0,03 |
| Extrato de levedura | 0,02 |
| K ₂ HPO ₄ | 0,02 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,01 |
| Ágar | 0,18 |
| Na ₂ CO ₃ | 0,1 |
| Rodamina B | 0,0001 |

Proteases, amilases

A formulação utilizada para a identificação de protease (GIONGO, 2006) foi adaptada para a identificação de enzimas amilolíticas, sendo para isso substituído na mesma proporção o leite em pó desnatado e amido solúvel.

Tabela 2 - Composição do meio para a indentificação de proteases (GIONGO, 2006).

| Componentes | g.L⁻¹ |
|-----------------------|-------------------------|
| Peptona | 5 |
| Extrato de carne | 3 |
| Leite em pó desnatado | 10 |
| Ágar | 12 |
| Água destilada | 1000 |

1.3 AROMAS

1.3.1 Meios de cultura

Voges proskauer – (VP)

A linhagem LB2b foi inoculada em três tubos de ensaio contendo caldo VERMELHO DE METILA-VOGES PROSKAUER (VM/VP) estéril e incubados por 30 horas a 30 °C. Em seguida, foi adicionado 0,6 mL de alfa-naftol a 5 % e 0,2 mL de KOH a 40 % e realizada leitura.

Glicerol padrão analítico

O meio de cultura contendo peptona bacteriológica (Himedia) 10 g.L⁻¹ e glicerol padrão analítico 10 g.L⁻¹ (Synth) foi previamente ajustado para pH 7 com solução de NaOH 0,05 e esterilizado.

Glicerol oriundo da produção de biodiesel

As amostras de glicerol da produção de biodiesel foram ajustadas com ácido fosfórico (Synth) e permaneceram em pH entre 3 e 4 durante 24 horas. A fase central foi separada com o uso do funil de decantação e em seguida colocada no rotaevaporador por 4 horas a 50°C (Fischer Scientific-05-ST 1 P-B) para a retirada do metanol (RIVALDI, SARROUH & FIORILO, 2007). O produto remanescente foi utilizado na elaboração dos meios de cultura visando a comparação do mesmo com os ensaios que utilizaram o glicerol padrão analítico.

1.3.2 Preparo do inóculo

Os inóculos foram preparados a partir de alçadas de culturas retiradas de placas de ágar nutriente contendo as linhagens de *Bacillus*, e transferidas para erlenmeyers contendo caldo nutriente (peptona bacteriológica 5 g.L⁻¹ (Himedia) e extrato de carne 3 g.L⁻¹ (Biolife) estéril. A seguir, foram incubados a 150 rpm e 30 °C, durante 24 h, em agitador rotatório (Shaker Tecnal Te-480). Após este período, foi realizada a diluição com caldo nutritivo estéril até se obter uma densidade óptica de 0,5, medida a 660 nm (ROCHA *et al.*,(2007). Posteriormente, foram retiradas alíquotas de 7,0 mL e 245 mL (7 % v/v do meio), respectivamente, para os experimentos com erlenmeyers e fermentador de bancada.

1.3.3 Condições das fermentações

Nos ensaios com erlenmeyers, o volume de 100 mL do meio de cultura foi adicionado em frascos de vidro e deixados em agitação (Shaker Tecnal Te-480) a 150 rpm e 30 °C por 24 horas. Em seguida, foram analisados no cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massa (CG-EM), (Figura 1). As mesmas condições foram utilizadas nos testes com o uso dos padrões em soluções aquosa, visando a identificação dos tempos de retenção (T.R) e dos experimentos para análise da influência do meio de cultura e células (branco), em que instantes após a inoculação os frascos foram esterilizados e em seguida adicionados de soluções concentrada de diacetil.

Para os experimentos em fermentador de bancada foram utilizadas as seguintes condições 150 rpm, pH inicial 7, aeração 2L/minuto, 30 °C e volume de meio 3,5 litros.

1.3.4 Métodos de extração dos compostos voláteis

Nos ensaios com erlenmeyers foram retiradas alíquotas (20 mL) durante a fermentação, colocadas em frascos de vidro suportados por um sistema isotérmico a 30 °C e

agitação constante de 15 rpm. Em seguida a fibra foi exposta por 30 minutos para posterior análise no cromatógrafo, Figura 1.

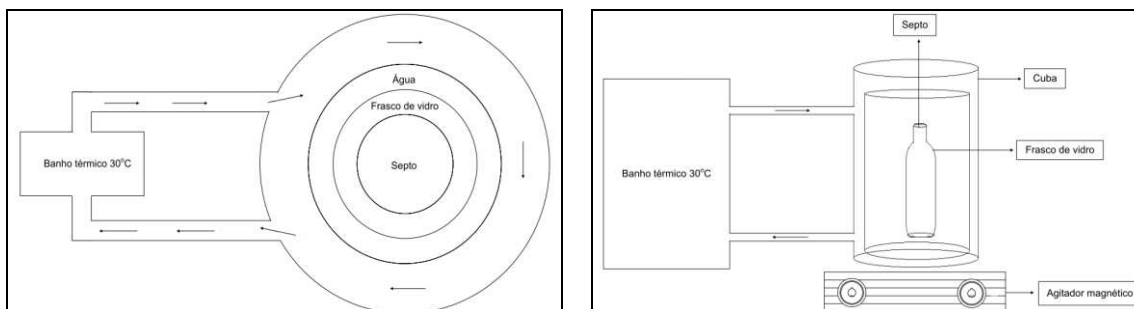


Figura 1 – Ilustração do sistema de coleta de voláteis para os ensaios erlenmeyers

Nos ensaios com o fermentador de bancada, foi acoplado um sistema composto por rotâmetro, câmara de vidro com septo de teflon e válvula, utilizados para a coleta dos aromas com uso de uma fibra de microextração em fase sólida (MEFS), Figura 2. Durante a extração, a taxa de entrada de ar foi alterada para (0,5 L/minuto) para captação dos voláteis pela fibra.

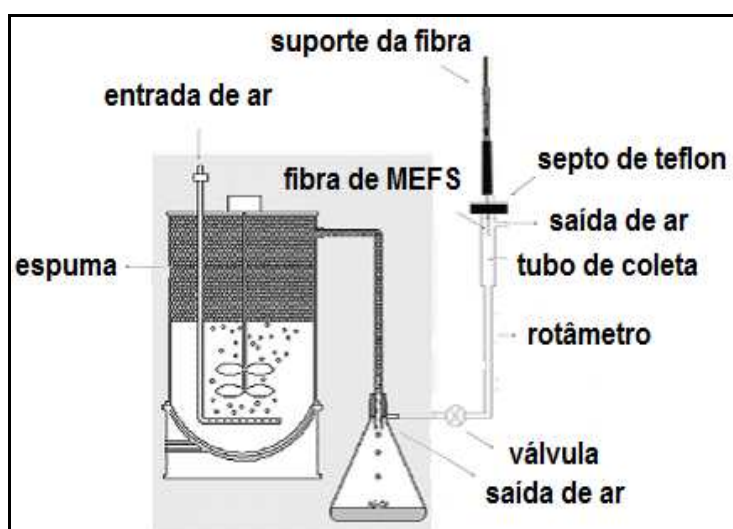


Figura 2 – Ilustração do sistema de coleta de voláteis, acoplado ao fermentador, adaptado de BARROS *et al.*, (2009)

1.3.5 Condições das corridas

Cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (CG-DIC)

Os compostos voláteis foram analisados por um cromatógrafo (Agilent - modelo 7890A) com detector de ionização de chama (DIC) e uma coluna HP-5 (Technologies Agilent, 30 mx 0,320 mm de diâmetro, espessura x 0.25 μ m).

