



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



ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE PELA
BACTÉRIA *Kocuria rhizophila*

Beatriz Torsani Úbeda
Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador

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

Campinas – 2004

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

Ub3e Úbeda, Beatriz Torsani
Estudo da produção de biossurfactante pela bactéria *Kocuria rhizophila* / Beatriz Torsani Úbeda. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

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

1.**Kocuria rhizophila* 2.Biossurfactante. 3.Carotenóides.
I.Alegre, Ranulfo Monte. II.Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre
Orientador

Prof. Dr. Romildo Martins Sampaio
Membro

Prof. Dr. Victor Haber Pérez
Membro

Prof. Dr. Alexandre Ponezzi
Membro

*“Todos os dias Deus nos dá um momento em que
é possível mudar tudo que nos deixa infelizes.
O instante mágico é o momento em que
um “sim ou um “não” pode mudar
toda a nossa existência”*

(Paulo Coelho)

*“Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito.
Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto,
hoje é o dia certo para amar, acreditar,
fazer e, principalmente, viver.”*

(Dalai Lama)

Dedico esta tese aos meus pais Décio e Maria Alice e as minhas irmãs Lílíane, Natália e “Camila”. Vocês sempre estarão presentes em meus pensamentos, em minhas preces e guardados em meu coração. Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ranulfo Monte Alegre, muito obrigada. Obrigada pela oportunidade de trabalharmos juntos, pela orientação sempre motivadora repleta de paciência e de sábias palavras.

À banca examinadora pelas correções e sugestões que muito contribuíram a este trabalho.

A CAPES, pela bolsa de estudo concedida.

Aos meus pais Décio e Maria Alice por estarem sempre ao meu lado dispostos a me ouvir e a me ajudar, as minhas irmãs Liliane e Natália pelo carinho e pelo apoio, a minha avó Joana pela constante presença e a minha avó Matilde pelas preces. Aos meus tios, pelos momentos de descontração e palavras de otimismo.

Ao meu querido Márcio Machado pela presença, pelo carinho, pela paciência e especialmente por me fazer feliz.

Ao Rafael, técnico do laboratório e amigo, pelas palavras de conforto nos momentos de desespero e pela colaboração. Ao pessoal do laboratório Lucielen, Tati, Rodenei, Christiane, Maurício, Ana Cláudia, Davi, Victor e D. Maria pela colaboração e amizade.

As colegas Veridiana, Itaciara e Ane pela disposição e atenção.

As amigas Camila, Eliane e Lucielen pela força, carinho e amizade.

Aos amigos Luciana, Fernanda, Ana Raquel, Ana Lídia, Flávia, Leonor e Carlos, Luís, Otávio, Tati e Hélio, Lineu e Luciana, Rodenei e Christiane, Cínthia, Márcia, Nirse, Olga, Chiquinho, Jack, César, Patrícia, e a todos aqueles que participaram desta etapa da minha vida.

E a Deus, enfim, por nada mais que tudo.

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	3
2.1. Objetivo Geral	3
2.2. Objetivos Específicos	3
3. Revisão Bibliográfica.....	4
3.1. A Emulsão	4
3.2. O Biossurfactante	4
3.3. Microrganismos Produtores.....	7
3.3.1. Biossurfactantes produzidos por leveduras	8
3.3.2. Biossurfactantes produzidos por fungos e algas.....	9
3.3.3. Biossurfactantes produzidos por bactérias	10
3.3.3.1. <i>Kocuria rhizophila</i>	12
3.4. A Produção do Biossurfactante	13
3.4.1. Fatores que influenciam a produção do biossurfactante.....	15
3.5. Propriedades e Utilizações do Biossurfactante.....	17
3.6. Carotenóides	19
3.6.1. Estrutura, nomenclatura e classificação.....	19
3.6.2. Biossíntese	19
3.6.3. Propriedades e funções	20
3.6.3.1. A importância dos carotenóides na saúde humana.....	20
3.6.4. Aspecto industrial da produção e aplicações.....	21
3.6.5. Microrganismos produtores de carotenóides.....	22
4. Material e Métodos.....	25
4.1. Microrganismo	25
4.2. Substratos	25
4.3. Meio de Cultura.....	25
4.3.1. Meio de manutenção.....	25
4.3.2. Meio adaptado para a pré-cultura	25
4.3.3. Meio de cultura.....	26

4.4. Preparo do Inóculo.....	26
4.5. Fermentações e Condições de Cultivo.....	26
4.5.1. Influência da temperatura de incubação e do pH na produção de biomassa e biossurfactante.....	27
4.5.2. Influência da fonte de carbono na produção de biomassa e biossurfactante.....	27
4.5.3. Influência da concentração da fonte de nitrogênio orgânico e inorgânico na produção de biomassa e biossurfactante.....	27
4.5.4. Influência da aeração na produção de biomassa e biossurfactante.....	27
4.6. Métodos Analíticos.....	28
4.6.1. Determinação do pH.....	28
4.6.2. Determinação da massa seca	28
4.6.3. Determinação da atividade de emulsificação	28
4.6.3.1. Determinação da atividade de emulsificação utilizando diferentes compostos insolúveis em água.	29
4.6.4. Determinação da estabilidade do biossurfactante.....	29
4.6.4.1. Efeito da temperatura na estabilidade do biossurfactante.	29
4.6.4.2. Efeito do pH na estabilidade do biossurfactante.	30
4.6.5. Determinação da tensão superficial.....	30
4.6.5.1. Tensiômetro	30
4.6.5.2. Lei de Tates – Método das Gotas.	30
4.6.6. Isolamento do biossurfactante	31
4.6.6.1. Precipitação básica do biossurfactante.....	31
4.6.6.2. Precipitação por adição de acetona.....	32
4.6.7. Determinação do consumo de substrato	32
4.7. Análise dos Carotenóides	32
4.7.1. Determinação de carotenóides.....	32
5. Resultados e Discussão.....	34
5.1. Condições Experimentais	34
5.2. Experimentos em Erlenmeyers.....	34
5.2.1. Atividade de emulsificação	34

5.2.1.1. Influência da fonte de carbono, da temperatura de incubação e do pH inicial da fermentação na produção do biossurfactante.....	35
5.2.1.2. Efeito dos nutrientes do meio de cultura e do pH na atividade de emulsificação.....	41
5.2.1.3. Influência da concentração da fonte de nitrogênio orgânico e inorgânico na produção do biossurfactante.....	45
5.2.2. Produção de biomassa	48
5.2.2.1. Influência da fonte de carbono, da temperatura de incubação e do pH inicial da fermentação na produção de biomassa.....	48
5.2.2.2. Efeito da condição de <i>stress</i> de temperatura e pH na produção de biomassa.e biossurfactante.....	51
5.2.2.3. Influência das concentrações das fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico na produção de biomassa.....	52
5.3. Experimentos no Fermentador de Bancada.....	53
5.3.1. Influência da aeração na atividade de emulsificação.....	54
5.4. Tensão Superficial	55
5.4.1. Tensiômetro	56
5.4.2. Lei de Tate – Método das Gotas	56
5.5. Efeito da Temperatura na Atividade de Emulsificação.....	57
5.6. Efeito do pH na Atividade de Emulsificação	58
5.7. Atividade de Emulsificação Utilizando Diferentes Compostos Hidrofóbicos	58
5.8. Isolamento do Biossurfactante.....	59
5.9. Produção de Carotenóides	59
6. Conclusões.....	61
7. Referências Bibliográficas.....	63

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1 -	Tipos de biossurfactantes, microrganismos produtores e tensão superficial	8
Tabela 4.1 -	Composição do meio adaptado para a pré-cultura.....	26
Tabela 5.1 -	Resultados da análise da atividade de emulsificação determinados em 0 horas de fermentação.....	42
Tabela 5.2 -	Resultados da fermentação feita sob condição de <i>stress</i> de temperatura e pH.....	52
Tabela 5.3 -	Fermentação de óleo de soja comercial (5% v/v) pela <i>Kocuria rhizophila</i> em fermentador de bancada (Bioflo III) com pH inicial 9,0, a 38°C, 300 rpm e três níveis de aeração (0,5, 1,5 e 2,0 VVM).	55
Tabela 5.4 -	Peso médio da gota e tensão superficial calculada pelas equações da Lei de Tates.....	57
Tabela 5.5 -	Comparação dos valores obtidos de tensão superficial a atividade de emulsificação.....	57
Tabela 5.6 -	Queda da atividade de emulsificação em relação ao tempo de exposição a 80°C.....	58
Tabela 5.7 -	Influência do pH na atividade de emulsificação de uma única amostra de meio fermentado contendo biossurfactante e pH de 6,58.....	58
Tabela A – 1 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de sacarose (50g/L) feita em Erlenmeyers a 20°C e 150 rpm.	71
Tabela A – 2 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de sacarose (50g/L) feita em Erlenmeyers a 30°C e 150 rpm.	71
Tabela A – 3 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de sacarose (50g/L) feita em Erlenmeyers a 38°C e 150 rpm.....	72
Tabela A – 4	Consumo de substrato (g/L) das fermentações de sacarose feitas em Erlenmeyers.....	72

Tabela A – 5 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers a 20°C e 150 rpm.....	73
Tabela A – 6 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers a 30°C e 150 rpm.....	73
Tabela A – 7 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers a 38°C e 150 rpm.....	74
Tabela A – 8 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE), em pH ajustado para 7,0, da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 5,0 a 38°C e 150 rpm.....	74
Tabela A – 9 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE), em pH ajustado para 7,0, da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 7,0 a 38°C e 150 rpm.....	75
Tabela A – 10 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE), em pH ajustado para 7,0, da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 9,0 a 38°C, 150 rpm.....	75
Tabela A – 11 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 9,0, a 38°C, 150 rpm sem NH ₄ Cl e com 1,0 g/L de extrato de levedura.....	76
Tabela A – 12 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 9,0, a 38°C e 150 rpm com 0,5 g/L NH ₄ Cl e 1,0 g/L de extrato de levedura.....	76
Tabela A – 13 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 9,0, a 38°C, a 150 rpm, sem de extrato de levedura e com 1,0 g/L de NH ₄ Cl.....	77
Tabela A – 14 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 9,0, a 38°C, a 150 rpm, com 0,5 g/L de extrato de levedura e 1,0 g/L NH ₄ Cl.....	77

Tabela A – 15 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita fermentador de bancada (Bioflo III) com pH inicial 9,0, a 38°C, 300 rpm e 0,5 VVM.....	78
Tabela A – 16 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita fermentador de bancada (Bioflo III) com pH inicial 9,0, a 38°C, 300 rpm e 1,5 VVM.....	78
Tabela A – 17 -	Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita fermentador de bancada (Bioflo III) com pH inicial 9,0, a 38°C, 300 rpm e 2,0 VVM.....	79
Tabela A – 18 -	Variação da atividade de emulsificação utilizando-se diferentes óleos emulsionados em caldo fermentado com pH 7,0.....	79

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1 -	Estrutura dos biossurfactantes mais conhecidos. (a) ramnolípídeo (glicolípídeo), (b) emulsan (heteropolissacarídeo), (c) surfactina (lipopeptídeo cíclico) e (d) Fosfatidiletanolamina.....	6
Figura 5.1 -	Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 5,0 e a 20°C.....	36
Figura 5.2 -	Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 7,0 e a 20°C.....	37
Figura 5.3 -	Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 9,0 e a 20°C.....	37
Figura 5.4 -	Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 5,0 e a 30°C.....	38
Figura 5.5 -	Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 7,0 e a 30°C.....	38
Figura 5.6 -	Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 9,0 e a 30°C.....	39
Figura 5.7 -	Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 5,0 e a 38°C.....	39
Figura 5.8 -	Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 7,0 e a 38°C.....	40
Figura 5.9 -	Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 9,0 e a 38°C.....	40
Figura 5.10 -	Atividades de emulsificação (UA) após ajuste do pH de uma única amostra para vários valores de pH.....	42
Figura 5.11 -	Atividades de emulsificação (UA) em fermentação a 38°C e pH inicial 5,0.....	43
Figura 5.12 -	Atividades de emulsificação (UA) em fermentação a 38°C e pH inicial 0,7.....	43
Figura 5.13 -	Atividades de emulsificação (UA) em fermentação a 38°C e pH inicial 9,0.....	44

Figura 5.14 -	Atividades de emulsificação (UA) em fermentação sem NH_4Cl e 1,0 g/L de extrato de levedura.....	46
Figura 5.15 -	Atividades de emulsificação (UA) em fermentação cujo meio de cultura continha 0,5 g/L de NH_4Cl e 1,0 g/L de extrato de levedura.....	46
Figura 5.16 -	Atividades de emulsificação (UA) em fermentação sem extrato de levedura e 1,0 g/L de NH_4Cl	47
Figura 5.17 -	Atividades de emulsificação (UA) em fermentação cujo meio de cultura continha 1,0 g/L de NH_4Cl e 0,5 g/L de extrato de levedura.....	47
Figura 5.18 -	Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos à temperatura de 20°C e sacarose como fonte de carbono.....	48
Figura 5.19 -	Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos à temperatura de 30°C e sacarose como fonte de carbono.....	49
Figura 5.20 -	Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos à temperatura de 38°C e sacarose como fonte de carbono.....	49
Figura 5.21 -	Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos à temperatura de 20°C e óleo de soja como fonte de carbono.....	50
Figura 5.22 -	Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos a temperatura de 30°C e óleo de soja como fonte de carbono.....	50
Figura 5.23 -	Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos a temperatura de 38°C e óleo de soja como fonte de carbono.....	51
Figura 5.24 -	Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos a diferentes concentrações de fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico.....	53
Figura 5.25 -	Atividade Emulsificante (UA) de sobrenadantes com pH ajustado para 7,0 em experimentos conduzidos em fermentador submetidos a diferentes taxas de aeração.....	54
Figura 5.26 -	Atividade de Emulsificação (UA) de uma única amostra adicionada em diferentes compostos hidrofóbicos.....	59
Figura 5.27 -	Colônias da bactéria <i>Kocuria rhizophila</i> em ágar nutriente.....	60
Figura B-1 -	Curva padrão utilizada para quantificação do consumo de sacarose pelo método DNS.....	80

NOMENCLATURA

μm	Micrômetro
AE	Atividade de emulsificação
DBO	Demanda bioquímica de oxigênio
EU	<i>Emulsifying unit</i>
g	Gramma
L	Litro
MCS	Massa celular seca
nm	Nanômetro
rpm	Rotações por minuto
U	Unidade de atividade
UA	Atividade de emulsificação
v/v	Volume por volume
VVM	Volume de oxigênio por volume de meio

RESUMO

Biossurfactantes são agentes de superfície ativa sintetizados por várias espécies de microrganismos sendo as bactérias e as leveduras os principais produtores. A molécula do biossurfactante é formada por uma parte hidrofílica, solúvel em água, e uma parte hidrofóbica, solúvel em solvente orgânico. Tal composto é sintetizado durante o crescimento ou na fase estacionária do desenvolvimento do microrganismo em meios de cultura contendo hidrocarbonetos ou açúcares como fonte de carbono. A produção pode ser espontânea ou induzida através da presença de compostos lipídicos, por variações de pH, temperatura, aeração e agitação ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de stress como baixas concentrações de nitrogênio e alterações nas condições ótimas de pH e temperatura.

O processo de produção do biossurfactante contribui para a degradação de compostos hidrofóbicos, podendo ser empregado, no tratamento de águas residuárias e em solos contaminados por derramamento de petróleo e seus derivados, pois a célula microbiana busca a assimilação do hidrocarboneto como forma de obtenção de energia. Existe vasta possibilidade de aplicação em alimentos, na agricultura, na indústria cosmética e farmacêutica, devido principalmente à baixa toxicidade e biodegradabilidade.

Neste trabalho a bactéria *Kocuria rhizophila*, aeróbia e gram-positiva, isolada de água residuária de abatedouro avícola, foi utilizada na produção de biossurfactante. As variáveis: substrato (querosene, sacarose e óleo de soja), pH inicial da fermentação (5,0, 7,0 e 9,0), temperatura de incubação (20, 30 e 38°C), concentrações das fontes de nitrogênio orgânica e inorgânica (0% e 50% alternadamente) e aeração (0,5, 1,5 e 2,0 VVM) foram avaliadas em relação ao crescimento celular e à produção do biossurfactante. Para isto os experimentos foram conduzidos em Erlenmeyers com agitação de 150 rpm e em fermentador de bancada.

O estudo mostrou que a bactéria não é capaz de utilizar o querosene como fonte de carbono, sendo a massa celular máxima obtida em Erlenmeyers, à temperatura de incubação de 38°C e pH inicial de fermentação 9,0 e em meio de cultura contendo sacarose. Já a produção de biossurfactante aconteceu independentemente do crescimento celular, e

em maior concentração no meio de cultura contendo óleo de soja como substrato.

A maior atividade de emulsificação foi obtida em 48 horas de fermentação com óleo de soja comercial (5%v/v) e pH inicial 9,0, a 38°C e 150 rpm em Erlenmeyers com 1,00 g/L de NH₄Cl e sem extrato de levedura. O sobrenadante obtido do caldo fermentado, após ajuste de pH para 7,0, apresentou atividade de 1,959 UA. Obteve-se redução da tensão superficial do meio de cultura de 59,9 mN/m para 38,8 mN/m e massa de biossurfactante igual a 1,10 g/L em amostra com atividade de emulsificação de 1,685 UA. Observou-se que a exposição do sobrenadante a 80°C resultou na redução da atividade de emulsificação.

Palavras-chave - *Kocuria rhizophila*, biossurfactante e carotenóides.

SUMMARY

Biosurfactants are active surface agents produced by a large number of microorganisms mainly by bacterias and yeast, which are the best producers. The biosurfactant molecule is composed for hydrophobic moiety soluble in organic compounds and for hydrophilic moiety soluble in water. This compound is produced during growth cellular or in the stationary phase of microorganism development in the culture medium with hydrocarbons or sugar as carbon source. The production can be spontaneously or induced by lipids compounds, pH of the medium, temperature, aeration and agitation, or when cellular growth is submitted under stress condition like low temperature, low nitrogen concentration and when the good condition of pH and temperature are changed.

The process of biosurfactant production contribute with degradation of hydrophobic compounds, which can be employee in the wastewater treatment, in the soil contaminated by oil spilling and its derives, because the microrganins cellules firecracker the hydrocarbon assimilation as energy source. Oversea immense possibility of food application, in the agricultural, pharmaceutical and cosmetic industry due mainly lower toxicity and higher biodegradability.

In this work the bacteria *Kocuria rhizophila* aerobic and gram-positive, isolated of wastewater poultry was used in the biosurfactant production. The effect of the variables: carbon source (kerosene oil, sucrose and soybean oil), initial pH of fermentation (5,0, 7,0 and 9,0), incubation temperature (20, 30 and 38°C), concentration of organic and inorganic nitrogen source (0% and 50% alternate) and aeration (0,5, 1,5 and 2,0 VVM) were studied to evaluate cellular growth and production of biosurfactant. The experiments were carried out conduction in Erlenmeyers flasks and fermentor.

This study showed that the bacteria was able to use kerosene as carbons source. The maximum cellular growth occurred in Erlenmeyers flaks, at incubation temperature 38°C e initial pH of fermentation 9,0 and in the medium with sucrose. The biosurfactant production happened independent of cellular growth and the maximum concentration was reached in medium with soybeam oil.

The maximun of emulsifyng activity was obtained in 48 hours of fermentation

with soybean oil (5%v/v) and initial pH of fermentation 9,0, at 38°C and 150 rpm with 1,00 g/L of NH₄Cl and without yeast extract. The emulsifying activity was 1,959 UA after pH adjustment to 7,00. The superficial tension of the medium was reduced of 59,9 mN/m to 38,8 mN/m and the biosurfactant mass was 1,10 g/L in a sample which the emulsifying activity was 1,685 UA. The fermented broth exposed at 80°C resulted in the reduction of emulsifying activity.

Keywords - *Kocuria rhizophila*, biosurfactant and carotenoids.

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são compostos de superfície ativa capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre líquidos, sólidos e gases permitindo a mistura ou a dispersão dos mesmos em água ou em outros líquidos (BANAT et al., 2000). Esta propriedade permite que os surfactantes sejam utilizados pelas indústrias com diversas funções tais como: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Atualmente, os surfactantes disponíveis comercialmente são sintetizados a partir de derivados de petróleo que são tóxicos para o meio ambiente e não são biodegradáveis. A produção industrial de surfactantes excede 9,0 bilhões de dólares por ano (MAIER e SOBERÓN-CHÁVEZ, 2000). A produção mundial de surfactantes está estimada em três milhões de toneladas por ano, sendo 54% desta produção utilizada como matéria-prima para a fabricação de detergentes para uso doméstico e 32% destinada para o uso industrial (BANAT et al., 2000).