A dessorção procedeu na porta de injeção do cromatógrafo em 0,75 minuto a 250 °C, com a válvula de purga desligada (modo splitless). A temperatura do forno era de 40 °C por 1 minuto, programada para aumentar a 3 °C.min⁻¹ até 100 °C e mantida por 4 minutos. Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste com uma vazão de 1 mL.min⁻¹. A temperatura do injetor e detector foi 250 °C, após dessorção, a fibra permaneceu mais 10 minutos no porta de injeção para eliminar qualquer analítico residual entre as amostras.

Cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG-EM)

Análises foram realizadas em um sistema CG-EM (Agilent 890A), nas seguintes condições: coluna HP-5 MS coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i x 0,25 mm - J & W Scientific - EUA), modo de injetor splitless, temperatura do injetor 250 °C, tempo de purga de 1 minuto, fluxo de purga 20 mL.min⁻¹, fluxo de hélio (1. min): 1,0 mL.min⁻¹, forno de 40 °C; 3 °C.min⁻¹ até 100 °C por 4 minutos, temperatura de transferência de linha de 250 °C, a energia de impacto: 70 eV, 35-350 m/z. A identificação dos componentes foi feita por espectrometria de massas de acordo com as normas de ADAMS (2007) e a bibliotecas de banco de dados espectrais de NIST (2005).

1.4 CURVAS ANALÍTICAS E CINÉTICA DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS PRODUZIDOS

Soluções com concentrações de 1, 5, 10, 15, 20, 25 e 30 mg.L⁻¹ dos padrões diacetil (Sigma-aldrich) e 2,3 butanodiol (Sigma-aldrich) foram preparadas com água deionizada. Em seguida, alíquotas de 20 mL foram adicionadas em frascos, para posterior exposição da fibra (MEFS) e conseqüente extração, Figura 1. As curvas de calibração foram então calculadas de acordo com as área dos picos e respectiva concentração.

2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ENZIMAS

Os meios de cultura, elaborados com com ágar e seus respectivos indicadores leite em pó e azeite, (Figura 3).

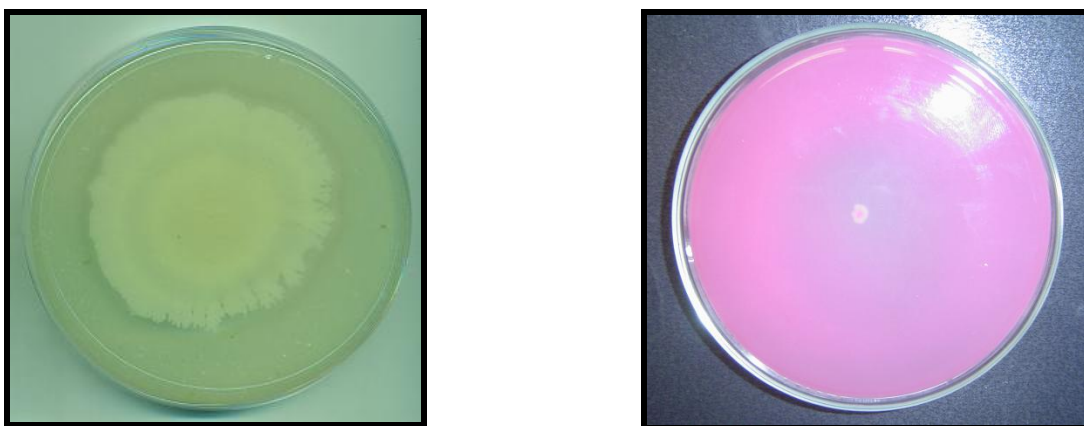


Figura 3 - Placas de ágar leite (esquerda) e ágar rodamina (direita), inoculadas com a linhagem LB2b.

A linhagem LB2b apresentou crescimento celular semelhante nos meios ágar leite e amido solúvel, com formação nítida de halos, que por sua vez indicam a produção extracelular das enzimas. Entretanto, os ensaios com ágar rodamina, não obtiveram crescimento celular e formação de halo indicando que a linhagem não produz lipase ou que a enzima produzida está fora das condições ótimas de atividade.

Portanto, tendo sido verificada a produção de enzimas pela linhagem LB2b, mesmo que de maneira qualitativa, torna-se pertinente trabalhos subsequentes com a produção destes metabólitos em fermentação líquida (shaker e fermentador de bancada).

2.2 AROMAS

Os resultados para os ensaios com o meio voges proskauer (VP) foram positivos (vermelho), estando condizentes com a literatura descrita para a espécie *Bacillus subtilis* (NAKAMURA, ROBERTS & COHAN, 1999) e validaram a possibilidade da produção de bioprodutos como diacetil, acetil e 2,3 butanodiol. Estas substâncias, apesar de serem estruturalmente simples, a produção por síntese química de diacetil e acetoina não é comum (CARVALHO, 1999).

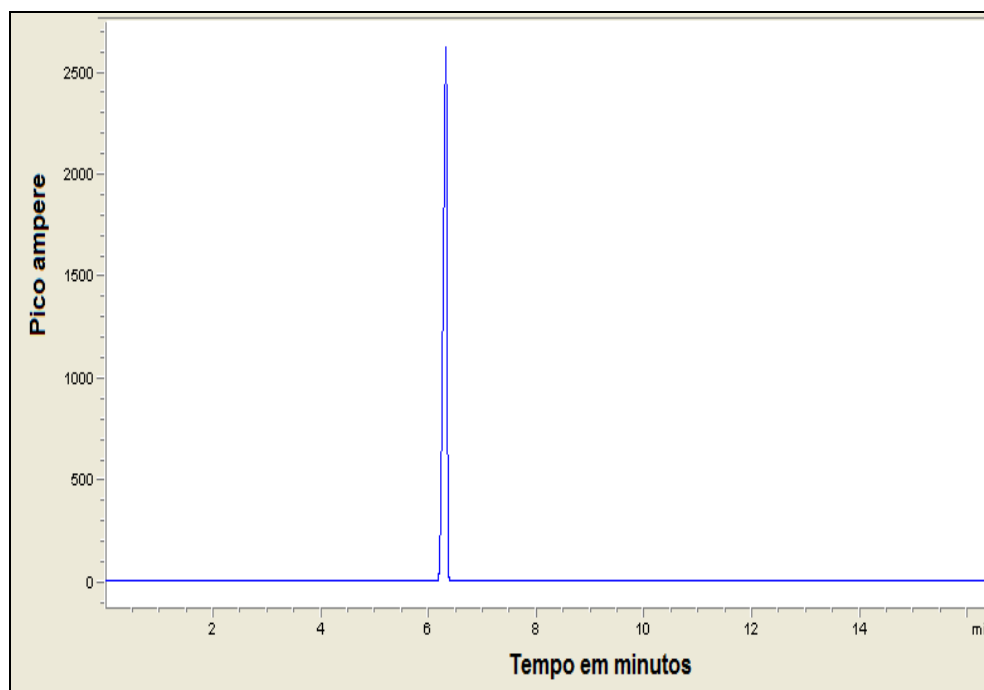


Figura 4 - Cromatograma para a identificação do tempo de retenção da acetoina.

Para as condições utilizadas, a análise do cromatograma da acetoina apresenta tempo de retenção de aproximadamente 6,3 minutos. Ensaios similares demonstraram que o tempo de retenção do diacetil e 2,3 butanodiol são, respectivamente, 8,5 e 10,4 minutos.

Curva analítica

As curvas analíticas elaboradas com os padrões, permitem que por meio da regressão linear (Figura 5), se utilize a equação para o cálculo das concentrações dos 2,3 butanodiol e diacetil dos ensaios (Figuras 6 e 7).

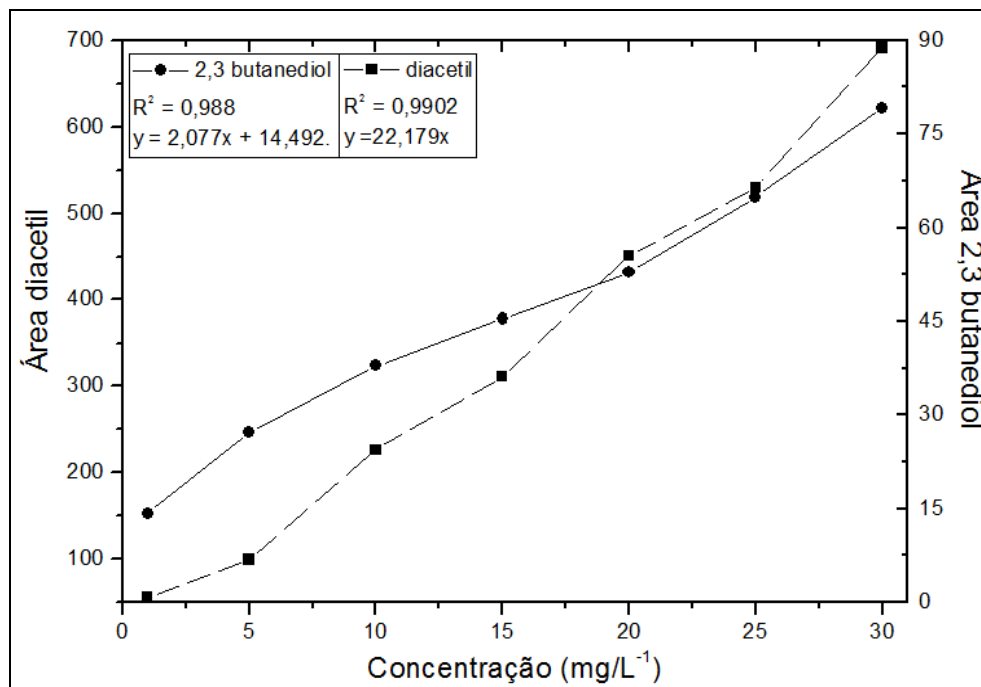


Figura 5 – Curva analítica diacetil e 2,3 butanodiol

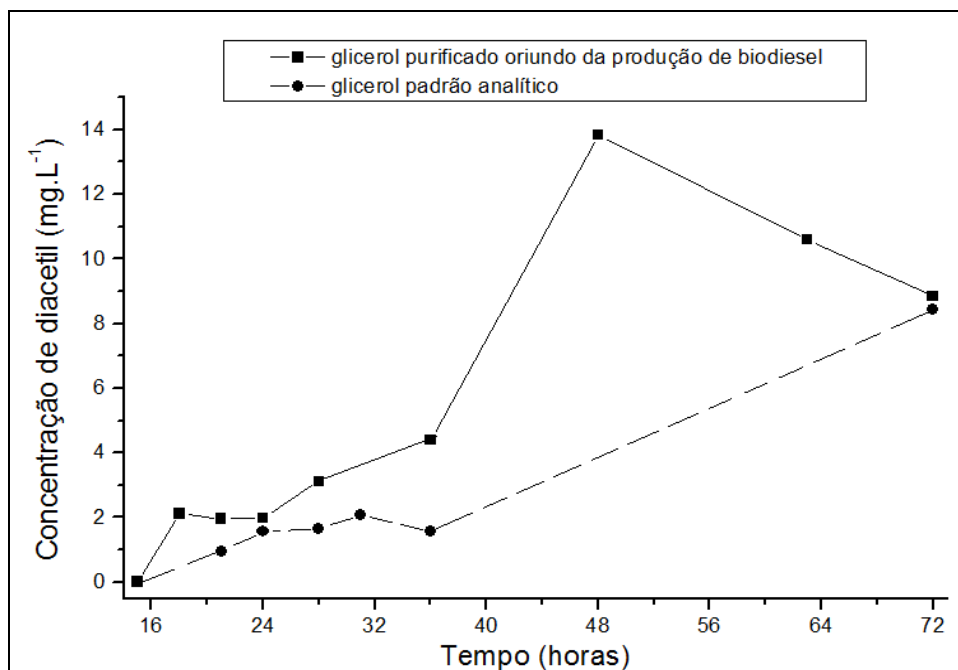


Figura 6 – Cinética fermentativa da produção do diacetil

A análise das curvas da Figura 6, revela cinética semelhante entre os dois meios de cultura. Além disso, alcançaram concentrações de diacetil de aproximadamente 14 mg/L em 48 horas e 8 mg/L em 72 horas, respectivamente, para os experimentos com o glicerol resíduo e padrão analítico, valores significativos quando comparados com bactérias lácticas como *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar diacetylactis* que produzem (+/- 5 mg/L) (CARVALHO, 1999). Além disso, como citado por CARVALHO, (1999), a presença de íons metálicos como cobre, ferro, cobalto e manganês no meio de cultura pode estimular a produção de diacetil, o que foi confirmado pela Tabela 1 do Capítulo 3, para o meio de cultura com glicerol resíduo.