Na indústria alimentícia são utilizados emulsificantes sintéticos e naturais. O glicerol monostearato (GMS) e o carboximetilcelulose (CMC) são os emulsificantes sintéticos mais utilizados, mas apresentam limitações, pois os consumidores buscam cada vez menos consumir produtos sintéticos. A lecitina e a goma arábica são os naturais mais empregados, porém a lecitina apresenta problemas funcionais quando submetida às condições modernas de processamento; e a goma arábica, por ser importada da África, está sempre sujeita a instabilidades climáticas e políticas (GAOKAR, 1991; WHISTLER, 1993).

A contaminação ambiental por petróleo e seus derivados é um problema crescente que está causando sérias implicações ecológicas e econômicas (MARÍN et al., 1995). As técnicas empregadas para a recuperação do ambiente poluído são, na maioria das vezes, baseadas na utilização de surfactantes e emulsificantes sintéticos, os quais geralmente são compostos tóxicos ao meio ambiente e não-biodegradáveis (BANAT et. al., 2000).

A versatilidade de aplicação dos surfactantes resultou no aumento da demanda e no interesse em desenvolver novas formas de obtenção dos mesmos. Assim, surfactantes

naturais, principalmente os de origem microbiológica, estão sendo amplamente explorados também como forma de acompanhar a tendência de substituição dos produtos sintéticos por biológicos em indústrias alimentícias e cosméticas.

Os surfactantes microbiológicos ou biossurfactantes são sintetizados por bactérias, leveduras e fungos durante o seu crescimento em meio de cultura cuja fonte de carbono não necessariamente é um hidrocarboneto, pois na literatura são relatados biossurfactantes produzidos através do emprego de compostos hidrossolúveis como glicose e sacarose (BANAT, 1995; WILLUMSEN e KARLSON, 1997). Mais recentemente, recursos renováveis, tais como produtos agroindustriais e derivados de petróleo, estão sendo utilizados como nutrientes para o desenvolvimento microbiológico e produção de bioemulsificantes. Tal fato resulta na biotransformação destes compostos, pois são assimilados por microrganismos como fonte de energia deixando de causar problemas de contaminação ambiental (ISHIGE et al., 2003).

Os biossurfactantes apresentam vantagens quando comparados com os quimicamente sintetizados, pois são biodegradáveis, apresentam baixa toxicidade, são efetivos em uma ampla faixa de temperatura, pH e salinidade e podem ser sintetizados através do emprego de recursos renováveis (SHEPHERD et al., 1995; DESAI e BANAT, 1997).

2. OBJETIVOS

As diversas formas de aplicação do biossurfactante e as vantagens apresentadas pelo mesmo em relação às técnicas até então empregadas, ressaltaram o interesse em estudar a sua produção. Assim, os objetivos gerais e específicos deste trabalho são:

2.1. Objetivo Geral

Estudar a produção de biossurfactante pela bactéria *Kocuria rhizophila* por fermentação submersa.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar o crescimento celular e a produção de biossurfactante em relação a diferentes substratos (sacarose, óleo de soja e querosene), valores de pH iniciais e temperatura de fermentação em experimentos feitos em Erlenmeyers agitados a 150 rpm;
- Utilizar, em um fermentador de bancada, as condições ótimas de operação obtidas em frascos Erlenmeyers agitados, e avaliar a influência da aeração na produção de biossurfactante e biomassa.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. A Emulsão

A emulsão é considerada um tipo de dispersão, pois é composta por líquidos imiscíveis ou parcialmente miscíveis dispersos um no outro formando um sistema monofásico. A formação de uma emulsão ocorre quando água e substâncias hidrofóbicas são homogeneizadas (SHAW, 1975).

Para que possa ocorrer a homogeneização das fases é necessário vencer a tensão interfacial, que é definida como a força resistente ao aumento da superfície total de contato entre as fases (BOBBIO e BOBBIO, 1992). Logo, a emulsão é completamente instável devido à área interfacial formada entre a fase dispersa e a fase contínua. Então, para impedir a reversão da emulsão em duas fases distintas, acrescenta-se um agente emulsionante ou substâncias tensoativas (ZAJIC e PANCHAL, 1976).

O agente emulsionante ou emulsificante é empregado com a finalidade de facilitar a emulsificação e manter a emulsão estável, isto é, impedir que ocorra a coalescência das fases. Estas substâncias possuem esta característica devido aos grupos lipofílicos e hidrofílicos presentes em suas moléculas que diminuem a tensão interfacial, quando permanecem voltados para cada fase respectivamente (SHAW, 1975).

3.2. O Biosurfactante

Agentes de superfície ativa são produzidos quimicamente ou biologicamente. Os surfactantes quimicamente sintetizados são tóxicos ao meio ambiente e não são biodegradáveis. Mas, compostos com propriedades tensoativas também são sintetizados por organismos vivos, desde plantas (saponinas), microrganismos (glicolipídeos) e até pelo organismo humano (saís biliares), sendo explorados como alternativa aos processos químicos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

Várias espécies de microrganismos sintetizam agentes de superfície ativa, como subprodutos metabólicos, os quais são biodegradáveis, não são tóxicos ao meio ambiente e

são efetivos em extremos de pH e temperatura (DESAI e BANAT, 1997, SHEPHERD et al., 1995).

Na literatura científica encontra-se a divisão destes compostos em dois grandes grupos: biossurfactantes e bioemulsificantes. Assim WILLUMSEN e KARLSON (1997), SARUBBO et al.(1999) e PARASZKIEWICZ et al.(2002) diferenciam estes compostos da seguinte maneira:

- Biossurfactantes são compostos de baixo peso molecular (glicolipídeos, soforolipídeos, trialolipídeos, ácidos graxos e fosfolipídeos), cujas moléculas são constituídas de uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica. Tais compostos têm capacidade de reduzir a tensão superficial de meios aquosos, quando presentes nos mesmos, devido a redução da energia requerida para a formação da emulsão;

- Bioemulsificantes são polímeros de alto peso molecular (polissacarídeos anfipáticos) cujas moléculas não possuem necessariamente uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica. Em meios aquosos, os bioemulsificantes afetam a formação da emulsão e a sua estabilidade não reduzindo, necessariamente, a tensão superficial como os biossurfactantes.

Tal fato também foi relatado por COOPER e GOLDENBERG (1987), quando estudavam a produção de agentes de superfície ativa por duas espécies de *Bacillus* em meios contendo substratos hidrossolúveis. Neste estudo, o *Bacillus cereus* produziu polissacarídeo (bioemulsificante) que reduziu a tensão superficial para 53 mN/m mantendo as emulsões estáveis, e um monoglicerídeo (biossurfactante) que reduziu a tensão superficial para 28 mN/m, ambos em relação a da tensão superficial da água que é de 72 mN/m.

A parte hidrofóbica ou apolar da molécula é normalmente linear, composta por hidrocarbonetos saturados, embora cadeias insaturadas também sejam encontradas, ou por ácidos graxos hidroxilados, ou ainda por peptídeos hidrofóbicos. A parte hidrofílica, também dita polar, é composta por aminoácidos, ou por peptídeos, ou por mono-, di-, ou polissacarídeos, podendo também ser iônica (aniônica ou catiônica), não-iônica ou anfotérica. O arranjo espacial destas moléculas contribui para as várias propriedades dos biossurfactantes cujas estruturas podem ser observadas na Figuras 3.1 (ROBB, 1987 e

BANAT, 1995).

O biossurfactante é classificado de acordo com a composição química da molécula e com o microrganismo que o originou. Encontram-se, descritas na literatura, cinco classes de biossurfactantes: glicolipídeos, lipoproteínas e lipopeptídeos, lipídeos neutros, ácidos graxos e fosfolipídeos, poliméricos e os particulados (DESAI e BANAT, 1997). Vale ressaltar que os ramnolipídeos, surfactantes pertencentes à classe dos glicolipídeos produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*, são os mais estudados (TULEVA et al., 2002).

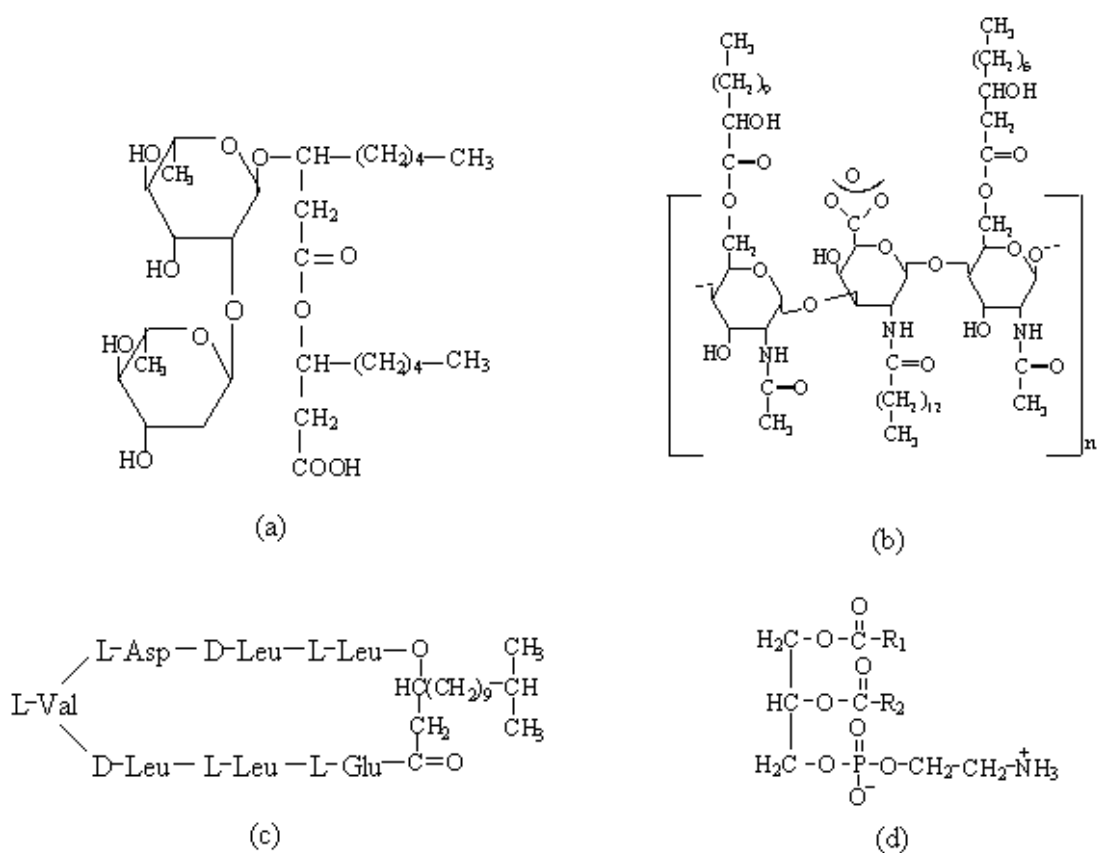


Figura 3.1 – Estrutura dos biossurfactantes mais conhecidos. (a) ramnolipídeo (glicolipídeo), (b) emulsan (heteropolissacarídeo), (c) surfactina (lipopeptídeo cíclico) e (d) Fosfatidiletanolamina. Fonte: DESAI e BANAT, 1997.

3.3. Microrganismos Produtores

Bactérias, leveduras e fungos filamentosos são capazes de produzir agentes de superfície ativa (bioemulsificantes e biossurfactantes) em meios de cultura contendo substratos hidrossolúveis (glicose, sacarose, etanol e glicerol) ou hidrofóbicos (hidrocarbonetos) como fonte de carbono (ROBB, 1987; LANG e WAGNER, 1987; BANAT, 1995; ROSEMBERG e RON, 1999).

O crescimento de microrganismos em meio de cultura contendo uma fonte de carbono insolúvel em água ocorre devido à emulsificação destes substratos através da produção de bioemulsificantes, de biossurfactantes (PATIL e CHOPADE, 2001). Isto permite que o aumento da área interfacial, ou de ambos (água/hidrocarboneto) melhore a taxa de dissolução do substrato facilitando a adesão e a sua utilização pelo microrganismo (BARATHI e VASUDEVAN, 2001; TULEVA et al., 2002).

Assim, muitos microrganismos são capazes de degradar hidrocarbonetos assimilando-os como fonte de carbono e energia. Logo, estes microrganismos podem ser empregados na degradação de petróleo e seus derivados, auxiliando nos processos de descontaminação ambiental causada por derramamentos. No Brasil, por exemplo, são encontrados relatos constantes de problemas de poluição ambiental devido a grande produção e utilização deste combustível (BICCA et al., 1999). Biossurfactantes purificados também podem ser empregados em biorreatores ou *in situ* para emulsificar e aumentar a solubilidade dos contaminantes hidrofóbicos (BANAT et al., 2000).

Devido à vasta aplicabilidade dos surfactantes em indústrias de produtos de limpeza, petrolíferas, de cosméticos e produtos higiênicos, muitos estudos estão sendo direcionados para o desenvolvimento de tecnologias para o melhoramento das linhagens e processos de produção (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

A Tabela 3.1 apresenta alguns microrganismos produtores de biossurfactantes e a redução da tensão superficial pelos mesmos tendo como referência a tensão superficial da água que é de 72 mN/m.

Tabela 3.1 - Tipos de biossurfactantes, microrganismos produtores e tensão superficial.

Biossurfactantes		Microrganismos	Tensão superficial (mN/m)
Glicolipídeos	Trihalolipídeo	<i>P. aeruginosa</i>	29
		<i>Pseudomonas sp.</i>	25-30
		<i>R. erythropolis</i>	32-36
		<i>N. erythropolis</i>	30
		<i>Mycobacterium sp.</i>	38
Lipopeptídeos e Lipoproteínas	Soforolipídeo	<i>T. bombicola</i>	33
		<i>T. apicola</i>	30
	Lipopeptídeo	<i>B. licheniformis</i>	27
Lipopeptídeos e Lipoproteínas	Serrawettin	<i>S. marcescens</i>	28-33
	Viscosin	<i>P. fluorescens</i>	26,5
	Surfactin	<i>B. subtilis</i>	27-32
Ac. Graxos	Ac. Graxos	<i>C. lepus</i>	30
Lipídeos Neutros	Lipídeos Neutros	<i>N. erythropolis</i>	32
Poliméricos	Carboidrato-proteína-lipídeo	<i>P. fluorescens</i>	27

Fonte: DESAI e BANAT, 1997.

3.3.1. Biossurfactantes produzidos por leveduras

SAMPAIO (1995) demonstrou que o óleo diesel comercial pode ser degradado pela levedura *Saccharomyces lipolytica* produzindo razoáveis quantidades de bioemulsificante. Em frascos agitados, as maiores atividades foram determinadas na concentração de substrato igual a 3% e pH inicial de fermentação 5,0, e no fermentador de bancada com concentração de substrato igual a 5% e mesmo pH inicial de fermentação. LIMA (1997), estudando a mesma levedura, para produção de bioemulsificante a partir de óleo diesel comercial, observou taxas de atividade emulsificante de 0,63 a 0,89 unidades de atividade (U).

A levedura *Candida antarctica* produziu glicolipídeo extracelular em fermentação conduzida em frascos agitados a 220 rpm e 30°C, por um período de 7 dias e na presença

de 8% de óleo de soja como fonte de carbono, sendo a parte hidrofílica identificada como 4- α - β -D-manopiranosil-*meso*-erithritol. Há relatos que esta levedura produz 100 g/L de biossurfactante (INOH et al., 2001).

Óleo de babaçu foi utilizado como fonte de carbono pela levedura *Candida lipolytica* para a produção de bioemulsificante em fermentações em frascos agitados. O bioemulsificante foi identificado como um complexo polissacarídeo-proteína-lipídeo e isolado após 144 horas de fermentação, cuja atividade emulsificante encontrava-se em torno de 1,2 unidades de atividade em leitura a 540 nm (SARUBBO et al., 1999).

Soforolipídeos foram produzidos pela levedura *Candida bombicola* em fermentador utilizando gordura animal como fonte de carbono. A produção máxima do biossurfactante, 120 g/L, ocorreu a 27°C após 68 horas. Mas, o crescimento celular máximo foi obtido a 30°C (DESHPANDE e DANIELS, 1995).

Bioemulsificante foi isolado da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* contendo dois tipos de polímeros com diferentes composições químicas e propriedades emulsificantes. Um dos polímeros continha propriedades emulsificantes, enquanto o outro estabilizava a emulsão. A composição do primeiro foi basicamente identificada como proteína e carboidrato e a do segundo como sendo carboidrato e fósforo. O interesse na extração de bioemulsificante desta levedura se justifica pelo fato da mesma ser comestível e já utilizada em alimentos e bebidas (BARRIGA et al., 1999).

A levedura oleaginosa *Rhodotorula glutinis* produziu bioemulsificante extracelular associado ao crescimento em fermentações em batelada, e em meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono. A produção máxima do bioemulsificante foi obtida a 30°C e pH inicial da fermentação de 4,0 (JONHSON et al., 1992).

3.3.2. Biossurfactantes produzidos por fungos e algas

O fungo filamentoso *Curvularia lunata* IM 2901 produziu agente emulsificante extracelular quando cresceu em meio líquido contendo glicose. A produção máxima de 2,6 g/L foi alcançada após 47 horas de fermentação a 28°C em shaker rotativo a 180 rpm. Caracterizações químicas preliminares mostraram que o bioemulsificante continha 34% de

carbono, 5,7% de hidrogênio, 1,8% de nitrogênio e 0,15% de enxofre, sendo um complexo proteína (25%) e polissacarídeo (48%). O açúcar presente foi identificado como um polímero de D-glicose (PARASKIEWICZ et al., 2002).

Polissacarídeos obtidos do sobrenadante das algas *Porphyridium cruentum* e *Spirulina* spp são empregados em produtos alimentícios como espessantes. A alga vermelha *Porphyridium cruentum* produz polissacarídeos com propriedade de estabilizar emulsões (SHEPHERD et al., 1995).

3.3.3. Biossurfactantes produzidos por bactérias

Bactérias do gênero *Acinetobacter* estão sendo relatadas constantemente como produtoras de bioemulsificante extracelular, pois estão entre os gêneros frequentemente encontrados em ambientes contaminados com petróleo. A bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* MM5 cresceu em meio contendo tetradecano produzindo bioemulsificante, o qual apresentou alto peso molecular e estabilidade a altas temperaturas. A análise da composição química parcial do bioemulsificante resultou em 20% de proteína, 1% de ácidos graxos e 15,5% de açúcares totais (MARÍN et al., 1995).

PATIL e CHOPADE (2001) também estudaram a produção de bioemulsificante por espécies de *Acinetobacter* isoladas de pele humana saudável. Os melhores resultados foram obtidos com a bactéria *Acinetobacter junii* SC 14 na presença de óleo de amêndoa durante a fase estacionária do crescimento a 37°C e pH 7,2. Nestas condições a produção máxima de bioemulsificante alcançada foi 116,6 EU/mL em 30 horas de fermentação e na presença de 1% de óleo de amêndoas. Análises químicas revelaram que o bioemulsificante continha 50,5% de proteínas, 43% de polissacarídeos e 3,8% de lipídeos.

Pseudomonas fluorescens foi empregada na degradação de hidrocarbonetos produzindo biossurfactante durante o crescimento celular. O biossurfactante foi extraído da cultura após 24 horas de fermentação na concentração de 0,58 g/L e a tensão superficial foi reduzida para 35 mN/m (BARATHI e VASUDEVAN, 2001).

Pseudomonas aeruginosas GS9-119 e DS10-129 foram utilizadas para produzir raminolipídeos através do emprego de substratos de baixo custo. A produção

máxima foi de 4,31, 2,98 e 1,77 g/L em óleo de soja, óleo de açafrão e glicerol, respectivamente. A fermentação foi conduzida em frascos agitados, incubados a 200 rpm e 30°C (RAHMAN et al., 2002).

Ramnolipídeos também foram produzidos pela espécie *Pseudomonas putida* 21BN quando cresceram em substratos solúveis em água como a glicose e glicerol e pouco solúvel como o hexano. A produção máxima obtida foi de 1,2 g/L, alcançada na fase de crescimento estacionário, e a redução da tensão superficial após crescimento em meio com hexano foi para 29 mN/m (TULEVA et al., 2002).

BONIN e BERTRAND (1999) investigaram a produção de biossurfactante pela bactéria *Pseudomonas nautica* em fermentações conduzidas em frascos agitados a 96 rpm e 32°C utilizando heptadecano como substrato. O bioemulsificante obtido continha 59% de proteínas, 40% de hidrocarbonetos e 1% de lipídeos.