Os ensaios com glicerol resíduo parecem ter alcançado o pico de produção entre 36 e 63 horas enquanto a falta de dados no mesmo intervalo não permitiu a mesma conclusão para os ensaios com glicerol padrão analítico.

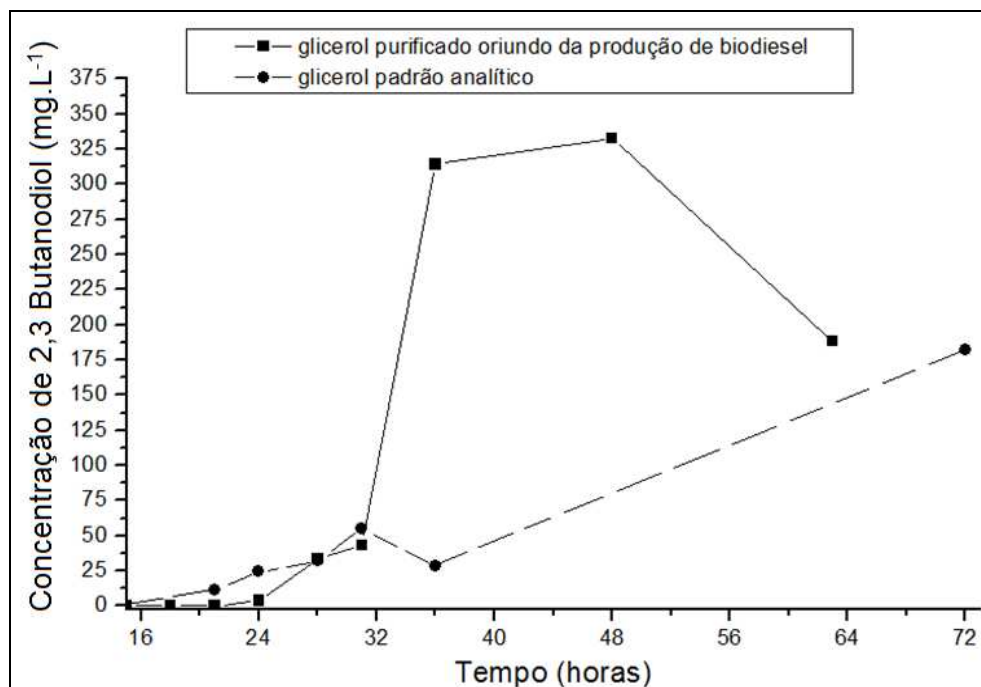


Figura 7 – Cinética fermentativa da produção do 2,3 butanodiol

A análise das curvas da Figura 7, excetuando-se as concentrações, revela perfis semelhantes com a cinética de produção de diacetil. Além disso, ambas apresentaram baixa produção no início o que é condizente com o fato do 2,3-butanodiol ser produto da redução da acetoína que por sua vez pode ser produto da redução do diacetil ou do ácido α -acetolactato, (Figura 1).

Teoricamente, 1 mol glicerol produz 2 mol de ácido acético + 4 mol de dióxido de carbono e 1,0 mol produz diacetil + acetoina e 2,3 butanodiol, segundo BARTOWSKY & HENSCHKE, (2004) e alcança valores como 12 g/L de acetoína (US Pat. 2 529 061, 1946; SEREBRENNIKOV, 1995). Entretanto, a existência de muitas vias metabólicas fazem que o rendimento encontrado normalmente seja baixo.

A análise do cromatograma do intervalo de 15 a 21 horas do processo fermentativo (Figura 8), demonstra alterações em diversos picos, o que sugere, que essa diferença é em função do metabolismo do *Bacillus*.

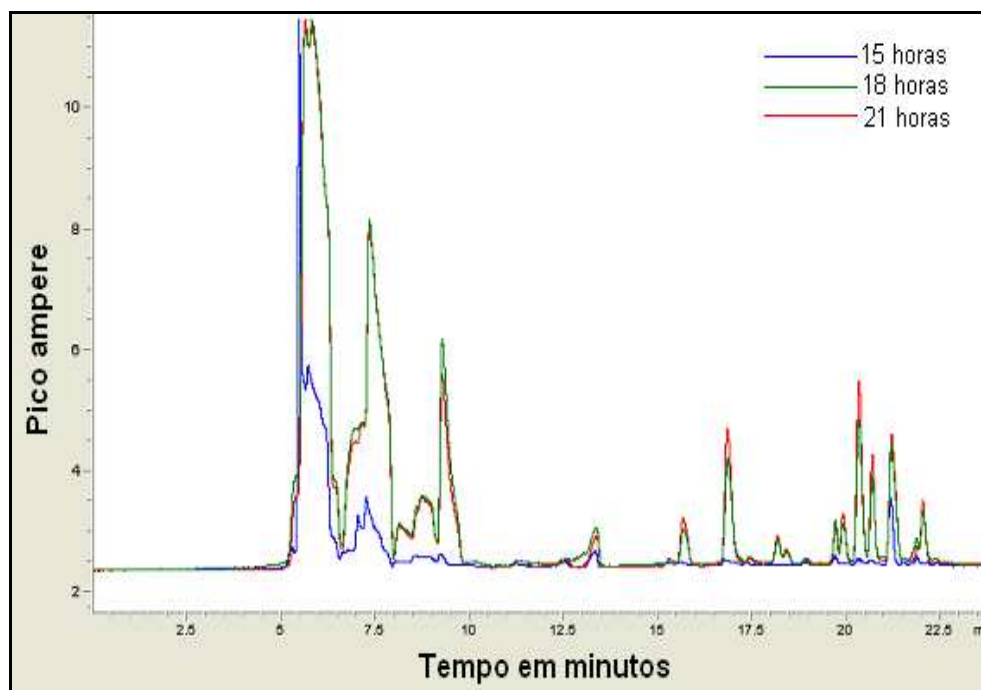


Figura 8 - Cromatograma da etapa inicial da fermentação com glicerol padrão analítico adicionado ao meio de cultura.

Em geral a síntese de metabólicos de origem secundária é significativa durante a fase logarítmica (BERGER, 1995). A identificação da cinética fermentativa (Tabela 2, Capítulo 3), foi dificultada devido ao arraste de células pela espuma. Entretanto, a análise do perfil do cromatograma sugere que esta fase foi alcançada entre 15 e 18 horas.

A análise do perfil do cromatograma do processo fermentativo no intervalo de 21 a 72 horas (Figura 9), demonstra que alguns compostos voláteis, não apresentaram alterações, o que sugere que os mesmos são oriundos do meio de cultura, além disso, os compostos que apresentaram variação, são os mesmos da (Figura 8).

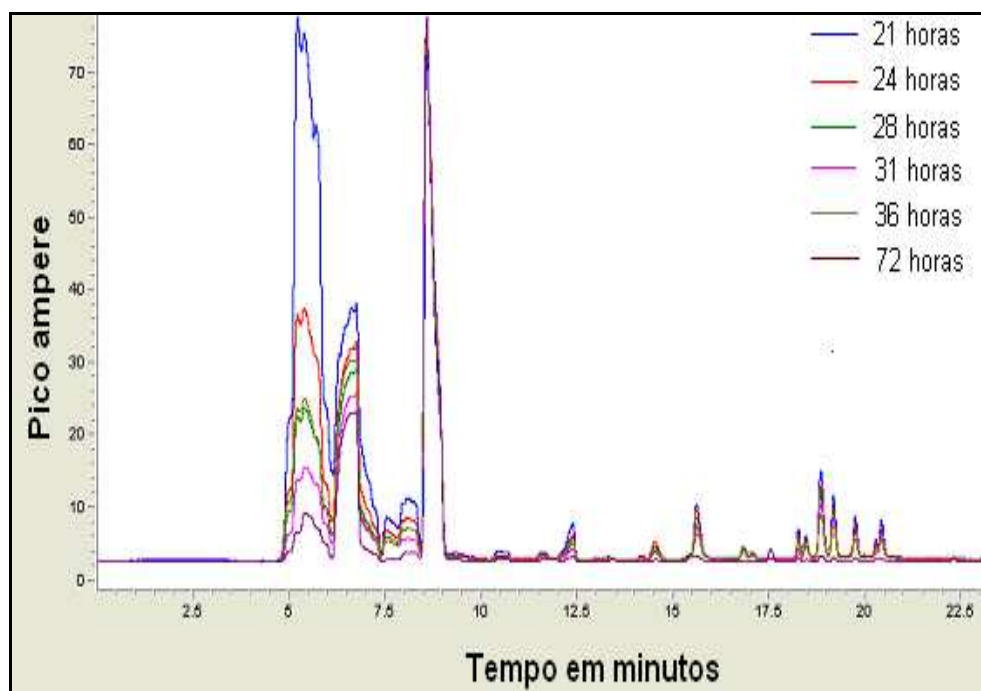


Figura 9 - Cromatograma da fermentação com glicerol padrão analítico adicionado ao meio de cultura.

Os picos com tempos de retenção de aproximadamente de 5,8 6,7 e 8,5 minutos apresentaram queda de produção após 21 horas, o que sugere que os mesmos foram resultados de ação microbiana. Além disso, os compostos voláteis inerentes ao meio de cultura, Figuras 11 e 12, podem ter tido tempos de retenção próximos aos das moléculas produzidas durante o processo fermentativo, resultando em picos não definidos. Entretanto, a análise dos ensaios com padrão analítico Figura 13, comportamento cinético supracitado e conhecimento das rotas metabólicas, Figura 2, corroboram para que os picos com tempos de retenção de 6,3 e 8,5 minutos sejam referentes, respectivamente, a acetoína e diacetil.

As condições utilizadas nos ensaios da Figura 10, foram as mais próximas do processo fermentativo, sendo os erlenmeyers esterelizados imediatamente após a inoculação, e em seguida, adicionados com soluções de diferentes concentrações de acetoína. Esses ensaios, objetivaram minimizar as diferenças de volatilidade da acetoína em função da presença ou não de células bacterianas no meio de cultura.

A análise do cromatograma dos ensaios realizados com padrões de acetoína em diferentes concentrações é condizente em apenas um pico com tempo de retenção de aproximadamente 6,3 minutos, quando foi utilizada maior concentração deste aroma, proporcionalmente a área foi aumentada.

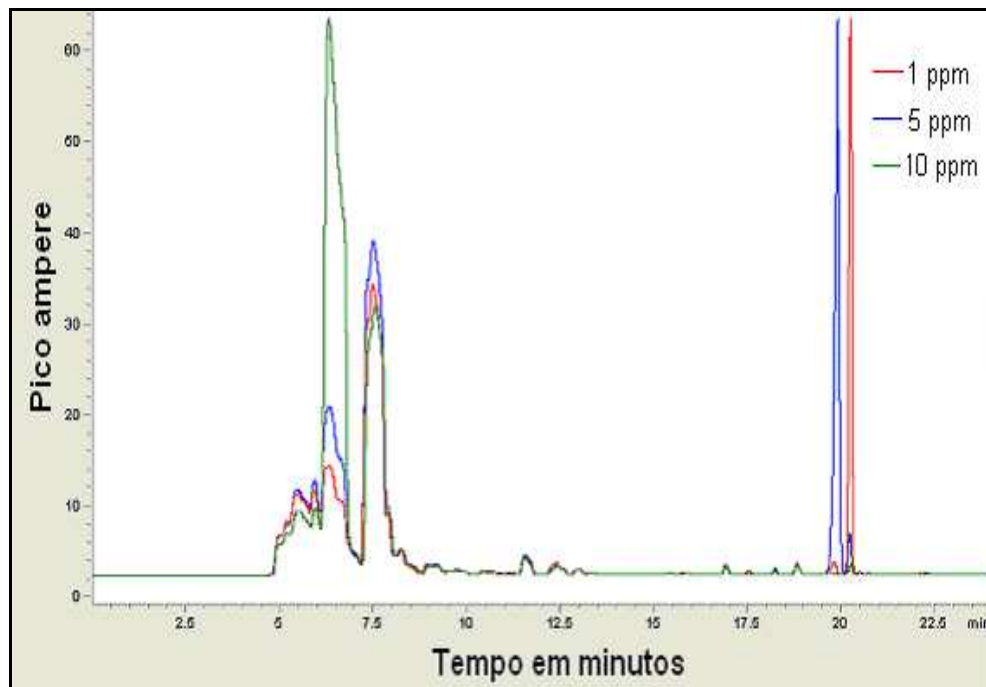


Figura 10 - Cromatograma com diferentes concentrações de acetoína

Os picos com tempo de retenção de 18 e 21 minutos, tiveram suas cinéticas alteradas, indicando que pode existir uma relação entre o acetoína e estes compostos, já que o meio de cultura continha apenas micro-organismos não viáveis. Uma das possibilidades como relatado por CARVALHO, (1999) é que reações químicas espontâneas de redução e oxidação da acetoína

em certas condições de temperatura e pressão podem resultar na formação de compostos como diacetil e 2,3 butanodiol.

Existem dúvidas sobre a rota metabólica destes bioprodutos, pois alguns autores defendem a existência de uma diacetil-sintase que seria ativada por ferro, cobre ou outros cátions metálicos, enquanto outros pesquisadores sugerem que ocorre a oxidação do α -acetolactato para a formação do diacetil, o que é reforçado pela maior produção de diacetil em sistemas aerados e pela formação de diacetil a partir do α -acetolactato sem a presença de micro-organismos em sistemas aerados (CARVALHO, 1999).