OSIPOV et al. (1998) isolaram duas espécies de *Antrobacter* e uma *Micrococcus varians* do solo contaminado de petróleo, observando que estas bactérias formavam bioemulsificante durante o processo de degradação do óleo.

FERRAREZZO (1998) estudou a produção de bioemulsificante em função da fonte de carbono (óleo de soja e glicose) e pH do meio de cultivo (5,0, 7,0 e 11,0) bem como sua capacidade de emulsionar compostos aromáticos (tolueno e xileno) e misturas de hidrocarbonetos alifáticos e cíclicos (querosene e óleo diesel) além de triglicerídeos (óleo de soja). Os melhores índices de emulsificação, que ocorreram quando as linhagens B1 e B9 foram cultivadas em meio GYP, em pH 7,0 após 10 horas de cultivo, em agitador rotatório a 150rpm e 30°C, foram em relação ao óleo de soja (43,39%), ao querosene (44,00%), ao tolueno (40,42%), ao óleo diesel (44,85%) e ao xileno (45,0%). Estas linhagens provocaram pequena diminuição da tensão superficial dos meios de cultivo.

Clostridium pasteurianum produziu compostos de superfície ativa quando cultivado anaerobicamente em meio contendo sacarose como fonte de carbono. Tal fato foi observado devido a redução da tensão superficial para 55 dinas/cm pela presença de 4 lipídeos neutros no sobrenadante da cultura (COOPER et al., 1980).

Bacillus subtilis ATCC 21332 produziram surfactin, biossurfactante lipopeptídico,

utilizando batata como substrato. As fermentações foram conduzidas em frascos agitados em “Shaker” a 30°C por 72 horas, e a produção do biossurfactante resultou na redução da tensão superficial de 71,3 mN/m para 28,3 mN/m (água residuária contendo batata) e para 27,5 mN/m (meio contendo sais minerais) (FOX e BALA, 2000).

Bacillus licheniformis JF-2 é capaz de crescer e produzir biossurfactante (lipopeptídeo) sob condições aeróbias ou anaeróbias, na presença de alta salinidade e elevada temperatura, características típicas de reservatórios de óleo. A máxima concentração obtida, nas fermentações feitas em frascos agitados a 42°C, 200 rpm e com meio de cultura suplementado com 4% de glicose, foi de 33 mg/L. *Bacillus licheniformis* KGL11 (mutação do *Bacillus licheniformis* JF-2) produziu 12 vezes mais biossurfactante (391 mg/L) nas mesmas condições (SUNG-CHYR et al., 1998).

3.3.3.1. *Kocuria rhizophila*

A bactéria *Kocuria rhizophila*, empregada neste projeto como produtora de biossurfactante, foi isolada, primeiramente, por KOVÁCS et al. (1999) quando estudavam a rizosfera da *Typha angustifolia* no rio Danúbio na Hungria juntamente à espécie *Kocuria palustris*.

O gênero *Kocuria*, pertencente à família Micrococcaceae, foi descrito por STACKEBRANDT et al. (1995) como possuidor de quatro espécies *Kocuria rosea*, *Kocuria varians*, *Kocuria kristinae* e *Kocuria erythromyxa*.

Na literatura, encontram-se vários trabalhos com o emprego destes microrganismos. VIDAL et al. (2000) estudaram a capacidade de degradação de penas de frango em processos fermentativos pela bactéria *Kocuria rosea*, a qual possui atividade ceratinolítica, com o objetivo de proporcionar um método alternativo de produção de proteína suplementar. OSIPOV et al. (1998) observaram a produção de bioemulsificante pela bactéria *Kocuria varians*, quando em contato com solo contaminado de petróleo e seus derivados, como forma de remediação. *SILVEIRA (2002) analisou a capacidade de várias

*Silveira, E. H. – mestranda do Departamento de Ciência dos Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos – UNICAMP

bactérias de produzir biossurfactante, verificando que a *Kocuria rhizophila* foi a que apresentou a melhor atividade de emulsificação de 1,450 UA em fermentações a 30°C e pH igual a 7,50.

A bactéria *Kocuria rhizophila* foi descrita como espécie composta por células esféricas de 1,00-1,50 µm de diâmetro, aeróbias, gram-positivas, imóveis e não produtoras de esporos. As colônias possuem 1,50-2,50 mm de diâmetro, são opacas, homogêneas, com extremidades irregulares e com pigmentação amarelada. Não crescem quando expostas a temperaturas superiores a 40°C, apresentando bom desenvolvimento em pH 5,70 - 7,70, em nitrogênio inorgânico, citrato de Simmon e em meios com 10% de cloreto de sódio (NaCl).

Em relação as suas características tem-se: catalase, benzidina, gelatinase, fosfatase e hidrólise do Tween 80 positivas; oxidase, hidrólise de amido, indol, uréase, hidrólise de esculina, arginina dihidrolase e reação de fenilalanina deaminase negativas; fraca reação com H₂S; não reduz nitrato a nitrito; produz ácido a partir de D-glucose, D-frutose, D-manose e sacarose; não produz ácido a partir de glicerol, manitol, sorbitol, ribose, D-xilose, L-arabinose, galactose, lactose, maltose, β- gentilbiose, D- turanose, arbutina, salicina, trealose e malezitose; é capaz de utilizar o adonitol, L- arabinose, S- furtose, L- fucose, D-glucose, turanose, xilitol, metil- 40, Tween 80 e N-acetil-D-glucosamina. Não utiliza celobiose, D- trealose, N-acetil- D-galatosamina, mesoinositol, maltose, D-manitol, S-melibiose, sorbitol, inosina e glicerol. As ligações interpeptídicas consistem em três resíduos de alaninas (variação A3α). As maiores manaquinonas são MK -7(H₂) e MK-8(H₂). Os maiores ácidos graxos são ai-C_{17:0}, ai-C_{15:0} e i-C_{15:0}. Os lipídeos polares predominantes são os fosfatidilglicerol. A composição de bases de DNA e 69,4 mol% de G + C.

3.4. A Produção do Biossurfactante

A razão pela qual os microrganismos produzem surfactantes não é tão óbvia. Em locais onde houve derramamento de óleo, algumas bactérias produzem surfactantes extracelulares como forma de emulsionar o substrato hidrocarbônico para facilitar a sua assimilação e degradação. Entretanto, a produção de surfactantes por microrganismos não degradadores de óleo, pode ser explicada pelo fato da célula sintetizar estes compostos

como antibiótico, e assim se defender de ataques de outros microrganismos (MORIKAWA et al., 2000).

Os caminhos para a síntese dos dois grupos que compõe o biossurfactante são diversos e utilizam conjuntos específicos de enzimas. Mesmo considerando a diversidade de produção, algumas características da síntese e regulação são semelhantes. Em muitos casos, as primeiras enzimas utilizadas na síntese destes componentes são enzimas reguladoras (DESAI e BANAT, 1997).

Um possível caminho da síntese do biossurfactante pode ser através da conversão da glicose, quando presente no meio de cultura, em outros sacarídeos como trealose, soforose ou ramnose, ou com a divisão via gliceraldeído 3-P e piruvato para acetil Co-A, que unida ao oxaloacetato produz malonil-CoA e em seguida ácido graxo. Por outro lado, o hidrocarboneto, quando presente como substrato, pode ser utilizado para produzir ácidos graxos ou sacarídeos através da transformação da molécula em álcool, depois em aldeído e ácido graxo por ação enzimática. O ácido graxo formado pode sofrer β -oxidação passando a acetil-CoA e, a partir deste momento, vários outros poderão ser formados (ROBB, 1987).

A produção do bioemulsificante por microrganismos com a finalidade de degradar hidrocarbonetos, pode acontecer de duas formas: algumas bactérias e leveduras excretam emulsificantes, os quais emulsificam o substrato no próprio meio de crescimento ou são capazes de mudar a estrutura da sua parede celular mantendo o bioemulsificante fixo na mesma favorecendo o transporte dos hidrocarbonetos para dentro da célula. Ambos os processos podem ocorrer durante o crescimento celular ou quando o crescimento encontra-se na fase estacionária (ROBB, 1987).

O biossurfactante colabora na degradação de hidrocarbonetos pelos microrganismos, pois solubiliza ou emulsiona estes compostos permitindo o aumento da concentração dos mesmos na fase aquosa tornando-os mais acessíveis ao ataque do microrganismo (BANAT et al., 2000).

De acordo com SYLDATK e WAGNER (1987), a biossíntese do emulsificante pode acontecer seguindo quatro caminhos diferentes:

- Síntese do carboidrato e do lipídeo;

- Síntese da metade de carboidrato enquanto que a síntese da metade lipídica dependerá do comprimento da cadeia do substrato carbônico presente no meio;
- Síntese da metade lipídica enquanto que a síntese da metade de carboidrato dependerá do substrato utilizado;
- Síntese das metades carboidrato e lipídica dependendo do substrato.

A produção de biossurfactante pode ocorrer durante a fase exponencial de crescimento ou quando o crescimento celular alcança a fase estacionária. Na literatura há exemplo de produção de biossurfactante na fase exponencial de crescimento do microrganismo e declínio da produção depois de terminada esta etapa e também, aparecimento do produto somente depois de cessado todo o crescimento celular, etapa na qual inicia-se a lise celular (COOPER e GOLDENBERG, 1987).

O crescimento de microrganismos na interface água/óleo favorece o aparecimento de um biofilme, cuja formação envolve a aderência à superfície das gotas de óleo devido a hidrofobicidade das células, que quando aderidas, formam uma camada delgada, extraindo os compostos insolúveis em água, da fase oleosa, e utilizando os sais minerais da fase aquosa. As células revestem as gotas de óleo produzindo bioemulsificantes, reduzindo a tensão interfacial entre o óleo e a água, resultando na emulsificação do óleo e aumentando a área interfacial disponível para o crescimento microbiológico (ÁSCON-CABRERA e LEBEAULT, 1995).

3.4.1. Fatores que influenciam a produção do biossurfactante

A grande variedade dos biossurfactantes, assim como os tipos, quantidades e qualidades, são influenciados pela natureza do substrato carbônico, concentração de íons N, P, Mg, Fe e Mn presentes no meio de cultura e condições de cultivo como pH, temperatura, agitação e diluição (BANAT, 1995).

A produção do biossurfactante pode ser espontânea, induzida através da presença de compostos lipídicos, por variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de *stress* como baixas

concentrações da fonte de nitrogênio, alterações nas condições ótimas de pH e temperatura (DESAI e BANAT, 1997).

A biodisponibilidade do substrato é um dos fatores que limita o crescimento celular e como consequência afeta a taxa de biodegradação de cadeias longas de alcanos, devido à baixa solubilidade em água, e a produção de biossurfactante (BARATHI e VASUDEVAN, 2001). A degradação do hidrocarboneto depende de sua composição e estado físico, da presença e espécie de microrganismo, quantidade de oxigênio viável, água, temperatura, pH e nutrientes inorgânicos (VAN DYKE et al., 1991). Geralmente, mecanismos conhecidos como indução, repressão e a disponibilização de nitrogênio e íons covalentes, controlam a produção de biossurfactante (DESAI e BANAT, 1997).

GUERRA-SANTOS et. al. (1984) observaram a influência da composição e da concentração dos componentes do meio de cultura na produção de ramnolipídeos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. A maior concentração de biossurfactante foi igual a 1,5 g/L em meio de cultura contendo: nitrato como fonte de nitrogênio e como componente da relação carbono/nitrogênio, ferro em concentração mínima e fósforo em excesso. A mesma bactéria foi empregada em fermentações em batelada sendo utilizadas fontes de carbono de baixo custo, na qual a produção máxima foi igual a 4,31, 2,98 e 1,77 g/L em óleo de soja, óleo de girassol e glicerol, respectivamente (RAHMAN, 2002).

A levedura oleaginosa *Rhodotorula glutinis* produziu bioemulsificante extracelular associado ao crescimento em fermentações em batelada. A produção do bioemulsificante foi influenciada significativamente pela temperatura e pelo pH inicial da fermentação, cujos valores ótimos foram 30°C e 4,0, respectivamente e também pela utilização da fonte de nitrogênio abaixo da concentração limite (JONHSON et al., 1992).

Considerando os fatores que influenciam a síntese de biossurfactante, algumas técnicas estão sendo empregadas com o objetivo de estimular ou intensificar a taxa de produção e também diminuir os custos do processo. O emprego de substratos baratos como água residuária rica em amido de batata (FOX e BALA, 2000), gordura animal (DESHPANDE e DANIELS, 1995) ou ainda o controle da adição de sais como manganês e ferro (SHEPPARD e COOPER, 1991), têm sido alternativas exploradas para tornar o

biossurfactante comercialmente competitivo, pois o surfactante sintético é vendido a aproximadamente US\$ 2/Kg.

A produção do bioemulsificante, mesmo não sendo economicamente competitiva quando comparada à produção de emulsificante sintetizado quimicamente, devido ao seu alto custo de produção, à metodologia de bioprocessamento empregada, ao baixo rendimento das linhagens de microrganismos utilizadas e ao alto custo dos hidrocarbonetos, está sendo amplamente estudada devido às vantagens apresentadas como baixa toxicidade, biodegradabilidade e aceitação (FERRAREZZO, 1998).

3.5. Propriedades e Utilizações do Biossurfactante

Devido ao fato dos biossurfactantes serem produzidos por vários microrganismos, as estruturas químicas e várias propriedades como atividade superficial e interfacial, tolerância a temperatura, pH e força iônica, baixa toxicidade e biodegradabilidade podem ser diferentes (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Estes compostos também podem apresentar propriedades antibióticas como o lipopeptídeo da família do iturin produzido pelo *Bacillus subtilis*, que apresenta propriedade fungicida (BANAT, 1995).

A surfactina (lipopeptídeo cíclico) é um dos mais efetivos biossurfactantes, pois pode reduzir a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m e possui várias atividades biológicas, tais como função antibacteriana ou atividade antiviral, atividade citoplasmática, inibição da formação de coágulo fibroso e estímulo da atividade macrofagocita (MORIKAWA et al., 2000).

Na indústria alimentícia o uso de biossurfactante é restrito, devido às questões de segurança, qualidade sensorial, custo, propriedades funcionais, costumes e leis. O fator segurança é o mais restrito e requer que o biossurfactante seja biodegradável e não forme compostos tóxicos ao corpo humano e ao meio ambiente (LIMA, 1997).

Ramnolipídeo, biossurfactante produzido pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, está sendo empregado no transporte de drogas insolúveis em seres humanos e também como precursor de componentes de sabor na indústria alimentícia (RAHMAN et al., 2002).

Glicolipídeos, produzidos pela levedura *Candida Antarctica*, aumentaram

significativamente a eficiência na transferência genética do lipossoma-mediador pelo lipossoma catiônico com um derivado catiônico do colesterol. Este biossurfactante também agiu na redução da tensão superficial e interfacial e apresentou propriedade antibiótica principalmente em bactérias gram-positivas (INOH et al., 2001).

Na agricultura, os surfactantes são necessários para hidrofilição de solos pesados, para obtenção de umidade adequada e para realizar igual distribuição dos fertilizantes nos mesmos. Na indústria de cosméticos são encontrados em shampoos e condicionadores (FIECHTER, 1992).

VOLLENBROICH et al. (1997) utilizaram a surfactina, biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis*, como mecanismo de inativação de vírus capsulados através da interação da ação surfactante com a membrana lipídica do vírus. Obtiveram resultados in vitro, os quais mostraram a atividade antiviral da surfactina, especialmente em herpes e retrovírus, sendo muito eficiente.

Na literatura científica, encontram-se estudos de bioemulsificantes empregados em processos de biorremediação. Isto acontece devido à capacidade destes microrganismos de degradar hidrocarbonetos e assim, auxiliar na recuperação de solos e águas contaminados por derramamento de petróleo.

Os biossurfactantes apresentam melhores características que os sinteticamente produzidos para aplicações em indústrias de óleo, pois agem como dispersantes dos componentes pesados do óleo através da redução da viscosidade do lodo resultando na formação de macro - ou microemulsões de óleo em água ou água em óleo. Logo, a menor viscosidade da emulsão facilita a sua remoção e posterior separação das frações de óleo pela quebra da emulsão (BANAT et al., 1991).

O emulsan é um bioemulsificante extracelular produzido pela bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* e foi o primeiro a ser produzido comercialmente para a degradação de óleo. É caracterizado como um heteropolissacarídeo polianiónico, sendo os seus polissacarídeos constituídos de três amino-açúcares: D-galactosamina, ácido D-galactosamina urônico e um terceiro ainda não identificado (FERRAREZZO, 1998).

3.6. Carotenóides

Os carotenóides são um grupo de pigmentos naturais compostos de diversas estruturas e funções. Na natureza são encontrados nas cores laranja, amarela e vermelha das frutas, tubérculos, flores, invertebrados, pescados e pássaros. Também são encontrados em bactérias, fungos, leveduras e algas. Assim, a diversidade das fontes naturais permite vastas condições de estudos e explorações, sendo a produção de carotenóides naturais estimada em cem milhões de toneladas ao ano*.

3.6.1. Estrutura, nomenclatura e classificação

Os carotenóides possuem as suas estruturas compostas de um tetraterpeno de 40 átomos de carbono constituído de oito unidades isoprenóides de cinco carbonos, formando uma molécula linear e com simetria invertida no centro. Salienta-se que reações de hidrogenação, desidrogenação, ciclização, oxidação, isomerização, migração da dupla ligação, encurtamento ou extensão da cadeia, rearranjo, introdução de substituintes e ou a combinação destas, modificam a cadeia resultando em inúmeras estruturas originando outros carotenóides (KULL e PFANDER, 1995).

São divididos em dois grandes grupos: os carotenóides hidrocarbonetos, formados apenas por átomos de carbono e hidrogênio chamados carotenos; e os derivados oxigenados, conhecidos como xantofilas (GROSS, 1991).

São nomeados de acordo com alguma propriedade especial ou com a fonte, e a classificação é baseada no sistema de ligações que formam a estrutura e na presença ou ausência de anéis na mesma (BAUERNFEIND, 1981).

3.6.2. Biossíntese

Todos carotenóides são derivados das vias isoprenóide ou terpenóide. No início da sua formação ocorre a condensação de uma molécula de dimetilalil difosfato e três moléculas isopentil difosfato.

*George Britton, <http://dcb-carot.unibe.ch/>, acessado em 29 de setembro de 2003.

Esta reação tem como consequência à produção da molécula diterpeno geranilgeranil difosfato, a qual forma uma das metades dos 40 carbonos que compõe o carotenóide. A condensação de duas moléculas diterpeno geranilgeranil difosfato forma o primeiro carotenóide, o qual é incolor e conhecido como fitoeno. Subseqüentes reações de desidrogenação originam o licopeno ou neurospeno e a partir destes, novas vias formarão os carotenóides acíclicos e cíclicos. A síntese de carotenóides cíclicos envolve ciclização de um ou de ambos extremos da cadeia do licopeno ou neurospeno (SCHMIDT-DANNERT, 2000).

3.6.3. Propriedades e funções

Os carotenóides são lipídeos solúveis em outros lipídeos (lipossolúveis) e em solventes como acetona, álcool, éter e clorofórmio. Os carotenos são solúveis em solventes apolares como éter de petróleo e hexano, enquanto as xantofilas são melhor solubilizadas em solventes polares como o álcool. Os carotenóides são sólidos a temperatura ambiente e podem ser cristalizados, com exceção dos carotenos insaturados (GROSS, 1991).

O sistema de duplas ligações conjugadas, presente na cadeia, também conhecido como cromóforo, confere a estas substâncias a habilidade de absorver luz na região do visível. Assim, o carotenóide pode ser caracterizado de acordo com a absorção máxima, a qual é função do número de duplas ligações conjugadas. Mas, este sistema de ligações proporciona também alta reatividade química a estas substâncias, favorecendo reações de isomerização e oxidação, resultando na perda da cor e de atividade biológica.

3.6.3.1. A importância dos carotenóides na saúde humana

Os carotenóides estão sendo amplamente estudados devido principalmente, à atividade pró-vitáminica A e às propriedades que resultam em ações biológicas benéficas à saúde.

O β -caroteno, α -caroteno, β -criptoxantina são pró-vitâmicos A, a luteína e a zeaxantina estão relacionados com a proteção à catarata e à degeneração macular e o licopeno com a proteção ao câncer e a doenças cardiovasculares, devido a sua

propriedade antioxidante natural (NIIZU, 2003). Tais carotenóides são encontrados principalmente na cenoura, na abóbora, no mamão, no tomate e na couve, sendo necessário a inclusão de legumes, frutas e verduras na dieta para que quantidades desejáveis possam ser adquiridas (PADOVANI, 2003). Assim, a disponibilidade destas substâncias está relacionada diretamente com a variedade dos alimentos consumidos pela população, os quais, por sua vez, estão vinculados à renda familiar. Isto mostra que se a população pudesse se alimentar de forma equilibrada, muitas doenças poderiam ser prevenidas e, como consequência, menos investimentos seriam necessários em hospitais e medicamentos.

3.6.4. Aspecto industrial da produção e aplicações

Atualmente, encontram-se registros de identificação de mais de 600 carotenóides naturais. Mas, a maioria destes são biossintetizados em forma de traços, o que dificulta a extração de material suficiente para a purificação e aplicação em estudos com animais (SANDMANN et al., 1999).

Os carotenóides mais comercializados são o β -caroteno, a astaxantina e a cataxantina obtidos através da síntese química ou da extração de plantas (SCHMIDT-DANNERT, 2000).

A síntese química dos carotenóides apresenta desvantagens como: a necessidade de desenvolvimento de novas rotas de síntese para cada novo carotenóide de interesse, a dificuldade de produção de carotenóides complexos, a formação de misturas de isômeros e a poluição ambiental causada pelos resíduos gerados durante o processo. Mas, este processo de obtenção do carotenóide tem baixo custo.

As indústrias de alimentos empregam estes pigmentos na reposição da cor dos produtos perdida durante o processamento e armazenamento, na coloração de alimentos incolores e na uniformização da cor. Vale ressaltar que os carotenóides são precursores de compostos voláteis contribuindo no sabor e no aroma e também podem colaborar com a prevenção da rápida oxidação de constituintes dos alimentos, sequestrando o oxigênio singlete. As indústrias de ração utilizam os carotenóides com o objetivo de promover a pigmentação adequada aos animais. As indústrias farmacêuticas e cosméticas empregam

estas substâncias devido as suas propriedades anticarcinogênicas, imunomoduladores, antioxidantes e pró-vitamina A (SCHROEDER e JOHNSON, 1995).

A crescente demanda ocasionada pelas descobertas da utilização e as desvantagens proporcionadas pela síntese química de carotenóides, favoreceram o aumento do interesse na produção biológica dos mesmos. Assim, estudos estão sendo desenvolvidos com o objetivo de aumentar a produção de carotenóides por microrganismos através do emprego de diferentes espécies, substratos e combinações de genes e moléculas (BUZZINI e MARTINI, 1999; SCHMIDT-DANNERT, 2000).

3.6.5. Microrganismos produtores de carotenóides

Muitos microrganismos são produtores de carotenóides, mas apenas alguns são biotecnologicamente interessantes.

A alga *Dunaliella salina*, sob condições de estresse como alta intensidade de luz, temperatura, deficiência de nitrogênio e fósforo e salinidade produz, mais de 14% de seu peso seco em carotenóides. A microalga *Haematococcus pluvialis* sintetizou astaxantina, quando cultivada sob luminosidade controlada, em torno de 5,8 mg/L.dia em cultura semi-continua após 12 dias de incubação e 9,6 mg/L.dia em cultura semi-continua após 15 dias de incubação (BOROWITZKA e BOROWITZKA, 1989; FÁBREGAS et al., 2001). A intensidade luminosa favorece não só o aumento das taxas de acúmulo de carotenóides, mas também a síntese de novos carotenóides, como constatado por BOHME et al. (2002) que verificaram a produção de violaxantina após incidir luz na cultura da alga *Mantoniella squamata*. Vale ressaltar que KOBAYASHI et al. (1993) estudando a produção de astaxantina pela microalga *Haematococcus*, verificaram que compostos como acetato e acetato plus Fe (sup2+) intensificam a produção do carotenóide, enquanto que antomicina a inibe.

O fungo *Blakeslea trispora* produz β -caroteno em grandes quantidades em processos fermentativos em larga escala (cerca de 17 mg/g de peso seco) (CIEGLER, 1965). Cepas selvagens do fungo *Phycomyces blakesleeanus* produzem 0,040 mg/g de β -caroteno, enquanto cepas superprodutoras produzem 25 mg/g de peso seco (CERDÁ-

OLMEDO, 1989).

Bactéria psicotrófica do gênero *Micrococcus roseus*, formadora de colônias vermelhas, foi examinada qualitativamente e quantitativamente em relação aos carotenóides produzidos, os quais são equivalentes a 0,13% do seu peso seco (STRAND et al., 1997).

A produção de carotenóides pelas leveduras *Rhodotorula rubra* e *Lactobacillus casei* cultivadas em soro de queijo ultrafiltrado, foi influenciada pela aeração intensiva (acima de 1,0 L/L.min) que estimulou a síntese de beta-caroteno, sendo a concentração de carotenóides totais igual a 0,49 mg/g de massa seca em taxa de aeração de 1,3 L/L.min (SIMOVA et al., 2003)

A levedura vermelha *Phaffia rhodozyma* é fonte natural de astaxantina, a qual tem sido comercializada como suplemento alimentar na aquicultura. Esta levedura produziu 4,1 µg/mL de carotenóides em meio contendo somente água de maceração de milho, equivalente a 0,3 µg/mg de massa seca (LEATHERS, 2003).

A produção de carotenóide também foi observada quando as leveduras *Rhodotorula rubra* e *Rhodotorula glutinis* cresceram em meio de cultura contendo caldo de cana como fonte de substrato. A produção máxima de carotenóide total por grama de massa seca, foi de 427 µg pela *Rhodotorula rubra* e 197 µg pela *Rhodotorula glutinis* (SQUINA et al., 2002). Em fermentações em batelada de 120 horas, empregando mosto de uva como fonte de carbono, a levedura *Rhodotorula glutinis* produziu 5,95 mg/L de carotenóides totais no meio fluido e 630 µg/g de massa seca (BUZZINI e MARTINI, 1999).

A levedura *Rhodotorula glutinis* 22P e o *Lactobacillus helveticus* 12A foram cultivadas juntas em soro de queijo ultrafiltrado contendo 42 g/L de lactose para a produção de carotenóide e proteína. A produção de carotenóide total obtida foi de 248 µg/mg de massa seca, sendo o carotenóide torulahodina presente em maior quantidade (FRENGOVA et al., 1997).

É possível observar nos processos fermentativos citados anteriormente, principalmente nos que utilizam leveduras, o uso de sub-produtos agro-industriais como substrato. Estes resíduos, que freqüentemente causam sérios problemas ambientais podem, além de contribuir como fontes de carbono de baixo custo, ter sua DBO reduzida,

enquanto são obtidos compostos bioquímicos adequados para a utilização em indústrias farmacêuticas, químicas e de alimentos (BUZZINI e MARTINI, 1999).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Microrganismo

A bactéria *Kocuria rhizophila*, empregada neste estudo, foi isolada da água residuária de abatedouro avícola e identificada pela Fundação André Tosello. A cepa está mantida em estoque no Laboratório de Processos Fermentativos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

4.2. Substratos

Sacarose, querosene e óleo de soja foram utilizados como fonte de carbono em concentrações fixas com a finalidade de determinar a relação entre o crescimento celular e a produção de biossurfactante. A concentração inicial do óleo de soja e do querosene empregados foi de 5,0% (v/v) e a da sacarose de 50 g/L.

4.3. Meio de Cultura

4.3.1. Meio de manutenção

A cepa foi mantida em tubos de ensaio inclinados contendo o meio de cultura ágar nutriente com pH 7,00 a 4°C, previamente esterilizados a 121°C por 15 minutos (KOVÁCS et al., 1999). A cultura foi repicada mensalmente.

4.3.2. Meio adaptado para a pré-cultura

O meio mineral ou meio líquido empregado na pré-cultura está descrito na Tabela 4.1, sendo a fonte de carbono utilizada de acordo com as concentrações citadas no item 4.2. O pH do meio adaptado para a pré-cultura foi ajustado para 7,0 e esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos.

Tabela 4.1- Composição do meio adaptado para a pré-cultura.

Composto	Concentração (g/L)
NH ₄ Cl	1,0
K ₂ HPO ₄	2,06
Na ₂ SO ₄	2,0
NaNO ₃	1,7
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,002
Extrato de Levedura	1,0
Peptona	1,0

FOGHT et al. (1989), modificado.

4.3.3. Meio de cultura

O meio de cultura utilizado nas fermentações de foi o mesmo citado no item 4.3.2., sendo a fonte de carbono adicionada como exposto no item 4.2. Após a realização do procedimento descrito no item anterior o meio foi esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos e incubados por 72 horas.

4.4. Preparo do Inóculo

A pré-cultura foi preparada em frascos Erlenmeyers, cujo conteúdo do meio de cultura (item 4.3.2.), juntamente com o substrato estabelecido para o estudo (item 4.2), foram correspondente a 20% do volume. A pré-cultura foi incubada em agitador rotativo por um período de 24 horas a 30°C e 150 rpm. O caldo de fermentação foi inoculado com 10% (v/v).

4.5. Fermentações e Condições de Cultivo

Primeiramente o processo fermentativo foi conduzido em frascos Erlenmeyers, contendo meio de cultura correspondente a 20% do seu volume total e agitados em agitador rotativo a 150 rpm. A melhor condição para a produção de biossurfactante nos frascos

Erlenmeyers foi reproduzida em fermentador de bancada (Bioflo III) com agitação de 300 rpm para avaliação da influência da aeração. O tempo total das fermentações foi de 72 horas e as amostras foram retiradas a cada 12 horas.

4.5.1. Influência da temperatura de incubação e do pH na produção de biomassa e biossurfactante.

Na primeira etapa realizada em frascos Erlenmeyers em agitador rotativo, determinou-se a melhor condição de temperatura e pH para o crescimento celular e produção de biossurfactante. As temperaturas avaliadas foram 20, 30 e 38°C e o pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 5,0, 7,0 e 9,0 com adição de HCl 2N ou NaOH 2N.

4.5.2. Influência da fonte de carbono na produção de biomassa e biossurfactante.

As fontes de carbono descritas no item 4.2 foram associados às condições de temperatura e pH (item 4.5.1) possibilitando verificar a capacidade do microrganismo de utilizar cadeias carbônicas complexas para se desenvolver e produzir biossurfactante.

4.5.3. Influência da concentração da fonte de nitrogênio orgânico e inorgânico na produção de biomassa e biossurfactante.

A concentração das fontes de nitrogênio inorgânico (NH_4Cl) e orgânico (extrato de levedura) do meio de cultura descrito no item 4.3.2 foram substituídas e combinadas entre si, com a finalidade de avaliar a influência destes compostos no crescimento celular e na produção de biossurfactante. Para isto, a condição de maior produção de biossurfactante, determinada pelos experimentos realizados nas condições descritas no item 4.5.2., foi empregada sendo substituída alternadamente às concentrações das fontes de nitrogênio em 0% e 50% dos valores apresentados na Tabela 4.1.

4.5.4. Influência da aeração na produção de biomassa e biossurfactante.

Nesta etapa as fermentações foram realizadas em fermentador de bancada (item 4.5.) para que o efeito da aeração pudesse ser avaliado. No fermentador foi empregada

a condição de maior produção de biossurfactante obtida em frascos Erlenmeyers agitados e taxas de aerações de 0,5, 1,5 e 2,0 vvm

4.6. Métodos Analíticos

4.6.1. Determinação do pH

A determinação do pH foi feita através de leitura direta em potenciômetro (DIGIMED, modelo DM 20).

4.6.2. Determinação da massa seca

O meio de cultura fermentado foi centrifugado a 3500 rpm por 25 minutos. Na presença de óleo formou-se uma fase intermediária aquosa, isenta de células bacterianas a qual foi removida cuidadosamente e filtrada. Ao restante foi adicionado uma mistura de etanol-butanol-clorofórmio (10:10:1 v/v), agitando, para que o óleo residual pudesse ser removido e centrifugando novamente a 3500 rpm por 15 min. O sobrenadante, composto da mistura de solventes mais o óleo residual, foi descartado e as células foram resuspensas na mistura de solventes e centrifugadas novamente para a remoção total do óleo (SAMPAIO, 1995). Na presença de sacarose o sobrenadante foi removido e as células foram lavadas com água destilada.

O concentrado celular obtido foi seco a vácuo de 640 mm Hg a 60°C por 24 horas. Assim, pela diferença da massa do tubo com e sem as células bacterianas, expressou-se a massa seca em termos de concentração (g/L).

4.6.3. Determinação da atividade de emulsificação

A atividade de emulsificação foi determinada através do método descrito por JOHNSON et al. (1992).

O meio fermentado foi centrifugado e filtrado para a remoção das células e gotículas de óleo. Do sobrenadante foi retirado uma alíquota de 3,5 mL depositada em tubo com rosca juntamente com 2,0 mL de óleo de soja. O tubo foi agitado vigorosamente

em vortex por 1 minuto e após repouso de 1 hora foi medida a densidade óptica a 610 nm. Logo, subtraindo-se o valor do branco obtido através da medida da densidade óptica do meio antes de realizar a agitação em vortex obteve-se a atividade de emulsificação expressa em UA (unidades de absorbância). Assim, uma unidade de atividade de emulsificação foi definida como a quantidade de surfactante extracelular capaz de produzir uma leitura de 1,0 a 610 nm.

4.6.3.1. Determinação da atividade de emulsificação utilizando diferentes compostos insolúveis em água.

A atividade de emulsificação descrita no item 4.6.3 foi feita somente com óleo de soja compondo a fase imiscível. Neste experimento utilizou-se filtrado com pH ajustado para 7,00 e diferentes compostos como: querosene, hexano, óleo de canola e óleo de girassol para avaliar o comportamento do biossurfactante e/ou sua capacidade de emulsificar estes compostos seguindo o método descrito no item 4.6.3.

4.6.4. Determinação da estabilidade do biossurfactante

A estabilidade foi avaliada em relação ao pH e a temperatura. Inicialmente, o meio de fermentação foi centrifugado e filtrado, nas condições apresentadas no item 4.6.3, sendo o sobrenadante obtido utilizado nas determinações.

4.6.4.1. Efeito da temperatura na estabilidade do biossurfactante.

O filtrado obtido no item anterior foi depositado em tubos com rosca no volume necessário para a realização da análise da atividade de emulsificação (item 4.6.3). Os tubos foram colocados em banho-maria a 80°C por um período de 180 minutos. As amostras retiradas de 30 em 30 minutos foram resfriadas a temperatura ambiente e analisadas como descrito no item 4.6.3. Assim, observou-se a influência da temperatura na estabilidade do biossurfactante.

4.6.4.2. Efeito do pH na estabilidade do biossurfactante.

O filtrado obtido no item 4.6.4 foi dividido em várias porções sendo o pH de cada uma ajustado a um valor diferente variando de 2,0 a 10,0. Em seguida, as amostras foram submetidas à análise de atividade de emulsificação como descrito no item 4.6.3.

4.6.5. Determinação da tensão superficial

4.6.5.1. Tensiômetro

A medida da Tensão Superficial foi feita utilizando-se um tensiômetro KRUESS PROCESSOR TENSIONMETER K10ST (KRUESS GmbH Alemanha). As análises foram feitas pelo método de placa, utilizando uma placa de platina iriada com perímetro molhado de 40,0 mm, comprimento de 19,9 mm e espessura de 0,10 mm, denominada placa de Wilhelmy.

As medidas foram realizadas à temperatura ambiente considerando desvio padrão referente a 5 medidas de $\leq 0,20$ mN/m. A redução da tensão superficial foi determinada após descontar a medida da tensão superficial do meio de cultura sem fermentar.

4.6.5.2. Lei de Tate – Método das Gotas.

De acordo com GONÇALVES (1964) a Lei de Tate é baseada no escoamento em gotas, o qual ocorre quando um líquido goteja da extremidade de um tubo formando uma gota que cairá quando o seu peso for suficiente para romper a membrana superficial. A força capaz de causar o rompimento deve ser igual a:

$$F = 2\pi R\gamma \quad (4.1)$$

onde R é o raio de saída do tubo; F é a força capaz de causar o rompimento da gota e γ é a tensão superficial.

O enunciado da Lei de Tate:

“O peso de uma gota é proporcional ao raio do tubo e a tensão superficial do líquido”.

Assim, para um mesmo tubo todas as gotas de um mesmo líquido terão o mesmo peso. A aplicação do método das gotas se dá com a contagem de um grande número de gotas de um líquido e a determinação do peso das mesmas. Pela Lei de Tate tem-se:

$$p = 2\pi R\gamma \quad (4.2)$$

Repetindo a operação para um líquido de tensão superficial conhecida:

$$p' = 2\pi R\gamma' \quad (4.3)$$

Dividindo a Equação (4.2) pela Equação (4.3) tem-se:

$$\frac{p}{p'} = \frac{\gamma}{\gamma'} \quad \text{ou} \quad \frac{m'g}{m} = \frac{\gamma'}{\gamma} \quad (4.4)$$

$$\therefore \gamma = \gamma' \frac{m}{m'}$$

onde p é peso da gota; p' é peso da gota de um líquido de tensão superficial conhecida; γ é tensão superficial conhecida; m é a massa da gota; m' é massa da gota do líquido de tensão superficial conhecida e g é aceleração da gravidade.

4.6.6. Isolamento do biossurfactante

4.6.6.1. Precipitação básica do biossurfactante.

O meio de cultura fermentado foi centrifugado a 3500 rpm e filtrado para a remoção das células e de gotículas de óleo. No filtrado obtido adicionou-se NaOH 2N até pH 10,0. Em seguida, a solução formada foi mantida a 4°C por 24 horas sendo o precipitado formado separado por centrifugação a 3500 rpm por 15 minutos.

4.6.6.2. Precipitação por adição de acetona

Fez-se o mesmo procedimento descrito no item anterior, sendo substituída apenas a etapa de adição de NaOH pela adição de acetona na proporção 3:1.

4.6.7. Determinação do consumo de substrato

O consumo de sacarose foi determinado através do método DNS (MILLER, 1959), após hidrólise ácida das amostras do meio com sacarose. A resposta foi expressa em concentração (g/L) através da comparação com a curva padrão para a sacarose hidrolisada (Apêndice B).

A concentração de óleo residual foi mensurada através da obtenção de amostras homogeneizadas do fermentador misturadas por agitação intensa com volume igual de éter de petróleo. Logo, as amostras contendo éter de petróleo e substrato residual foram transferidas para um balão volumétrico e após 30 minutos uma alíquota de 5,00 mL foi retirada e depositada em Placa de Petri tarada. Após secagem a 60°C em estufa a vácuo a placa foi pesada e o resíduo (substrato) determinado pela diferença de peso.

4.7. Análise dos Carotenóides

4.7.1. Determinação de carotenóides

A massa celular obtida por centrifugação foi pesada e triturada juntamente com acetona e hiflosupercel (celite) para que a parede celular pudesse ser rompida e os carotenóides extraídos. A mistura obtida foi filtrada, transferida para um funil de separação juntamente com mistura de éter de petróleo/éter etílico (2:1). A solução foi lavada com água destilada, a qual foi removida do funil carregando a acetona.

O extrato obtido foi transferido para um frasco Erlenmeyer contendo sulfato de sódio anidro para a remoção da água residual e posteriormente transferido para outro frasco Erlenmeyer contendo solução de KOH 10% em metanol, para saponificação e mantido à temperatura ambiente no escuro por 12 horas. O álcali foi removido pela lavagem com água destilada e o extrato concentrado em evaporador rotatório (FISATON 802 D). O

volume do extrato obtido foi ajustado em balão volumétrico com éter de petróleo e a absorbância medida em espectrofotômetro (Hach Spectrophotometer DR/4000) (DAVIES 1976; RODRIGUES-AMAYA, 1999).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Condições Experimentais

Neste trabalho, a parte experimental foi conduzida em Erlenmeyers, com temperatura controlada, e em um fermentador de bancada de 6 litros.

Foram determinadas, nos Erlenmeyers, as condições operacionais que resultaram na máxima atividade do biossurfactante e no maior rendimento celular, as quais foram posteriormente empregadas no fermentador de bancada.

As condições operacionais foram:

Erlenmeyers – Três níveis de pH (5,0, 7,0 e 9,0), três níveis de temperatura (20, 30 e 38°C), três substratos (sacarose, óleo de soja e querosene), dois níveis de concentração de NH₄Cl, dois níveis de concentração de extrato de levedura e agitação de 150 rpm.

Fermentador de bancada – Um nível de pH (9,0), um de substrato (óleo de soja), um nível de agitação (300 rpm) e três níveis de aeração (0,5 VVM, 1,5 VVM e 2,0 VVM).