MARIOTTO (2007), relatou que os principais fatores para a produção de acetoína e 2,3-butanodiol são concentração inicial do substrato e inoculo, temperatura, pH e aeração e ressaltou a carência da literatura utilizando o gênero *Bacillus* para a produção de acetoína e 2,3-butanodiol. Além disso, CARVALHO, (1999), reportou que pouca ou nenhuma acetoína é produzida a partir de carboidratos sem a presença de uma fonte adicional de piruvato ou citrato. Como os parâmetros utilizados nesse trabalho visaram a produção de biossurfactantes e podem comprometer os rendimentos como observado por BARTOWSKY & HENSCHKE, (2004) que relatou que para se obter altas taxas de conversão de piruvato em acetoína deve-se operar em baixos pH, o que contraria a cinética fermentativa do *Bacillus*, que alcaliniza o meio (BARROS, 2007).

Os cromatogramas das Figuras 11 e 12, foram obtidos por meio de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa com o objetivo de identificar os compostos voláteis, presentes nos meios de cultura contendo glicerol padrão analítico e glicerol purificado da produção de biodiesel, respectivamente. Portanto, esses ensaios não foram inoculados.

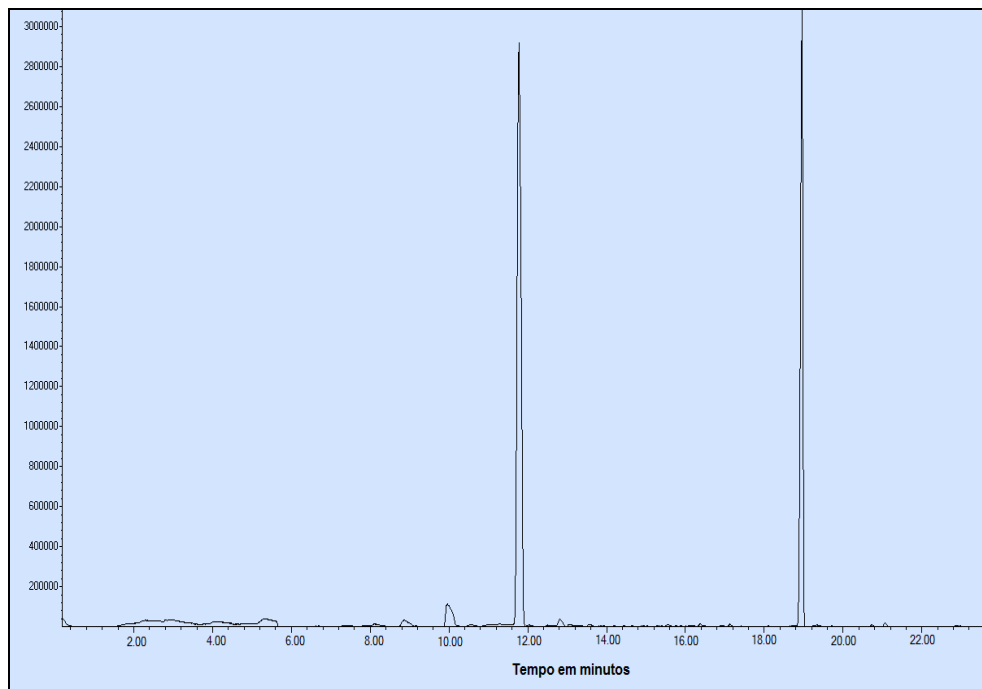


Figura 11 - Cromatograma (CG-EM) dos compostos voláteis inerentes ao meio de cultura contendo glicerol padrão analítico.

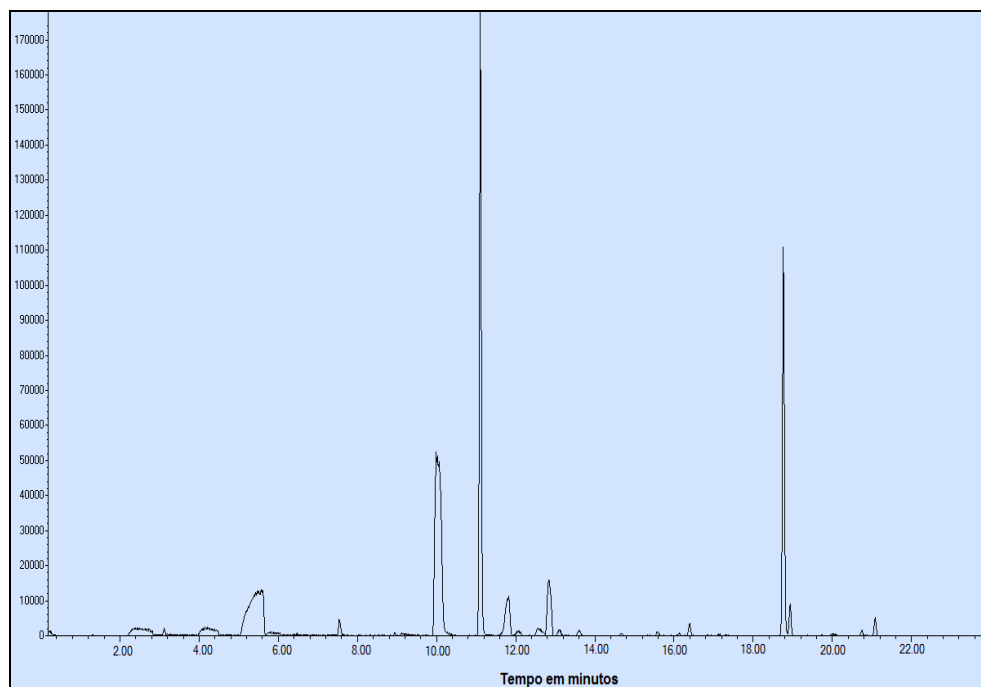


Figura 12 - Cromatograma (CG-EM) dos compostos volatéis inerentes ao meio de cultura contendo glicerol purificado oriundo da produção de biodiesel.

A análise dos cromatogramas dos voláteis inerentes aos meios de cultura revela pequena divergência entre os perfis dos mesmos. Entretanto, as áreas dos ensaios com glicerol padrão analítico foram maiores como, por exemplo, o pico com tempo de retenção de 10,034 min com áreas respectivamente de 9,963 e 18,769.

Um volume de 50 mL de solução aquosa, com concentração de 10 mg/L de 2,3 butanodiol, foi adicionada em erlenmeyres e acoplado ao sistema da Figura 1. Então, foi realizada a extração dos voláteis e analisada em cromatógrafo associado à espectrometria de massas.