5.2. Experimentos em Erlenmeyers

Os experimentos feitos em Erlenmeyers agitados foram conduzidos conforme descrito no item 4.5. Os resultados estão apresentados nas Figuras 5.1 a 5.24, Tabela 5.1 e 5.2 e no Apêndice Tabelas A-1 a A-14.

5.2.1. Atividade de emulsificação

A atividade de emulsificação foi medida de acordo com o item 4.6.3. e os resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 5.1 a 5.17 em unidades de absorvância (UA).

5.2.1.1. Influência da fonte de carbono, da temperatura de incubação e do pH inicial da fermentação na produção do biossurfactante.

Nesta primeira etapa, determinou-se a relação entre o substrato utilizado como fonte de carbono e os fatores físico-químicos (pH inicial de fermentação e temperatura de incubação) com a atividade de emulsificação. Os substratos avaliados foram sacarose, querosene e óleo de soja, as temperaturas de incubação empregadas foram 20, 30 e 38°C e o pH inicial da fermentação 5,0, 7,0 e 9,0 ajustados com adição de HCl 2N ou NaOH 2N. Nestas fermentações as concentrações das fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico foram fixadas em 1,0 g/L e a agitação em 150 rpm.

Inicialmente, a capacidade da bactéria *Kocuria rhizophila* de produzir biossurfactante, através da degradação de substratos hidrofílicos e hidrofóbicos, foi avaliada realizando-se fermentações a 30°C e com pH inicial de 7,0. Estas condições foram selecionadas, pois KOVÁCS et al. (1999) relataram a inibição deste microrganismo em temperaturas superiores a 40°C e que o mesmo apresentava bom desenvolvimento entre pH 5,70 e 7,70. Após 48 horas de fermentação, verificou-se que a bactéria conseguiu se desenvolver somente nos meios contendo sacarose e óleo de soja. O meio de cultura com querosene permaneceu da mesma forma em que foi incubado. Logo, determinou-se que as fontes de carbono empregadas nas fermentações que dariam continuidade ao trabalho seriam a sacarose e o óleo de soja.

Vale ressaltar que não foram encontrados trabalhos publicados sobre o emprego da bactéria *Kocuria rhizophila* em processos fermentativos. Por isso, o meio de cultura utilizado possuiu composição semelhante ao empregado por FOGHT et al. (1989), no estudo da produção de bioemulsificante através da degradação de óleo diesel por culturas de bactérias, como descrito na Tabela 4.1.

Analisando as Figuras 5.1 a 5.17, observa-se que a atividade de emulsificação apresenta um comportamento descontínuo, isto é, ocorrem picos em diferentes tempos de fermentação. Estes picos de produção de biossurfactante também foram observados por SARUBBO et al. (1999), os quais relataram este comportamento durante a fase estacionária de crescimento da levedura *Candida lipolytica*, concluindo que este composto foi

produzido como um metabólito secundário. Segundo LIMA (1997) outro fator que pode alterar a atividade de emulsificação é o fato que o biossurfactante pode estar presente nas três fases físicas da fermentação: na fase aquosa, aderido a parede celular do microrganismo, preso às gotas de óleo na interface óleo-água e na fase oleosa, sendo dificultada a medida pelo método disponível.

As Figuras 5.1, 5.2 e 5.3 mostram a produção de biossurfactante pela bactéria *Kocuria rhizophila* nas fermentações conduzidas a 20°C, nos valores de pH iniciais de fermentação 5,0, 7,0 e 9,0 respectivamente, em meios de cultura contendo sacarose e óleo de soja como substrato. A produção de biossurfactante a temperatura de 20°C foi maior quando o óleo de soja foi utilizado como fonte de carbono e associado ao maior valor de pH inicial de fermentação. A máxima atividade de emulsificação foi de 1,185 UA em 36 horas de fermentação. No apêndice A, nas Tabelas A-1 e A-5, são apresentados os resultados completos das fermentações com sacarose e óleo de soja respectivamente.

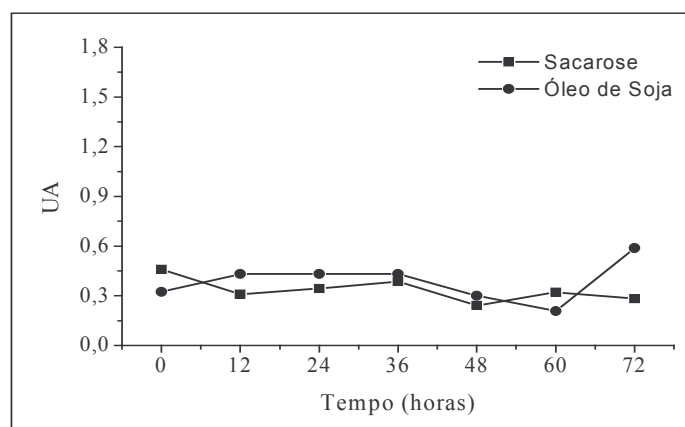


Figura 5.1 - Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 5,0 e a 20°C.

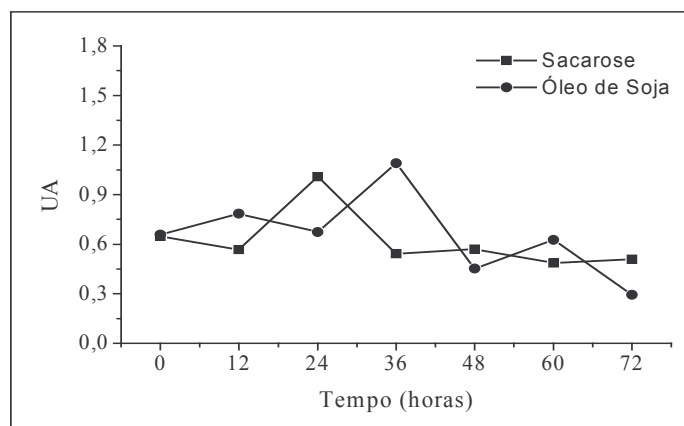


Figura 5.2 - Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 7,0 e a 20°C.

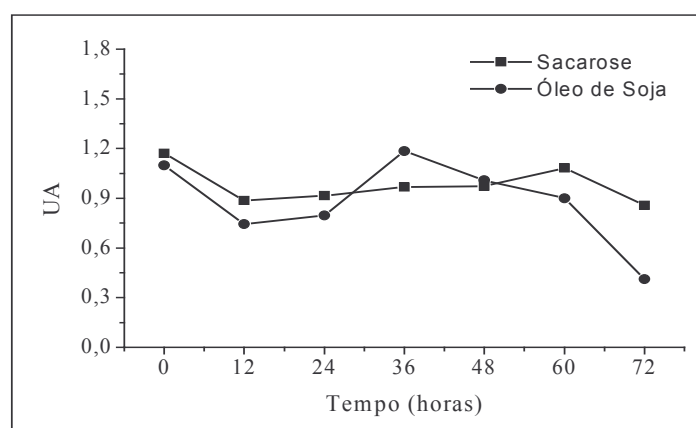


Figura 5.3 - Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 9,0 e a 20°C.

As Figuras 5.4, 5.5 e 5.6 ilustram o comportamento da bactéria *Kocuria rhizophila* em relação a sua capacidade de produção de biossurfactante em fermentações conduzidas a 30°C. A maior produção foi de 1,518 UA, obtida em 24 horas de fermentação, cujo experimento foi feito com óleo de soja e pH inicial 9,0. As Tabelas A-2 e A-6 mostram os resultados completos das fermentações feitas com sacarose e óleo de soja, respectivamente.

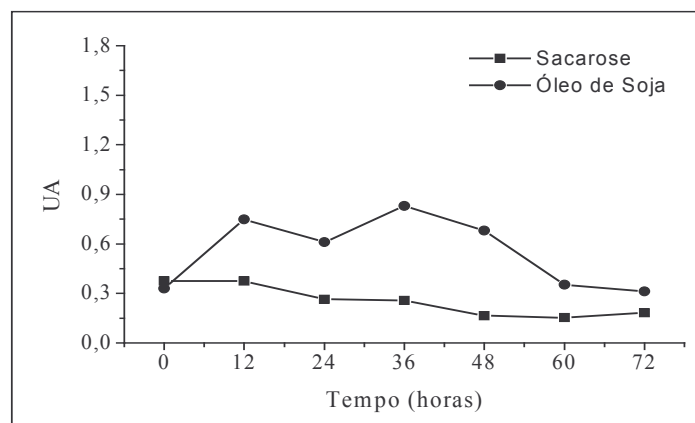


Figura 5.4 - Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 5,0 e a 30°C.

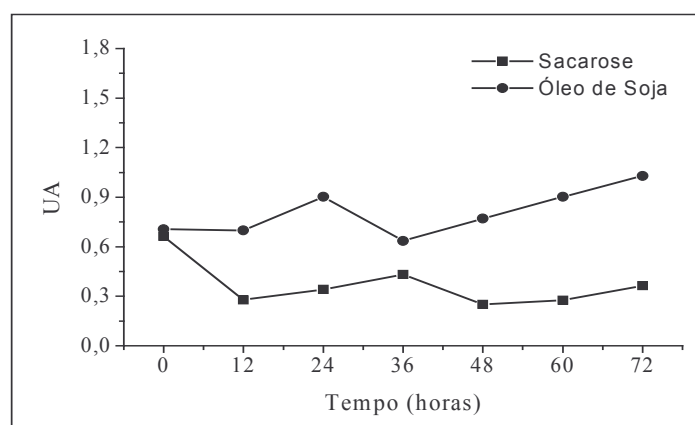


Figura 5.5 - Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 7,0 e a 30°C.

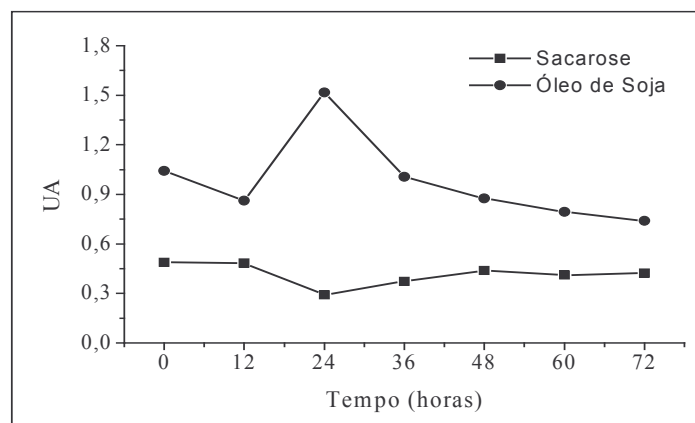


Figura 5.6 - Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 9,0 e a 30°C.

As Figuras 5.7, 5.8 e 5.9 mostram a produção de biossurfactante em fermentações conduzidas a 38°C em meios de cultura contendo sacarose e óleo de soja como substrato. A produção de biossurfactante alcançou um valor de 1,627 UA na fermentação com pH inicial de 5,0; e 1,405 UA na fermentação com pH inicial de 9,0; ambos em 72 horas de fermentação utilizando óleo de soja como substrato. Nestas condições também foi observada atividade de emulsificação de 1,561 UA em 24 horas de fermentação com sacarose. Os resultados completos destas fermentações estão apresentados no Apêndice A nas Tabelas A-3 e A-7.

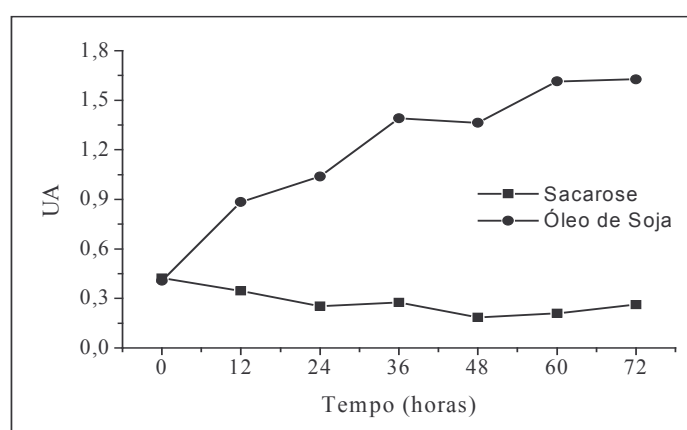


Figura 5.7 - Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 5,0 e a 38°C.

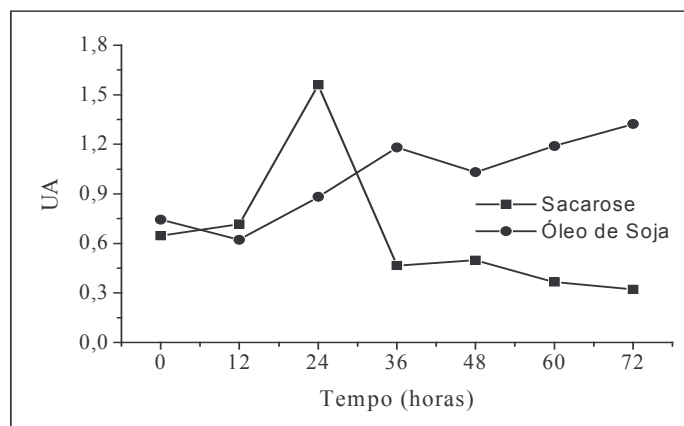


Figura 5.8 - Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 7,0 e a 38°C.

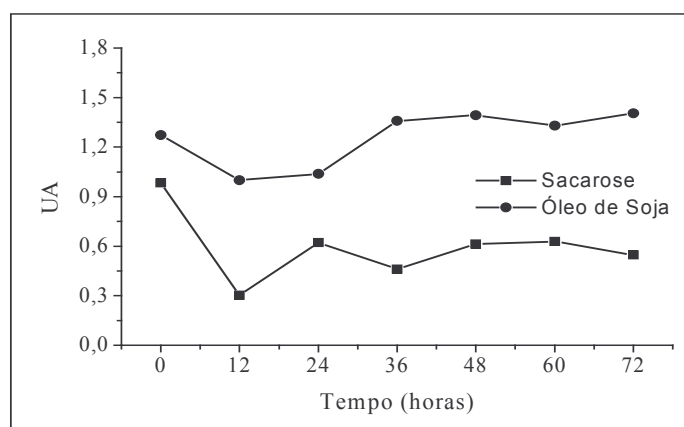


Figura 5.9 - Atividades de emulsificação (UA) obtidas nos experimentos conduzidos com pH inicial da fermentação de 9,0 e a 38°C.

As fermentações feitas com meio de cultura contendo sacarose como fonte de carbono resultaram em baixa produção de biossurfactante. Porém este fato é considerado insuficiente para descartar a produção de biossurfactante pela bactéria *Kocuria rhizophila* em meio contendo substrato hidrossolúvel, como a sacarose, pois após 24 horas de fermentação com pH inicial 7,0, na temperatura de 20°C e de 38°C, houve considerável

atividade de emulsificação 1,009 UA e 1,561 UA, respectivamente.

As diferenças de atividades de emulsificação obtidas nos experimentos acima descritos podem ter ocorrido devido a biodisponibilidade do substrato, o qual afeta a produção de biosurfactante pela complexidade de degradar e assimilar a fonte de carbono; ou ainda pela característica do microrganismo de iniciar a produção induzido pela baixa concentração de substrato, sais e extremos de pH (DESAI e BANAT,1997). JONHSON et al. (1992) também observaram que a produção do bioemulsificante, pela levedura *Rhodotorula glutinis*, foi influenciada significativamente pela temperatura e pelo pH inicial da fermentação. Já PATIL e CHOPADE (2001) relataram que no pH 7,2 e a 37°C foram alcançadas maior produção e máxima atividade do bioemulsificante sintetizado pela bactéria *Acinetobacter junii* SC14, após avaliarem temperaturas de 20 a 50°C e pH entre 5,0 e 9,0.

5.2.1.2. Efeito dos nutrientes do meio de cultura e do pH na atividade de emulsificação.

Nas Figuras 5.1 a 5.9 é possível observar que não foi desconsiderado o tempo inicial das fermentações. A necessidade de apresentar tais valores surgiu como forma de mostrar que a resposta obtida como atividade de emulsificação, através do método utilizado, pode ter sofrido interferência dos componentes do meio de cultura. Este problema encontra-se embutido em todos os resultados, apesar da sua minimização com o decorrer da fermentação devido à diminuição da concentração dos componentes do meio de cultura. A solução deste problema é dificultada devido a não determinação do componente do meio de cultura e respectiva concentração responsável por favorecer a formação da emulsão.

Observou-se também que, na maioria dos experimentos, a medida de atividade de emulsificação obtida no ponto inicial da fermentação (0 horas) apresentava relação direta com o pH do meio correspondente; conseqüentemente, as medidas feitas nos meios de cultura com pH inicial de 9,0 foram superiores às obtidas nas fermentações iniciadas com pH 5,0 e 7,0. Tal fato pode ser observado na Tabela 5.1, na qual estão expostos os valores de pH, referentes aos pontos iniciais das fermentações realizadas com sacarose e óleo de

soja a 38°C, e as respectivas atividades de emulsificação.

Tabela 5.1 - Resultados da análise da atividade de emulsificação determinados em 0 horas de fermentação.

Fonte de Carbono	pH inicial 5,0		pH inicial 7,0		pH inicial 9,0	
	pH	AE (UA)	pH	AE (UA)	pH	AE (UA)
Sacarose	5,15	0,423	7,08	0,647	9,26	0,984
Óleo de Soja	5,14	0,407	7,12	0,743	9,06	1,272

Com isso, a análise para a determinação da atividade de emulsificação foi feita em uma única amostra dividida em várias porções, as quais tiveram o pH ajustado para os valores de 2,0 a 10,0. Esta análise mostrou a relação direta entre a formação da emulsão e a sua estabilidade com a variação do pH do sobrenadante (amostra), como mostra a Figura 5.10.

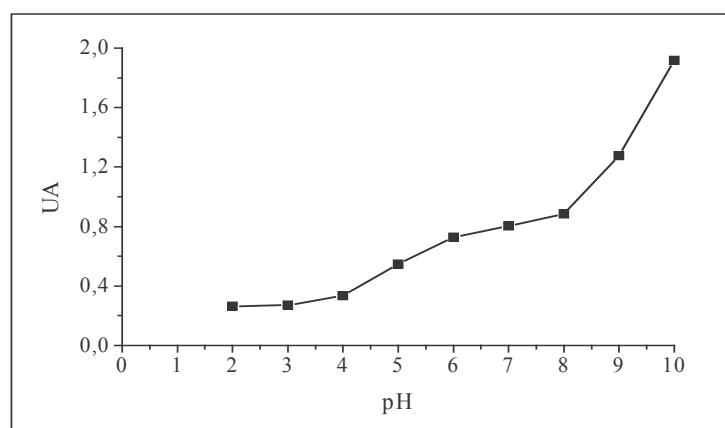


Figura 5.10 - Atividades de emulsificação (UA) após ajuste do pH de uma única amostra para vários valores de pH.

Tal fato implicou na necessidade de ajustar o pH do sobrenadante antes de utilizá-lo na determinação da atividade de emulsificação. Na literatura existem relatos de precipitação do biossurfactante em pH 2,0 e pH 10,0, então para que não houvesse risco de precipitação o sobrenadante teve o pH ajustado para 7,0.

MORIKAWA et al. (2000) verificaram aumento da atividade

biossurfactante com o aumento do pH, e relataram que a atividade superficial depende do pH devido à presença de duas cadeias carboxílicas na porção peptídica da molécula. CHAMPION et al. (1995) relataram que a conformação do ramnolípido é alterada com o aumento do pH, resultando na maior ou menor dispersão do hidrocarboneto no meio.

Selecionou-se a temperatura de 38°C, pH inicial de fermentação igual a 9,0 e o óleo de soja como fonte de carbono para que a relação entre a atividade de emulsificação e o pH do sobrenadante pudesse ser melhor avaliada através de uma nova fermentação. Os valores em unidades de absorbância obtidos na determinação da atividade emulsificante estão apresentados nas Figuras 5.11, 5.12 e 5.13, os quais correspondem as análises diretas dos sobrenadantes e também após o ajuste do pH dos mesmos para 7,0.

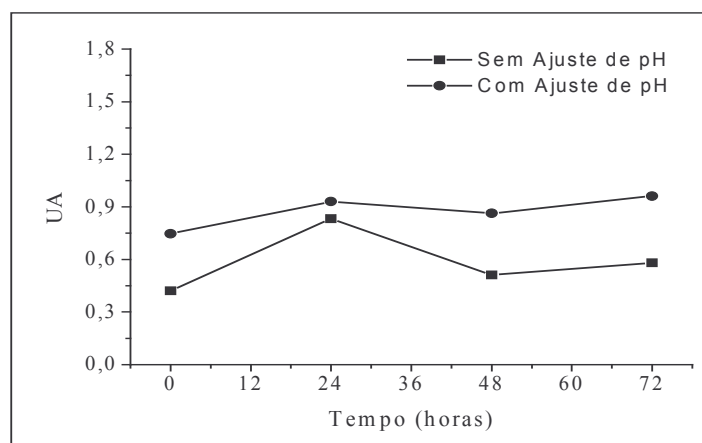


Figura 5.11 - Atividades de emulsificação (UA) em fermentação a 38°C e pH inicial 5,0.