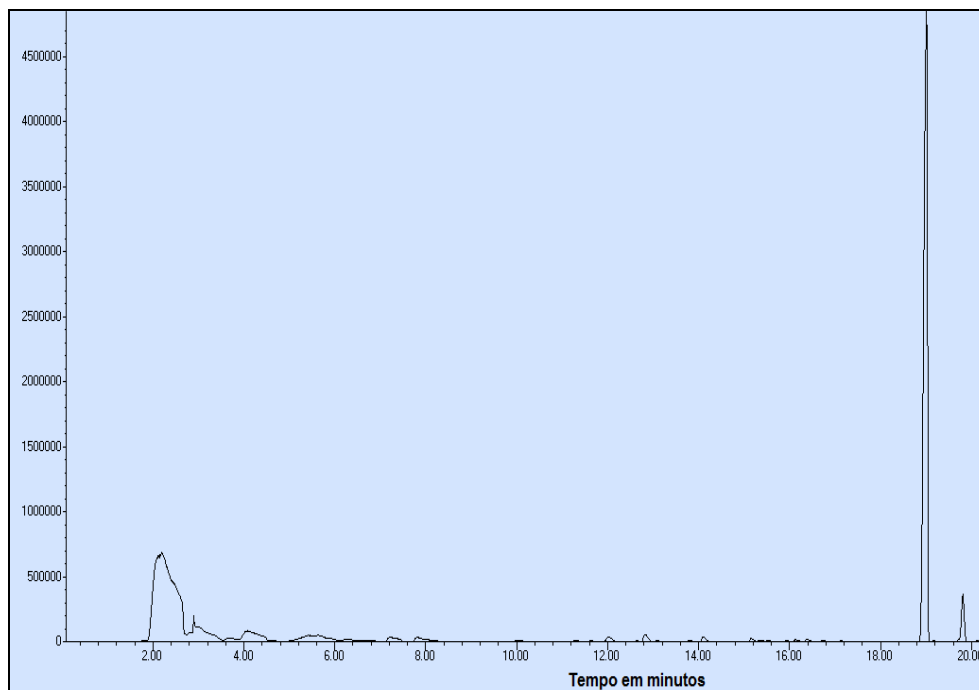


Figura 13 - Cromatograma (CG-EM) solução aquosa 2,3 butanodiol 10 mg/L.

A análise do cromatograma (Figura 13), revela 3 picos significantes, possivelmente pela contaminação do frasco ou reações de oxi redução do 2,3 butanodiol. Esta última hipótese é reforçada pelo banco de dados espectrais que apresentou o pico com tempo de retenção de 2,433 minutos como acetoína (53,4 %).

Os compostos voláteis dos ensaios em fermentador de bancada com o glicerol padrão analítico adicionado ao meio de cultura foram analisados por meio de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (Figura 14), com tempo de fermentação de 24 horas. O cromatograma apresentou um número maior de picos e com concentrações mais elevadas do que as corridas com o meio de cultura, o que sugere ser resultado de ação microbiana na produção de voláteis. Além disso, o banco de dados espectrais indicou o composto com tempo de retenção de 19,380 minutos (93,8 %) como sendo o 2,3 butanodiol, o que é condizente com a Figura 13.

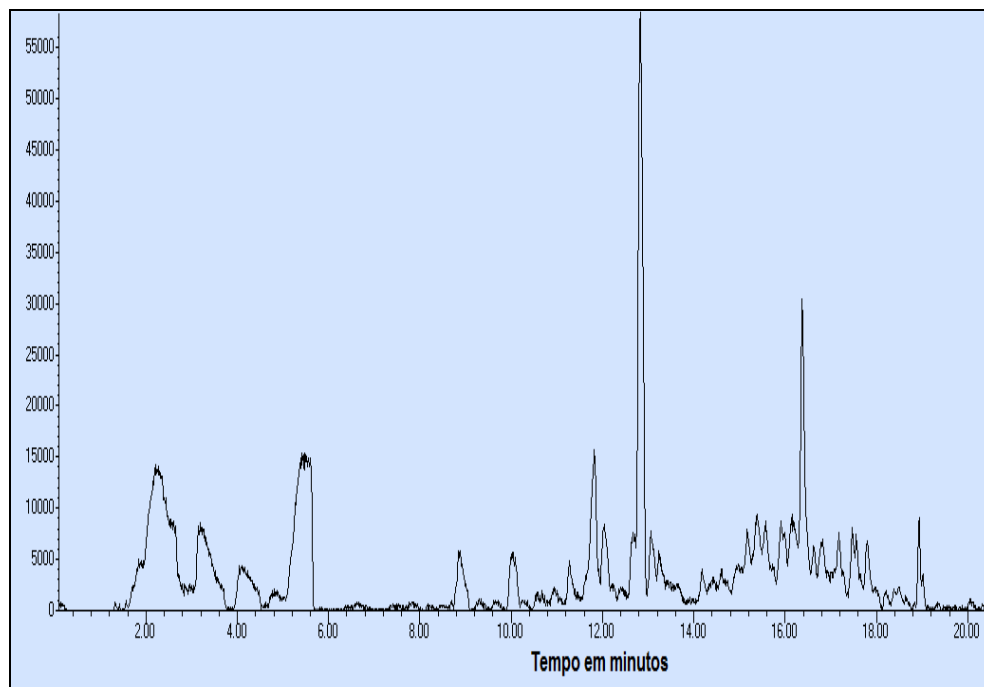


Figura 14 - Cromatograma (CG-EM) dos compostos voláteis produzidos com o glicerol padrão analítico adicionado ao meio de cultura com o uso do fermentador de bancada.

CONCLUSÃO

A produção de proteases e amilases pela linhagem LB2b nos respectivos testes em placas sugere que se trata de uma produção extracelular, e, conseqüente, a presença destes bioprodutos no meio de cultura no processo fermentativo em erlenmeyers e bancada, o que possibilita, a extração de biossurfactantes (espuma), compostos de aromas (fase volátil) e proteases e amilases (meio de cultura).

A cinética dos compostos de aromas (Figura 8) é consistente com a teoria da redução/oxidação do diacetil a acetoína e 2,3-butanodiol, além dos tempos de retenção serem próximos aos dos padrões.

Os ensaios validaram a possibilidade da produção de biossurfactantes e compostos de aromas de maneira concomitante. Além disso, os rendimentos referentes ao diacetil foram altos, mesmo sendo proveniente da espécie *Bacillus subtilis* que não é tradicional produtora destes compostos.

Os experimentos com o meio de cultura evidenciaram que alguns compostos voláteis não são produtos do metabolismo da bactéria (Figuras 11 e 12). Além disso, os ensaios com os padrões em solução aquosa indicam os tempos de retenção (T_R) dos padrões (Figuras 4 e 13), os quais foram utilizados na indicação destes picos no processo fermentativo.

Portanto, pesquisas subseqüentes são necessárias para o desenvolvimento deste processo com análises quantitativas de proteases e amilases em meio líquido, além dos métodos de validação, como estabelecido pela conferência internacional de validação analítica para o diacetil, acetoína e 2,3 butanodiol, este com possibilidades de aplicações como anticongelante, combustível líquido (ROSSI, GARCIA & PRATA, 2005).

OBRAS CONSULTADAS

ABATE, C.; CASTRO, G. R.; Sineriz, F.; CALIERI, D. A. S. - Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobilis*. **Biotechnology Letters.**, v. 21, n. 3, p. 249-252, 1999.

ACD. Disponível em:

<http://acd.ufrj.br/proteases/ProteaseApres.htm>

[Acesso em: 20 de Outubro 2010]

ADAMS, R. P. - Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy, 4 ed. **Carol Stream, IL, USA: Allured Publishing Corporation**, 2007.

AMSTRONG, D. W.; BROWN, L. A. - **Aliphatic, aromatic, and lactone compounds, In: Gabelman A (ed) Bioprocess production of flavor fragrance, and color ingredients. Wiley, New York, 1994.**

BARROS, F. F. C. - **Estudo das variáveis de processo e ampliação de escala na produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* em manipueira.** 102 f.. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, Brasil, 2007.

BARROS, F. F. C.; JUNIOR, S. B.; ANDRADE, C. J.; GODOY, H. T.; PASTORE G. M. - Bioproduction of 3-hidroxi-2-butanone e butanodione from residue of cassava flour industry. In: **III Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas**, 2009.

BARTOWSKY, E. J.; HENSCHKE, P. A. - The 'buttery' attribute of wine-diacetyl-desirability, spoilage and beyond. **International Journal of Food Microbiology**, v.96, p. 235-252, 2004.

BERGER, R.G. - Aroma biotechnology. **Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag**, 1995.

CARVALHO, J. C. - **Produção de diacetil e acetoína: Desenvolvimento de um meio de cultivo e avaliação de fatores que alteram o crescimento de *Lactococcus lactis subsp. lactis biovar. diacetylactis*.** f..100. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 1999.

GIONGO, J. L. - **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.* f.81.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 2006.

JYOTI, V.; AVNEET, K. - Yeast lipases: Enzyme purification, biochemical properties and gene Cloning. **Electronic Journal of Biotechnology.** v.9, n.1, p.69-85, 2006.

OLIVEIRA, A. N.; OLIVEIRA, L. A.; ANDRADE, J. S.; CHAGAS-JÚNIOR, A. F. - Produção de amilase por rizóbios, usando farinha de pupunha como substrato. **Ciências e Tecnologia de Alimentos.**, v.1, n.27, p. 61-66, 2007.

KRINGS, U.; BERGER, R. G - Biotechnological Production of Flavours and Fragrances. **Applied Microbiology and Biotechnology.** v.49, n.1, p.1-8, 1998.

NAKAMURA, L. K.; ROBERTS, M. S.; COHAN, F. M. - Relationship of *Bacillus subtilis* classes associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. *nov.*, and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. *nov.* **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 1211-1215, 1999.

MARIOTTO, J. R - **Produção de acetoína e 2,3-butanodiol por *Bacillus polymyxa* f.75.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil, 2007.

ROMANO, P.; SUZZI, G.; ZIRONI, R.; COMI, G. - Biometric study of acetoin production in *Hanseniaspora guilliermondii* and *Kloeckera apiculata*. **Applied and environmental Microbiology**, v.6, p. 1838-1841, 1993.

ROSSI, A. A.; GARCIA, A. D.; PRATA, A. M. R. - Influência da concentração de ácido acético sobre a produção de butanodiol por *Klebsiella pneumoniae* In:**IV Congresso Brasileiro de Engenharia Química**,2005.

SCHULZ, D.; BONELLI, R. R.; BATISTA, C. R. V - Bacteriocinas e enzimas produzidas por *Bacillus spp.* para conservação e processamento de alimentos. **Alimentos e Nutrição.**, v.16, n.4, p. 403-411, 2005.

SEREBRENNIKOV, V. M. - Effects of temperature on the biosynthesis of 2,3-butanediol and acetoin under varying conditions of batch culturing of *Bacillus polymyxa* CCM 1465. **Applied Biochemistry. Microbiology.**, v. 6, p. 537-542, 1995.

SHUEN-FUH, L.; CHIEN-MING, C.; YING-CHIEH, T. - Effect of triton X-100 on alkaline lipase production by *Pseudomonas pseudoalcaligeneses* F111. **Biotechnology Letters**, v.17, n.9, p.959-962, 1995.

SMIT, G.; SMIT, B. A.; ENGELS, W. J. M. - Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. **Microbiology Reviews**, v.29, n.3, 2005.

U. S. Pat. Office United States **Patent and Trademark Office**: Crystal Park 3, Suite 461
Washington, DC 20231 Fax: (703) 306-2654 (www.uspto.gov)

WOLGANG, L.; KLAUS, H.; KARLHEINZ, D. - Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospect. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 1, p. 1-8, 2005.

ZABORSKY, O. R. - Bioprocess engineering: now and beyond 2000. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 16, n. 1-2, p. 277-285, 1995.

SUGESTÕES

- ✓ Caracterização dos biossurfactantes produzidos por cromatografia;
- ✓ Verificar os efeitos antimicrobianos dos biossurfactantes produzidos;
- ✓ Purificação do glicerol obtido da produção de biodiesel e utilização como fonte de carbono para a produção de biossurfactantes e enzimas em fermentação em fermentador de bancada.
- ✓ Verificar a diferença nos biocompostos formados pela linhagem LB2b quando em processo aeróbico e anaeróbico na igualdade dos demais parâmetros;
- ✓ Comparação entre a bioutilização do glicerol oriundo da cadeia do biodiesel produzidos com metanol e etanol, além das respectivas necessidades de etapas de purificação;
- ✓ Identificação dos compostos formados durante o processo fermentativo (enzimas, anitbióticos, antioxidantes).

CONCLUSÃO GERAL

A integração de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos podem amortizar os custos de produção e viabilizar economicamente a produção, já que os mesmos possuem baixos rendimentos em relação à síntese química e muitas vezes existe a necessidade de etapas de purificação.

A seleção de uma linhagem de *Bacillus subtilis* utilizando o glicerol como única fonte de carbono foi dificultada devido aos baixos valores de tensão superficial e conseqüentemente maior variabilidade, indicando a necessidade de outros minerais e/ou não capacidade destes microorganismos metabolizarem o carboidrato em energia. Logo, outros resíduos como manipueira, malte de cevada, podem ser adicionados ao meio de cultura objetivando maiores rendimentos. Entretanto, a utilização de meios complexos pode dificultar os esclarecimentos das necessidades metabólicas exigindo o uso de metodologias específicas para a identificação da cinética de consumo do componente de interesse.

Os ensaios com o fermentador de bancada apresentaram resultados de produção de biossurfactantes condizentes com a literatura, mesmo utilizando um meio de cultura com baixa complexidade (peptona e glicerol). Entretanto, algumas particularidades foram analisadas como diferenças entre as cinéticas de células viáveis e oxigênio dissolvido no meio de cultura entre os ensaios, evidenciando a necessidade de um processo de purificação do glicerol mais eficiente. Mesmo de forma incipiente foram identificadas as produções de amilases e proteases pela linhagem LB2b. Além disso, foram quantificadas as produções de 2,3 butanodiol e diacetil e as rotas metabólicas utilizadas foram indicadas.