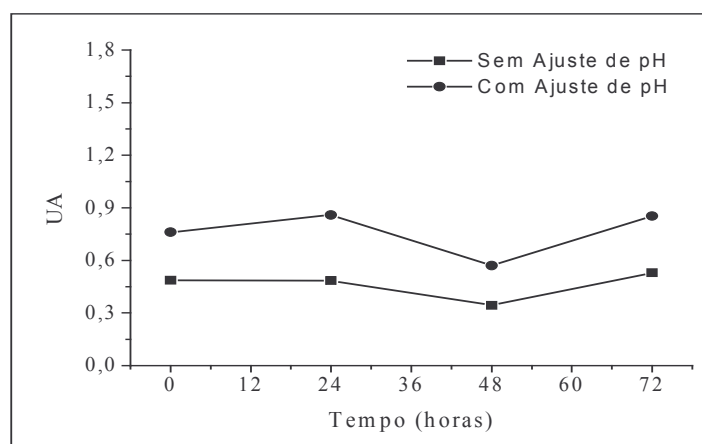


Figura 5.12 - Atividades de emulsificação (UA) em fermentação a 38°C e pH inicial 7,0.

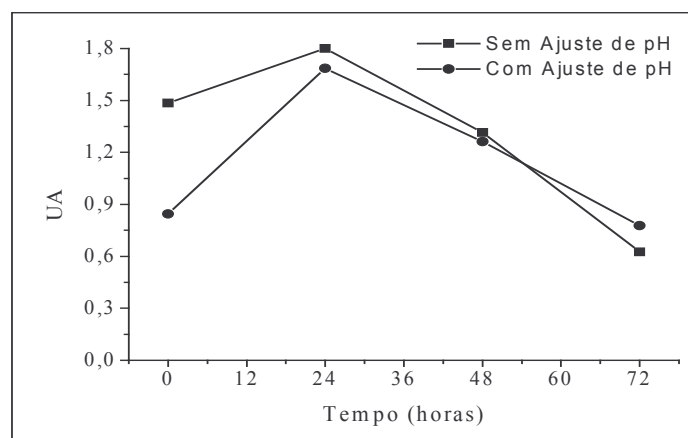


Figura 5.13 - Atividades de emulsificação (UA) em fermentação a 38°C e pH inicial 9,0.

As curvas presentes nas Figuras 5.11, 5.12 e 5.13 e os resultados completos das fermentações apresentados nas Tabelas A-8, A-9 e A-10, mostram que o ajuste do pH altera realmente as atividades de emulsificação.

Os sobrenadantes correspondentes as fermentações com pH inicial 5,0 e 7,0, Figuras 5.11 e 5.12 respectivamente, sofreram elevação do pH e como consequência, as curvas das amostras ajustadas descrevem valores de atividade de emulsificação superiores aos das não ajustadas. Por outro lado, na fermentação com pH inicial 9,0 os pontos correspondentes aos tempos 0 e 24 horas de fermentação com pH 8,95 e 7,44, respectivamente, sofreram diminuição do pH e as suas atividades de emulsificação também diminuíram. Já em 48 horas o pH estava bem próximo de 7,0 o que justifica a pouca alteração na atividade de emulsificação. Em 72 horas de fermentação, o pH estava em 6,70 e a sua elevação para 7,0 causou aumento na atividade de emulsificação. Nestas fermentações, a atividade de emulsificação máxima foi de 1,686 UA em 24 horas na condição de pH inicial 9,0.

5.2.1.3. Influência da concentração da fonte de nitrogênio orgânico e inorgânico na produção do biossurfactante.

A fonte de nitrogênio orgânico estava presente no meio de cultura na forma de extrato de levedura e a inorgânica na forma de NH_4Cl , ambas utilizadas na concentração de 1,0 g/L. Condições limites de concentração da fonte de nitrogênio podem influenciar na produção do biossurfactante; sendo assim, as fermentações foram feitas a 38°C, com pH inicial 9,0, em meio de cultura contendo óleo de soja como substrato e várias combinações das fontes de nitrogênio.

As Figuras 5.14 a 5.17 apresentam as atividades de emulsificação, sendo as curvas correspondentes aos valores obtidos através da análise direta dos sobrenadantes e também após o ajuste do pH dos mesmos para 7,0.

Assim, verificou-se que as atividades de emulsificação aumentaram, apesar do comportamento descontínuo da produção devido ao aparecimento dos picos. As maiores atividades correspondem à fermentação feita com meio de cultura sem extrato de levedura e 1,0 g/L de NH_4Cl . O valor máximo da atividade de emulsificação obtido em sobrenadante depois de ajustado o pH para 7,0 foi 1,959 UA, alcançado em 48 horas de fermentação (Figura 5.16).

Verificou-se também que aumentando a concentração da fonte de nitrogênio inorgânico houve aumento na atividade, em torno de 0,200 UA (Figuras 5.14 e 5.15), e deslocamento do pico presente em 60 horas de fermentação (0,0 g/L de NH_4Cl) para 24 horas (0,5 g/L de NH_4Cl). LIMA (1997), estudando a produção de bioemulsificante pela levedura *Saccharomyces lipolytica* através da degradação do óleo diesel, também verificou a relação entre o aumento da concentração de NH_4Cl e a atividade de emulsificação, obtendo máximo de 0,800 UA em 96 horas de fermentação, quando elevou a concentração de 1,0 g/L para 10,0 g/L. GUERRA-SANTOS et al. (1984) observaram a produção de ramnolipídeos pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa*. A maior concentração de biossurfactante foi igual a 1,5 g/L em meio de cultura contendo nitrato como fonte de nitrogênio, ferro em concentração mínima e fósforo em excesso.

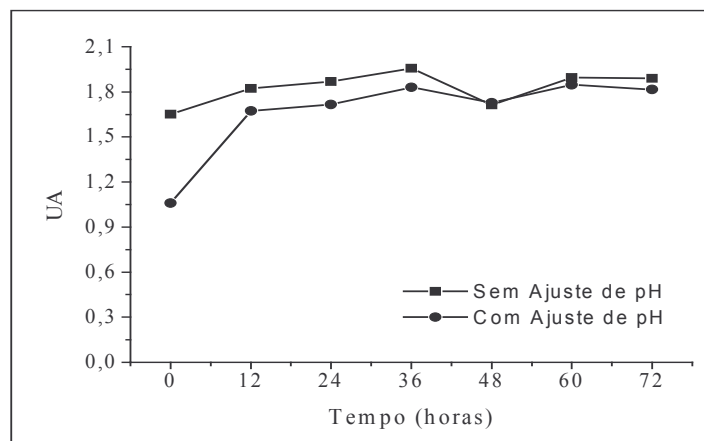


Figura 5.14 - Atividades de emulsificação (UA) em fermentação sem NH_4Cl e 1,0 g/L de extrato de levedura.

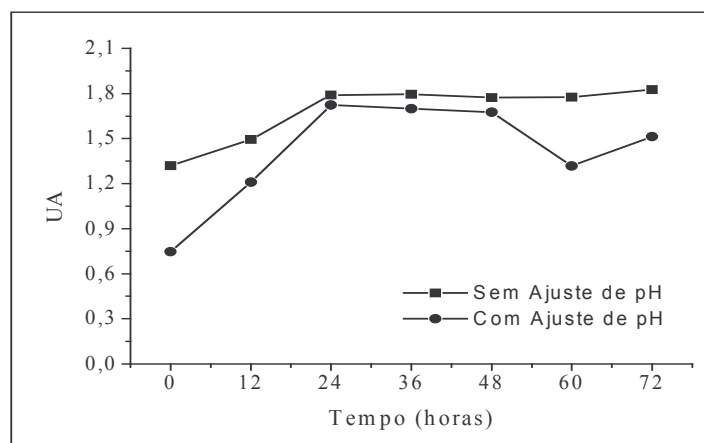


Figura 5.15 - Atividades de emulsificação (UA) em fermentação cujo meio de cultura continha 0,5 g/L de NH_4Cl e 1,0 g/L de extrato de levedura.

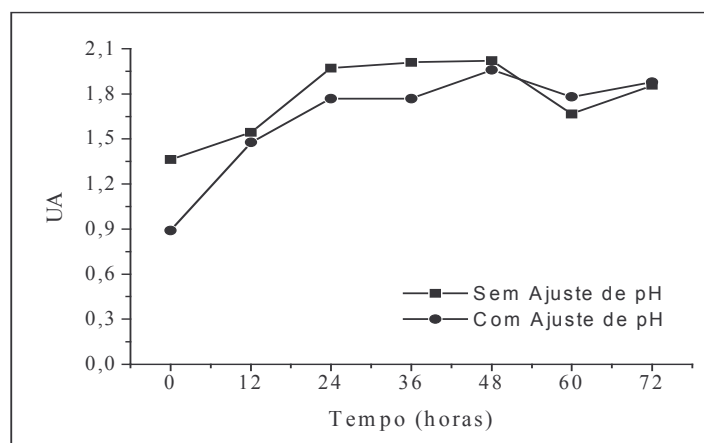


Figura 5.16- Atividades de emulsificação (UA) em fermentação sem extrato de levedura e 1,0 g/L de NH_4Cl .

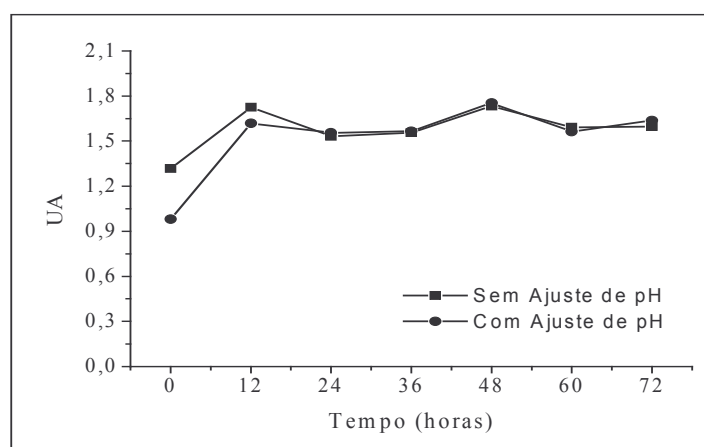


Figura 5.17- Atividades de emulsificação (UA) em fermentação cujo meio de cultura continha 1,0 g/L de NH_4Cl e 0,5 g/L de extrato de levedura.

5.2.2. Produção de biomassa

5.2.2.1. Influência da fonte de carbono, da temperatura de incubação e do pH inicial da fermentação na produção de biomassa.

O crescimento celular, medido através da obtenção da massa seca (g/L), apresentou comportamento semelhante em todas as fermentações, pois houve aumento na massa celular seca com o aumento do pH inicial da fermentação em uma mesma condição de temperatura independente do substrato empregado. Mas, a máxima produção celular (3,42 g/L) foi obtida na fermentação com pH inicial 9,0 feita com sacarose a 38°C. Esta produção celular correspondeu ao consumo de 23% da sacarose presente no meio de cultura. Na Tabela A-4 é possível observar o consumo de sacarose referente às fermentações, cujas massas celulares secas estão apresentadas nas Figuras 5.18, 5.19 e 5.20. Também, nas Tabelas A-1, A-2, A-3, A-5, A-6 e A-7, encontram-se os resultados obtidos em cada experimento.

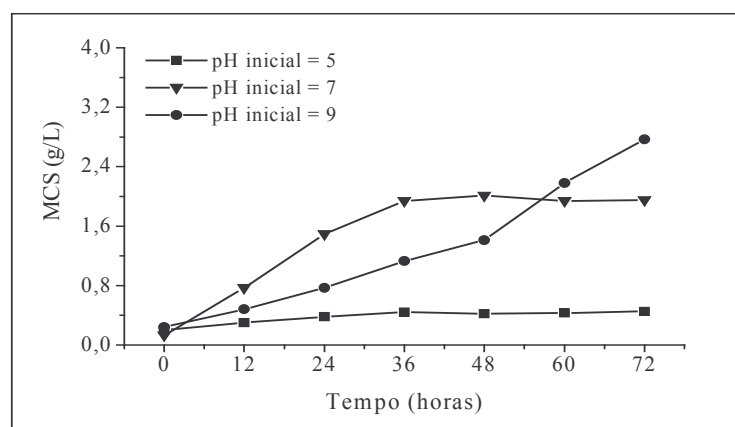


Figura 5.18 - Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos à temperatura de 20°C e sacarose como fonte de carbono.

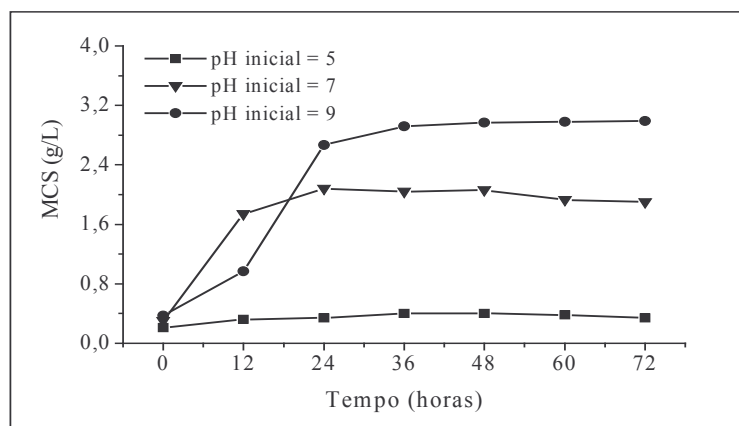


Figura 5.19 - Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos à temperatura de 30°C e sacarose como fonte de carbono.

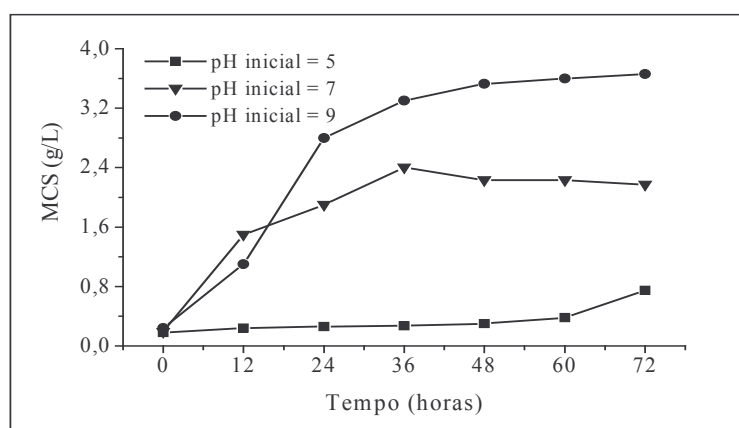


Figura 5.20 - Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos à temperatura de 38°C e sacarose como fonte de carbono.

As Figuras 5.21, 5.22 e 5.23 mostram ao crescimento celular obtido em meios de cultura contendo óleo de soja como substrato. O comportamento do crescimento celular, observado nas curvas, é semelhante ao obtido a partir das fermentações feitas com sacarose, inclusive a máxima produção celular encontra-se na mesma condição (temperatura de incubação 38°C e pH inicial da fermentação 9,0).

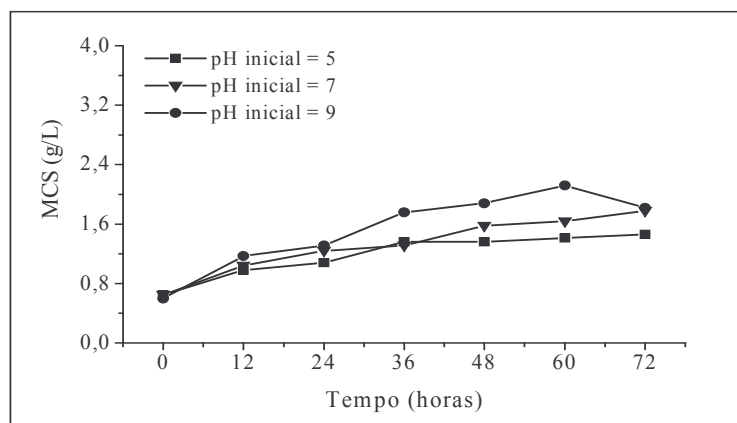


Figura 5.21- Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos à temperatura de 20°C e óleo de soja como fonte de carbono.

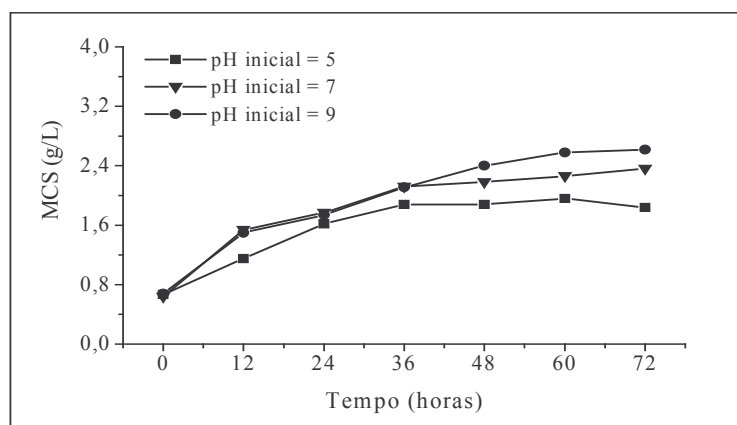


Figura 5.22- Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos a temperatura de 30°C e óleo de soja como fonte de carbono.

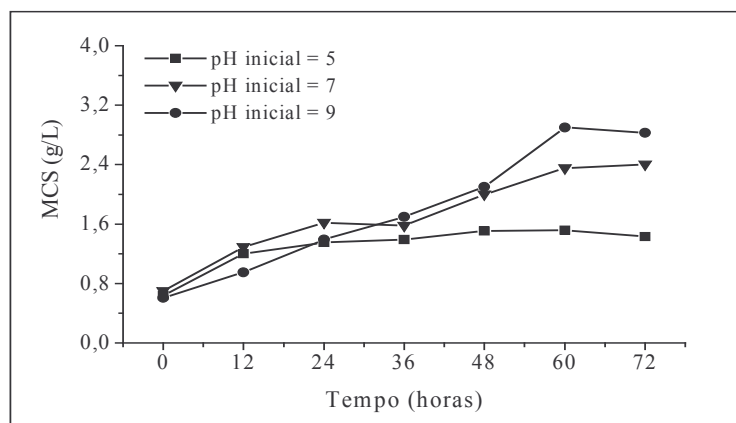


Figura 5.23- Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos a temperatura de 38°C e óleo de soja como fonte de carbono.

Foi possível verificar também que, independente da temperatura de incubação empregada, a produção celular máxima obtida nas fermentações com pH inicial 5,0 e sacarose, foi menor que a obtida nas mesmas condições para o óleo de soja, enquanto que, nas fermentações com pH inicial 7,0 e 9,0, os valores foram maiores. KOVÁCS et al. (1999) relataram que o melhor desenvolvimento da bactéria *Kocuria rhizophila* acontece entre pH 5,70 - 7,70, enquanto que neste trabalho a maior produção celular foi obtida nas fermentações, cujos meios de cultura tiveram seu pH inicial ajustados para 9,0.

Observou-se que o maior pico de produção de biossurfactante aconteceu na condição de temperatura e pH onde houve maior produção de massa celular. Em outros trabalhos, como na produção de soforolipídeos pela levedura *Candida bombicola*, a produção máxima do biossurfactante ocorreu a 27°C e o crescimento celular máximo foi obtido a 30°C (DESHPANDE e DANIELS, 1995).

5.2.2.2. Efeito da condição de *stress* de temperatura e pH na produção de biomassa e biossurfactante.

Fez-se uma fermentação sob condições de temperatura e pH que poderiam causar *stress* devido à dificuldade que a bactéria encontraria para se desenvolver, e assim poderia ser provocado um aumento na atividade de emulsificação. A Tabela 5.2 mostra que as

condições escolhidas (pH 5,0 e temperatura de 40°C) dificultaram o crescimento celular, mas não o inibiram, e que ao invés de aumentar a atividade de emulsificação os valores foram reduzidos em até 18,25%. Vale lembrar que estas condições foram selecionadas baseando-se no trabalho de KOVÁCS et al. (1999) que afirmaram que a bactéria *Kocuria rhizophila* não cresce quando exposta à temperatura superior a 40°C e que apresenta bom desenvolvimento em pH 5,70 - 7,70. Também, as atividades de emulsificação apresentadas na Tabela 5.2 foram obtidas em sobrenadantes sem ajuste de pH.

Tabela 5.2- Resultados da fermentação feita sob condição de stress de temperatura e pH.

Tempo (h)	T = 38°C			T = 40°C		
	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)
0	5,14	0,00	0,407	5,31	0,00	0,442
12	6,86	0,56	0,885	7,19	0,34	0,881
24	7,26	0,71	1,038	7,46	0,48	0,842
36	7,31	0,75	1,391	7,52	0,51	1,155
48	6,89	0,87	1,363	7,52	0,55	1,052
60	7,02	0,88	1,615	7,50	0,49	1,188
72	7,10	0,79	1,627	7,41	0,40	1,330

*MCS – Massa Celular Seca

5.2.2.3. Influência das concentrações das fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico na produção de biomassa.

A influência das concentrações das fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico foi avaliada através de fermentações feitas a temperatura de 38°C, com meio de cultura contendo óleo de soja como fonte de carbono.

Os rendimentos celulares expressos em massa seca (g/L) estão apresentados na Figura 5.24 e nas Tabelas A-11, A-12, A-13 e A-14, nas quais também encontram-se os

valores de pH e atividade de emulsificação correspondentes.

Verificou-se que a maior produção celular foi obtida no meio de cultura que continha somente fonte de nitrogênio orgânica (1,74 g/L); ao contrário do pico máximo de atividade de emulsificação, que foi encontrado em meio de cultura contendo somente fonte de nitrogênio inorgânico. Assim, o extrato de levedura teve influência no crescimento celular, enquanto que NH_4Cl influenciou a produção do biossurfactante. Mas este valor não foi superior ao obtido nesta mesma condição com 1,0 g/L de extrato de levedura e 1,0 g/L NH_4Cl (Figura 5.23 e Tabela A-7). LIMA (1997) relatou obtenção de máxima atividade de bioemulsificante com 10,0 g/L NH_4Cl e concentração de massa seca igual a 2,75 g/L com 5,0 g/L NH_4Cl .

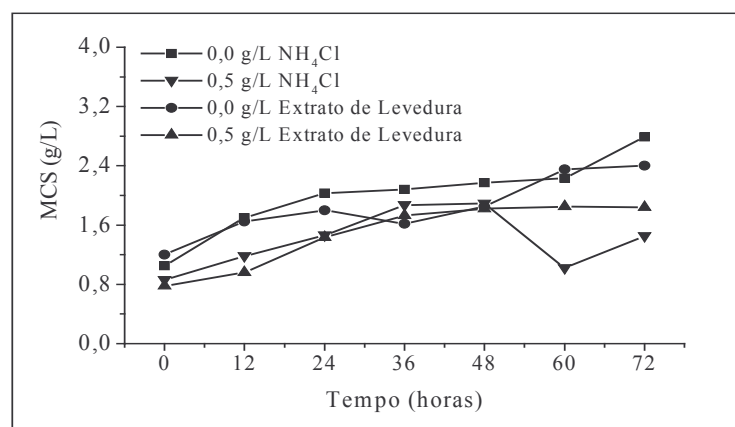


Figura 5.24- Massa celular seca (MCS g/L) em experimentos conduzidos a diferentes concentrações de fontes de nitrogênio orgânico e inorgânico.

5.3. Experimentos no Fermentador de Bancada

Os experimentos conduzidos no fermentador de bancada foram feitos utilizando as melhores condições obtidas nos experimentos realizados em frascos agitados. O substrato utilizado foi o óleo de soja, a temperatura foi mantida em 38°C, a agitação em 300 rpm, o pH inicial do meio de cultura foi ajustado para 9,0 e variou-se a aeração em 0,5 VVM, 1,5 VVM e 2,0 VVM.

Em todos os experimentos utilizou-se 4 litros de meio de cultura sendo 5% (v/v) de óleo de soja. O inóculo empregado foi de 24 horas de idade e seu volume

correspondeu a 10% do volume total de meio de cultura.

5.3.1. Influência da aeração na atividade de emulsificação

A Figura 5.25 apresenta os resultados de atividade de emulsificação obtidos nas amostras dos sobrenadantes, cujos valores de pH foram ajustados para 7,0. A maior atividade de emulsificação foi 1,753 UA alcançada em 24 horas de fermentação na condição de 1,5 VVM de aeração. Nas fermentações feitas com 0,5 VVM e 2,00 VVM os valores máximos de atividade de emulsificação encontrados foram 1,249 UA e 1,176 UA, respectivamente, ambos em 72 horas de fermentação.

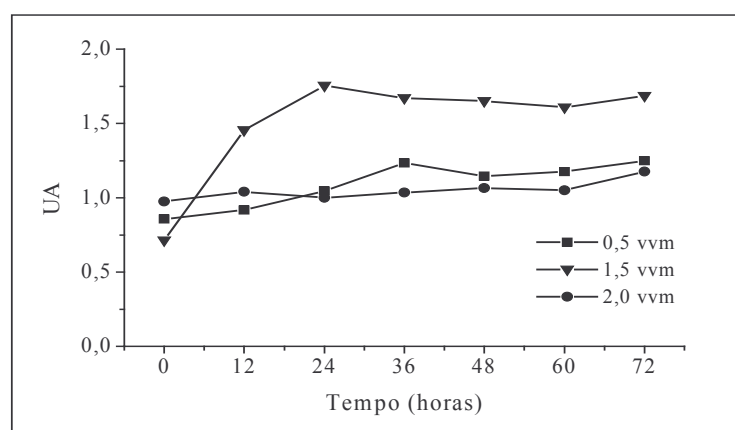


Figura 5.25- Atividade Emulsificante (UA) de sobrenadantes com pH ajustado para 7,0 em experimentos conduzidos em fermentador submetidos a diferentes taxas de aeração.

Avaliando os dados expostos na Tabela 5.3 verificou-se que a máxima produção celular correspondeu a condição em que houve o maior valor de atividade de emulsificação. Porém, a mesma fermentação feita sem aeração em Erlenmeyers a 150 rpm apresentou duas vezes mais massa e atividade de emulsificação semelhante (1,686 UA) também em 24 horas de fermentação. Estes resultados diferem do relatado por DESHPANDE e DANIELS (1995) que, estudando soforolipídeos produzidos pela levedura *Candida bombicola*, obtiveram 129,8 g/L de biossurfactante em frascos agitados a 200 rpm e 97 g/L em fermentador com 400 rpm e 0,5 VVM de aeração ambos experimentos realizados a 27°C, sendo que a maior produção de biomassa ocorreu a 30°C.

Tabela 5.3 – Fermentação de óleo de soja comercial (5% v/v) pela *Kocuria rhizophila* em fermentador de bancada (Bioflo III) com pH inicial 9,0, a 38°C, 300 rpm e três níveis de aeração (0,5, 1,5 e 2,0 VVM).

Tempo (horas)	0,5 VVM		1,5 VVM		2,0 VVM	
	pH	MCS (g/L)	pH	MCS (g/L)	pH	MCS (g/L)
0	8,84	0,00	8,93	0,00	9,08	0,00
12	8,45	0,07	7,72	0,30	8,48	0,33
24	8,06	0,41	7,57	0,60	8,62	0,56
36	7,79	0,22	7,15	0,42	8,60	0,62
48	7,86	0,33	7,08	0,71	8,65	0,65
60	7,66	0,53	7,14	0,86	8,63	0,59
72	7,66	0,57	7,20	0,48	8,58	0,55

*MCS – Massa Celular Seca

A realização da quantificação do consumo de óleo de soja, pela bactéria nas fermentações feitas no fermentador de bancada, foi possível somente na condição de 1,5 VVM, que foi de 27,3%, enquanto que nas outras condições formou-se espuma durante a agitação o que impossibilitou a retirada da amostra.

5.4. Tensão Superficial

A tensão superficial foi medida como descrito no item 4.6.5. A amostra utilizada na realização destas medidas foi única, para que pudesse ser estabelecido um parâmetro de comparação entre as medidas do tensiômetro, o método das gotas (Lei de Tate) e a atividade de emulsificação. O sobrenadante em questão é resultante da fermentação de 72 horas em fermentador de bancada com aeração de 1,5 VVM e óleo de soja como fonte de carbono.

5.4.1. Tensiômetro

A tensão superficial medida através do uso do tensiômetro foi feita em triplicata com as amostras à temperatura ambiente e com pH ajustado para 7,0. O meio de cultura não fermentado apresentou tensão superficial de 59,9 mN/m, enquanto que a tensão superficial da amostra foi de 38,8 mN/m. Assim, houve uma redução da tensão superficial de 35,22%.

A *Pseudomonas aeruginosa* produziu ramnolipídeos em fermentação com óleo de soja e em 288 horas, foi observada redução da tensão superficial para 28 mN/m (RAHMAN et al., 2000). Ramnolipídeos foram produzidos pela espécie *Pseudomonas putida* 21BN quando cresceram em substrato solúvel como a glicose e pouco solúvel como o hexano. A redução da tensão superficial após crescimento em meio com hexano foi de 71 para 37 mN/m (TULEVA et al., 2002).

5.4.2. Lei de Tate – Método das Gotas

As amostras utilizadas no item anterior foram novamente empregadas na realização da medida da tensão superficial através do método das gotas. Amostras contendo 5 gotas foram pesadas várias vezes até que fosse certificado que as gotas obtidas eram uniformes.

Este mesmo procedimento foi feito com água destilada, meio sem fermentar e amostra de sobrenadante, todos com pH ajustado para 7,0. A Tabela 5.4 apresenta o peso médio de cada gota obtido com a pesagem das amostras. É possível observar que a gota referente à amostra de sobrenadante apresenta peso inferior à da água destilada e a do meio de cultura não fermentado, mostrando a redução da tensão superficial pela presença do biossurfactante. A tensão superficial foi calculada através do emprego da Equação (4.4) do item 4.6.5.2. e da tensão superficial da água a temperatura ambiente 72 mN/m.

Tabela 5.4 - Peso médio da gota e tensão superficial calculada pelas equações da Lei de Tate.

Amostras	Peso médio (g)	Tensão superficial (mN/m)
Água destilada	0,033	72,0
Meio de cultura não fermentado	0,034	74,2
Sobrenadante	0,027	58,9

A redução da tensão superficial entre o meio de cultura sem fermentar e o sobrenadante, pelo método das gotas, foi igual a 20,6%. Na Tabela 5.5 estão apresentadas as tensões superficiais obtidas com a medida obtida no tensiômetro, com o emprego da Lei de Tate e a atividade de emulsificação das mesmas. Assim, é possível certificar-se da presença do biossurfactante no sobrenadante analisado, pois independente do método aplicado nota-se a redução da tensão superficial e o aumento na atividade de emulsificação.

Tabela 5.5 - Comparação dos valores obtidos de tensão superficial a atividade de emulsificação.

Amostras	Tensão superficial (mN/m)		Atividade de emulsificação (UA)
	Tensiômetro	Método das gotas	
Meio de cultura não fermentado	59,9	74,2	1,429
Sobrenadante	38,8	58,9	1,685

5.5. Efeito da Temperatura na Atividade de Emulsificação

A estabilidade do biossurfactante foi medida como descrito no item 4.6.4. Salienta-se que a amostra utilizada correspondia a um sobrenadante resultante da fermentação com óleo de soja e o pH estava ajustado para 7,0.

Na Tabela 5.6. é possível observar a estabilidade do biossurfactante quando o sobrenadante foi exposto a alta temperatura. O sobrenadante permaneceu a 80°C por um período de 150 minutos e as amostras retiradas mostraram que a queda da atividade de emulsificação foi em torno de 20,4%. PATIL e CHOPADE (2001) estudaram a

produção de bioemulsificante por espécies de *Acinetobacter* e verificaram que a 50°C mais de 50% da atividade do bioemulsificante foi inibida mostrando que ele é pouco termoestável.

Tabela 5.6 - Queda da atividade de emulsificação em relação ao tempo de exposição a 80°C

Tempo (min)	0	30	60	90	120	150
Atividade de Emulsificação (UA)	1,738	1,486	1,471	1,448	1,413	1,382

5.6. Efeito do pH na Atividade de Emulsificação

A estabilidade do biossurfactante em relação a variação do pH está apresentada no item 5.1.1.3 e na Figura 5.10. A atividade de emulsificação é crescente em relação ao aumento de pH, apesar da formação de precipitado observado no pH 9,0 e no pH 10,0

Tabela 5.7 – Influência do pH na atividade de emulsificação de uma única amostra de meio fermentado contendo biossurfactante e pH de 6,58.

pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Atividade de Emulsificação (UA)	0,264	0,272	0,334	0,548	0,728	0,804	0,885	1,276	1,917

5.7. Atividade de Emulsificação Utilizando Diferentes Compostos Hidrofóbicos

A atividade de emulsificação foi mensurada, mais uma vez, sendo substituído o óleo de soja por outros óleos vegetais (milho e canola), benzeno e querosene. Para isto utilizou-se a mesma amostra de sobrenadante utilizada no item 5.4, também com o pH ajustado para 7,0. A Figura 5.27 e a Tabela A-19 mostram que a amostra escolhida para análise possuía biossurfactante capaz de emulsionar e manter estável com maior intensidade os óleos vegetais.

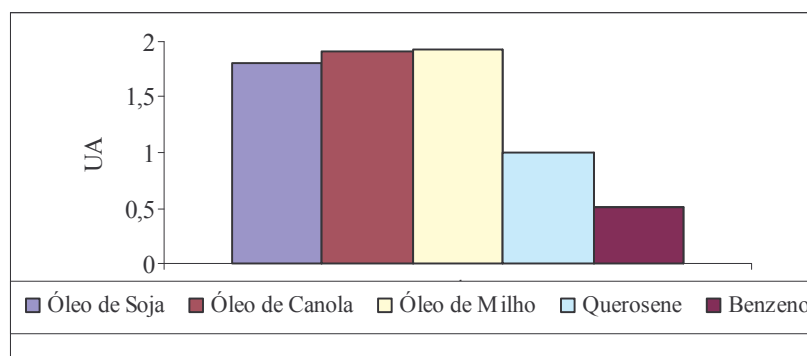


Figura 5.26- Atividade de emulsificação (UA) de uma única amostra adicionada em diferentes compostos hidrofóbicos.

5.8. Isolamento do Biossurfactante

A tentativa de isolar o biossurfactante foi iniciada com testes de precipitação através do emprego de dois métodos descritos no item 4.6.6. A amostra de sobrenadante contendo o biossurfactante foi obtida em 72 horas de fermentação conduzida em fermentador de bancada a 38°C iniciada com pH 9,0. A atividade de emulsificação da amostra foi de 1,685 UA após ajuste do pH para 7,0.

Houve formação de precipitado após adição de acetona e também com a elevação do pH para 10,0, mas a massa de precipitado obtida após a secagem em estufa foi maior na amostra adicionada de acetona (1,10 g/L). Salienta-se que o mesmo foi feito para o meio de cultura isento de inóculo e constatou-se a presença de precipitado. A massa de 1,10 g/L corresponde a massa de precipitado formada descontada da massa de precipitado obtida no meio de cultura não fermentado. *Pseudomonas aeruginosa* foi empregada em fermentações em batelada, sendo utilizadas fontes de carbono de baixo custo, na qual a produção máxima foi igual a 4,31, 2,98 e 1,77 g/L em óleo de soja, óleo de girassol e glicerol, respectivamente (RAHMAN et al., 2002).

5.9. Produção de Carotenóides

A bactéria *Kocuria rhizophila* utilizada neste trabalho como produtora de biossurfactante, apresentou colônias com pigmentação amarelada quando inoculada em ágar nutriente como mostra a Figura 5.28. Fato já descrito por KOVÁCS et al. (1999)

responsáveis pelo primeiro isolamento da bactéria, e também por SILVEIRA (2002) que isolou a cepa em estudo.



Figura 5.27 - Colônias da bactéria *Kocuria rhizophila* em ágar nutriente.

No final de cada fermentação, principalmente nas feitas sob condições que favoreciam o crescimento celular, foi possível observar a forte mudança na coloração do meio líquido utilizado, devido à presença da bactéria. Também verificou-se que nos experimentos feitos em Erlenmeyers a coloração da massa celular apresentava-se ainda mais intensa, aproximando-se da cor laranja, enquanto que em fermentações realizadas no fermentador de bancada a cor da massa mantinha-se amarela. Tal fato tornou-se ainda mais interessante quando se observou que ao lavar as células com solvente, para a remoção do óleo residual, a pigmentação não desaparecia por completo, mas perdia grande parte da sua intensidade.

Assim, através do emprego do método de determinação de carotenóides totais, descrito no item 4.7.1. desenvolvido por RODRIGUES-AMAYA (1999), e a utilização da fórmula desenvolvida por DAVIES (1976), determinou-se à presença de carotenóides e a sua concentração, cuja resposta foi dada em carotenóides totais.

A varredura feita no espectrofotômetro permitiu que fosse observada a formação da curva contendo três picos característicos de carotenóides. Os valores das absorbâncias correspondentes a cada pico foram: 422, 448 e 474 nm. O pico 448 nm correspondeu a máxima absorbância e por isso, fez-se a leitura da amostra neste comprimento de onda a qual foi de 0,0097 UA. Este valor de unidade de absorbância correspondeu a 0,374 µg/g de carotenóides totais (cálculo baseado no coeficiente de extinção do β- caroteno). Mas não foi possível extrair todo carotenóide presente na massa celular pelo método determinado para análise.

6. CONCLUSÕES

A bactéria *Kocuria rhizophila* foi capaz de se desenvolver e sintetizar biossurfactante, nas condições operacionais selecionadas para realização dos experimentos, utilizando substratos solúvel e insolúvel em água como fontes de carbono e energia.

Os maiores valores de produção de biomassa foram alcançados a 38°C em fermentações com pH inicial do meio de cultura 9,00 tanto com sacarose como nas que utilizaram óleo de soja como fonte de carbono.

Os experimentos mostraram que a atividade de emulsificação apresentava-se na forma de picos, os quais foram observados em diferentes tempos de fermentação, condições operacionais e substrato que estivessem sendo utilizados. Porém, os maiores picos de produção foram detectados sempre após as primeiras 12 horas de fermentação.

O método de determinação da produção de biossurfactante, escolhido para este trabalho, demonstrou que a atividade de emulsificação tem relação direta com o pH da amostra e que também pode ser influenciada pelos constituintes do meio de cultura. Os resultados, obtidos com a aplicação deste método, não reproduziram de forma satisfatória a presença do biossurfactante no sobrenadante.

Constatou-se que a produção de biossurfactante não está associada ao crescimento celular e que a atividade de emulsificação e a produção de massa seca foram influenciadas pela temperatura de incubação, pelo pH inicial do meio de fermentação e pela concentração da fonte de nitrogênio orgânico e inorgânico.

A maior atividade de emulsificação foi obtida em 48 horas de fermentação com óleo de soja comercial (5% v/v) feita com pH inicial 9,0, a 38°C e 150 rpm em Erlenmeyers, sem extrato de levedura e 1,0 g/L de NH₄Cl. O sobrenadante obtido do caldo fermentado, após ajuste de pH para 7,0, apresentou atividade de 1,959 UA.

Amostra de fermentação de 72 horas em óleo de soja apresentou redução da tensão superficial do meio de cultura de 59,9 mN/m para 38,8 mN/m, atividade de emulsificação de 1,685 UA e massa de biossurfactante igual a 1,10 g/L. A exposição do sobrenadante a temperatura de 80°C resulta na redução da atividade de emulsificação.

A bactéria *Kocuria rhizophila*, capaz de sintetizar biossurfactante, também é fonte de carotenóides devido a pigmentação extraída da massa celular.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASCÓN-CABRERA, M. A.; LEBEAULT, J. M. Interfacial area effects of biphasic aqueous-organic system on growth kinetic of xenobiotic-degrading microorganisms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 43, p. 1136-1141, 1995.

BANAT, I. M. Biosurfactant production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, p. 1-12, 1995.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA S. S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BANAT, I. M.; SAMARAH N.; MURAD M.; HORNE R.; BENERJEE S. Biosurfactant production and use in oil tank clean-up. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 7, p. 80-88, 1991.

BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of Petroleum Hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Environment International**, v. 26, p. 413-416, 2001.

BARRIGA, J. A T.; COOPER, D. G.; IDZIAK, S. E.; CAMERON, D. R. Components of the bioemulsifier from *S. cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 96-102, 1999.

BAUERNFEIND, J. C. **Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors**. Gainesville, Florida, 1981.

BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, Z. A. M. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, v. 30, p. 231-236, 1999.

BOBBIO, A. P.; BOBBIO, F. **Química do Processamento de Alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 1992. 151 p.

BOHME, K.; WILHELM C.; GOSS R. Light regulation of biosynthesis in the

psinophycean alga *Mantoniella squamata*. **Photochemical Photobiological Science**, v. 1(8), p. 619-628, 2002.

BONIN, P.; BERTRAND, J. Involvement of bioemulsifier in heptadecane uptake in *Pseudomonas nautica*. **Chemosphere**, v. 38, n. 5, p. 1157-1164, 1999.

BOROWITZKA, L. J.; BOROWITZKA, M. A. β - Carotene production with algae. In: Vandamme, J. E. (ed.). **Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors**, Elsevier Applied Science: New York, p. 15-26, 1989.

BRITTON, G. *Carotenoids*. Disponível em: <<http://dcb-carot.unibe.ch/>>. Acesso em: 29 de setembro de 2003.

BUZZINI, P.; MARTINI, A. Production of carotenoids by strains of *Rhodotorula glutinis* cultured in raw materials of agro-industrial origin. **Bioresources Technology**, v. 71, p. 41-44, 1999.

CERDÁ-OLMEDO, E. Production of carotenoids with fungi. In Vandamme, J. E. (ed.). **Biotechnology of Vitamins, Pigments and Growth Factors**, Elsevier Applied Science: New York, p. 27-42, 1989.

CHAPION, J. T.; GILKEY, J. C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER R. M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium, and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 170, p. 569-574, 1995.

CIEGLER, A. Microbial carotenogenesis. **Advances Applied Microbiology**, v. 7, p. 1-34, 1965.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 224-229, 1987.

COOPER, D. G.; ZAJIC, J. E.; GERSON, D. F.; MANNINEN, K. I. Isolation and identification of biosurfactants produced during anaerobic growth of *Clostridium pasteurianum*. **J. Ferment. Technol.**, v. 58, p. 83-86, 1980.

DAVIES, B. H. Carotenoid. In: Goodwin, T. W. (ed), **Chemistry and Biochemistry of Plants Pigments**, p. 38-165. Academic Press, New York, 1976.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their

commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p. 47-64, 1997.

DESHPANDE, M.; DANIELS, L. Evaluation of sophorolipid biosurfactant production by *Candida bombicola* using animal fat. **Bioresource Technology**, v. 54, p. 143-150, 1995.

FÁBREGAS, J., OTERO, A., MASEDA, A. DOMÍNGUEZ, A. Two-stage cultures for production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. **Journal of Biotechnology**, v. 89, p. 65-71, 2001.

FERRAREZZO, E. M. **Isolamento e seleção de microrganismos produtores de bioemulsificantes a partir de efluentes de indústria de margarina e sabão**. Campinas, 1998. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, p. 283-293, 1992.

FOGHT, J.M.; GUTNICK, D. L.; WESTLAKE, D. S. W. Effect of emulsan on biodegradation of crude oil by pure and mixed bacterial cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 36-42, 1989.

FOX, S. L.; BALA, G. A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresource Technology**, v. 75, p. 235-240, 2000.

FRENGOVA G, SIMOVA E, BESHKOVA D. Caroteno-protein and exopolysaccharide production by co-cultures of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 18(4), p. 272-7, 1997.

GAOKAR, A. N. Surface and interfacial activities and emulsion characteristics of some food hydrocolloids. **Fd. Hydrocolloids**, v. 3(4), p. 329-338, 1991.

GONÇALVES D. Tensão Superficial e capilaridade. Física do científico e do vestibular. Rio de Janeiro, 1964.V. 2, cap.17, p. 363- 364.

GROSS, J. Pigments in Vegetables: Chlorophylls and Carotenoids. Van Nostrand Reinold. 1991. p.112.

GUERRA-SANTOS, L.; KAPPELI, O.; FIECHTER, A. *Pseudomonas aeruginosa*

- biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 48, n.2, p. 301-305, 1984.
- INOH, Y.; KITAMOTO, D.; HIRASHIMA, N.; NAKANISHI, M. Biosurfactants of MEL—A increase gene transfection mediated by cationic lipossomas. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 289, p. 57-61, 2001.
- ISHIGE, T.; TANI, A.; YASUYOSHI, S.; KATO, N. Wax ester production by bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 244-250, 2003.
- JONHSON, V.; SINGH, M.; SAINI, S.V. Bioemulsifier production by an oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* IIP-30. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 6, p. 487-490, 1992.
- KOBAYASHI M., KAKIZONO T., NAGAI, S. Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-Induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. **Applied Enviromental Microbiology**, v. 59, p. 867-873, 1993.
- KOVÁCS, G.; BURGHARDT, J.; PRADELLA, S.; SCHUMANN, P.; STACKEBRANDT, E.; MARIALIGET, K. *Kocuria palustris* sp. nov. and *Kocuria rhizophila* sp. nov., isolated from the rhizoplane of the narrow-leaved cattail (*Tipha angustifolia*). **Internacional Journal of Systematic Bacteriology**, v. 49, p. 167-173, 1999.
- KULL, D.; PFANDER, H. List of new carotenóides. In Britton, G.; Liaaen-Jensen, S. Pfander, H. (eds). **Carotenoids isolation and Analysis**, v. 1, Birkhauser Verlag, Basel p.13-63, 1995.
- LANG, S., WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants. In: Biosurfactants and Biotechnology. Surfactants Series . New York: Marcel Dekker Inc, 1987. v. 25, p. 21- 40.
- LEATHERS, T. Bioonversion of maize residues to value-added coproducts using yeast-like fungi. **FEMS Yeast Research**, v. 3, p. 133-140, 2003.
- LIMA, A. S. **Produção, estabilidade e isolamento de bioemulsificante obtido a partir da fermentação de óleo-diesel comercial por *Saccharomyces lipolytica***. Campinas, 1997. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- MAIER, R. M.; SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids:

biosynthesis and potential applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p. 625-633, 2000.

MARÍN, M.; PEDREGOSA, A.; RÍOS, S.; ORTIZ, M. L.; LABORDA, F. Biodegradation of diesel and heating oil by *Acinetobacter calcoaceticus* MM5: its possible applications on bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 269-285, 1995.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MORIKAWA, M.; YOSHIHIKO, H.; IMANAKA, T. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 211-218, 2000.

NIIZU, P.Y. **Fontes de Carotenóides Importantes na Saúde Humana. Campinas.** Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2003.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G.M. Biossurfactantes: propriedades e aplicações. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OSIPOV, A. I.; PONOMAREVA, L. V.; IVANOVA, T. A. The biological purification of petroleum-contaminated soils. **Russian Agricultural Sciences**, v. 12, p. 30-34, 1998.

PADOVANI, R. M. **Disponibilidade de carotenóides em relação a energia e proteínas nos domicílios de famílias das regiões metropolitanas brasileiras.** Campinas, 2003. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, 2003.

PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; DLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. Growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, v. 92, p. 287-294, 2002.

PATIL, J.R.; CHOPADE, B. A. Studies on bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains from healthy human skin. **Journal Applied Microbiology**, v. 91, p. 290-298, 2001.

RAHMAN, K. S. M.; RHAMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, M. I. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using

- low-cost raw materials. **Biotechnol. Prog.**, v. 18, n. 6, p. 1277-1281, 2002.
- ROBB, D. I. Bisurfactants- an overview. In: **Industrial Applications of Surfactants II** Royal Society of Chemistry, ed. D. R. Karsa. 22- 34, 1987.
- RODRIGUES-AMAYA, B.D. **A Guide to Carotenoids Analysis in Foods**. Washington, D. C.: International Life Science Institute Prece, p. 64, 1999.
- ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 52, p. 154-162, 1999.
- SAMPAIO, R. M. **Estudo de produção de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por fermentação de óleo-diesel comercial**. Campinas, 1995. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos.
- SANDMANN, G., ALBRECHT, M., SCHNURR, G. KNORZER, O., BOGER, P. The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnol.**, v. 17, p. 233-237, 1999.
- SARUBBO, L. A.; PORTO, A. L. F.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. The use of babassu oil as substrate to produce bioemulsifiers by *Candida lypolitica*. **Can. J. Microbiol.**, v. 45, p. 423-426, 1999.
- SCHMIDT-DANNERT, C. Engineering novel carotenoids in microorganisms. **Enviromental Biotechnology**, v. 11, p. 255-261, 2000.
- SHAW, D. J., Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies. 2ª edição, São Paulo, ed. Edgar Bluncher, 184 p., 1975.
- SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SUTHERLAND, W. I.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **Journal of Biotechnology**, v. 40, p. 207-217, 1995.
- SHEPPARD, J. A. T.; COOPER, D. G. The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth. **Appl. Microbiol. Biotechnol**, v. 35, p. 72-76, 1991.
- SHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Carotenoids protect *Phaffia rhodozyma* against oxygen damage. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 14, p. 502-507, 1995.

- SIMOVA ED, FRENGOVA GI, BESHKOVA DM. Effect of aeration on the production of carotenoid pigments by *Rhodotorula rubra-lactobacillus casei* subsp. *casei* co-cultures in whey ultrafiltrate. **Z. Naturforsch**, v. 58(3-4), p. 225-229, 2003.
- SQUINA, F.M., YAMASHITA F., PEREIRA, J.L., MERCADANTE, A. Z. Production of carotenoids by *Rhodotorula rubra* and *R. Glutinis* in culture medium supplemented with sugar cane juice. **Food Biotechnology**, v. 16, p. 227-235, 2002.
- STACKEBRANDT, E.; KOCH, C.; GVOZDIK, O.; SHUMANN, P. Taxonomic dissection of genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. Nov., *Nesterekonina* gen. Nov., *Kytococcus* gen., *Dermacoccus* gen. Nov., and *Micrococcoccus*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, p. 682-692, 1995.
- STRAND, A., SHIVAJI, S., LIAAEN-JENSEN, S. Bacterial Carotenoids 55. C₅₀ – Carotenoids 25. Revised Structures of Carotenoids Associated with Membranes in Psychrotrophic. *Micrococcus roseus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, p. 547-552, 1997.
- SUNG-CHYR L.; KUO-GING L.; CHIN-CHEN L.; YU-MING L. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. **Enzyme and Microbial technology**, New York, v. 23, p.267-273, 1998.
- SYLDATK, C.; WAGNER, F. Production of biosurfactants. In: Biosurfactants and Biotechnology. Surfactants series vol. 25. New York, ed. Marcel Dekker Inc. 1987, 89-116p.
- TULEVA, B. K.; IVANOV, G. R.; CHRISTOVA, N. E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Z. Naturforsch**. v. 57c, p. 356-360, 2002.
- VAN DYKE, M., LEE, H., TREVORS, J. T., Applications of microbial surfactants. **Biotechn. Adv**, v. 9, p. 241-252, 1991.
- VASILEVA-TONKOVA, E.; GALABOVA, D.; KARPENKO, E.; SHULGA, A. Biosurfactant-rhamnolipid effects on yeast cells. **Letters in Applied Microbiology**. v. 33, p. 280-284, 2001.
- VIDAL, L.; CHRISTEN, P.; COELLO, M. N. Feather degradation by *Kocuria rosea* in

submerged culture. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 16, p. 551-554, 2000.

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

WHISTLER, R. L. Exudate gums. Industrial Gums, 3rd edn., Academic Press Inc., San Diego, CA, p. 309-339, 1993.

WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, p. 415-423, 1997.

ZAJIC, E. J.; PANCHAL, J. C. Bio-emulsifiers. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 5, p. 39-66, 1976.

APÊNDICE A

Tabela A-1 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de sacarose (50g/L) feita em Erlenmeyers a 20°C e 150 rpm.

Tempo (h)	pH = 5,0			pH = 7,0			pH = 9,0		
	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)
0	5,01	0,20	0,459	7,11	0,13	0,647	9,16	0,24	1,171
12	4,79	0,30	0,310	7,04	0,77	0,568	8,56	0,48	0,886
24	4,48	0,38	0,343	6,40	1,49	1,009	7,8	0,77	0,915
36	4,16	0,44	0,387	4,13	1,94	0,542	7,54	1,13	0,967
48	4,18	0,42	0,243	3,88	2,01	0,569	7,42	1,41	0,973
60	4,16	0,43	0,321	3,92	1,94	0,487	6,87	2,18	1,083
72	4,03	0,45	0,283	3,96	1,95	0,508	4,53	2,77	0,856

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

Tabela A-2 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de sacarose (50g/L) feita em Erlenmeyers a 30°C e 150 rpm.

Tempo (h)	pH = 5,0			pH = 7,0			pH = 9,0		
	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)
0	5,31	0,21	0,375	7,06	0,30	0,663	8,60	0,37	0,488
12	4,38	0,32	0,376	4,44	1,74	0,279	7,44	0,97	0,485
24	4,18	0,34	0,264	3,73	2,08	0,342	4,72	2,67	0,292
36	4,18	0,40	0,257	3,77	2,04	0,432	3,60	2,92	0,374
48	4,12	0,40	0,166	3,77	2,06	0,252	3,63	2,97	0,438
60	4,17	0,38	0,153	3,78	1,93	0,276	3,52	2,98	0,411
72	4,10	0,34	0,183	3,89	1,90	0,363	3,66	2,99	0,422

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

APÊNDICE A

Tabela A-3 - Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de sacarose (50g/L) feita em Erlenmeyers a 38°C e 150 rpm.

Tempo (h)	pH = 5,0			pH = 7,0			pH = 9,0		
	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)
0	5,15	0,18	0,423	7,08	0,19	0,647	9,26	0,24	0,984
12	4,35	0,24	0,345	7,01	1,50	0,716	7,76	1,10	0,303
24	4,23	0,26	0,253	3,91	1,90	1,561	6,74	2,80	0,621
36	4,25	0,27	0,277	3,92	2,40	0,465	4,62	3,30	0,462
48	4,14	0,30	0,185	4,04	2,23	0,497	4,62	3,53	0,612
60	4,20	0,38	0,211	4,03	2,23	0,367	4,64	3,60	0,628
72	4,10	0,75	0,262	4,08	2,17	0,322	4,88	3,66	0,548

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

Tabela A-4 – Consumo de substrato (g/L) das fermentações de sacarose feitas em Erlenmeyers.

tempo(h)	pH = 5,0			pH = 7,0			pH = 9,0		
	20°C	30°C	38°C	20°C	30°C	38°C	20°C	30°C	38°C
0	40,77	47,35	41,57	40,03	42,95	42,60	47,98	44,09	43,86
12	39,69	47,46	38,77	38,95	40,55	41,75	47,12	43,52	40,43
24	37,97	46,95	37,63	38,95	40,20	39,40	44,15	43,29	39,23
36	37,69	37,80	39,75	38,49	39,92	39,23	44,20	41,75	37,23
48	38,83	45,63	37,97	36,89	39,80	38,60	43,18	38,37	37,34
60	36,49	44,78	36,32	36,32	38,60	35,97	42,49	37,17	36,54
72	35,69	40,95	34,72	35,63	36,32	34,32	41,12	34,77	33,74

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

APÊNDICE A

Tabela A-5 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers a 20°C e 150 rpm.

Tempo (h)	pH = 5,0			pH = 7,0			pH = 9,0		
	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)
0	4,94	0,65	0,323	6,97	0,65	0,658	9,07	0,6	1,099
12	5,44	0,98	0,433	7,34	1,04	0,784	8,17	1,17	0,743
24	5,85	1,08	0,431	5,56	1,24	0,674	8,08	1,31	0,797
36	5,09	1,36	0,432	6,81	1,31	1,091	7,1	1,76	1,185
48	5,45	1,36	0,300	4,27	1,58	0,453	5,63	1,88	1,009
60	4,18	1,41	0,208	5,09	1,64	0,626	4,07	2,12	0,899
72	4,82	1,46	0,588	3,89	1,78	0,295	4,43	1,82	0,412

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

Tabela A-6 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers a 30°C e 150 rpm.

Tempo (h)	pH = 5,0			pH = 7,0			pH = 9,0		
	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)
0	4,94	0,67	0,331	6,88	0,64	0,706	8,43	0,68	1,043
12	7,05	1,15	0,749	7,18	1,54	0,698	7,18	1,50	0,862
24	5,93	1,62	0,610	7,20	1,77	0,902	7,45	1,74	1,518
36	5,96	1,88	0,830	5,58	2,12	0,636	5,80	2,11	1,007
48	5,84	1,88	0,681	5,88	2,18	0,772	5,27	2,40	0,874
60	5,53	1,96	0,353	5,21	2,26	0,902	6,83	2,58	0,793
72	5,05	1,84	0,313	6,53	2,36	1,028	6,70	2,62	0,740

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

APÊNDICE A

Tabela A-7 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers a 38°C e 150 rpm.

Tempo (h)	pH = 5,0			pH = 7,0			pH = 9,0		
	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)
0	5,14	0,64	0,407	7,12	0,70	0,743	9,06	0,61	1,272
12	6,86	1,20	0,885	7,27	1,29	0,621	8,03	0,95	0,999
24	7,26	1,35	1,038	6,90	1,62	0,881	8,50	1,39	1,038
36	7,31	1,39	1,391	8,03	1,58	1,180	8,08	1,70	1,360
48	6,89	1,51	1,363	6,49	2,00	1,032	8,69	2,10	1,392
60	7,02	1,52	1,615	7,26	2,35	1,190	8,67	2,90	1,329
72	7,10	1,43	1,627	7,00	2,40	1,322	7,71	2,83	1,405

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

Tabela A-8 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE), em pH ajustado para 7,0, da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 5,0 a 38°C e 150 rpm.

Tempo (h)	pH = 5,0			
	pH	MCS (g/L)	AE (UA) Sem Ajuste de pH	AE (UA) Com Ajuste de pH
0	5,27	0,82	0,422	0,746
24	6,52	1,28	0,833	0,931
48	6,60	1,24	0,512	0,863
72	6,67	1,29	0,581	0,962

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

APÊNDICE A

Tabela A-9 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE), em pH ajustado para 7,0, da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 7,0 a 38°C e 150 rpm.

Tempo (h)	pH = 7,0			
	pH	MCS (g/L)	AE (UA) Sem Ajuste de pH	AE (UA) Com Ajuste de pH
0	6,83	0,83	0,486	0,761
24	6,76	1,88	0,484	0,860
48	6,49	2,33	0,344	0,570
72	6,48	2,41	0,529	0,852

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

Tabela A-10 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE), em pH ajustado para 7,0, da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 9,0 a 38°C e 150 rpm.

Tempo (h)	pH = 9,0			
	pH	MCS (g/L)	AE (UA) Sem Ajuste de pH	AE (UA) Com Ajuste de pH
0	8,95	0,82	1,486	0,844
24	7,44	2,05	1,806	1,686
48	7,10	2,24	1,315	1,263
72	6,70	3,33	0,626	0,777

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

APÊNDICE A

Tabela A-11 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 9,0, a 38°C, 150 rpm sem NH₄Cl e com 1,0 g/L de extrato de levedura.

Tempo (h)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	
			Sem Ajuste de pH	Com Ajuste de pH
0	8,81	1,05	1,633	1,059
12	7,53	1,7	1,816	1,674
24	7,36	2,03	1,861	1,716
36	7,51	2,08	1,955	1,831
48	7,38	2,17	1,690	1,727
60	7,53	2,23	1,882	1,848
72	7,28	2,79	1,860	1,817

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

Tabela A-12 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 9,0, a 38°C e 150 rpm com 0,5 g/L NH₄Cl e 1,0 g/L de extrato de levedura.

Tempo (h)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	
			Sem Ajuste de pH	Com Ajuste de pH
0	8,83	0,86	1,320	0,747
12	7,65	1,18	1,495	1,211
24	7,29	1,46	1,789	1,724
36	7,38	1,87	1,794	1,698
48	7,17	1,89	1,773	1,676
60	8,73	1,02	1,775	1,318
72	8,24	1,45	1,826	1,514

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

APÊNDICE A

Tabela A-13 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 9,0, a 38°C, a 150 rpm, sem de extrato de levedura e com 1,0 g/L de NH₄Cl.

Tempo (h)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	
			Sem Ajuste de pH	Com Ajuste de pH
0	8,88	1,20	1,362	0,889
12	8,20	1,65	1,545	1,478
24	7,28	1,80	1,970	1,768
36	8,02	1,62	2,009	1,769
48	7,25	1,85	2,022	1,959
60	7,00	2,35	1,666	1,781
72	7,13	2,40	1,857	1,879

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

Tabela A-14– Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita em Erlenmeyers com pH inicial 9,0, a 38°C, a 150 rpm, com 0,5 g/L de extrato de levedura e 1,0 g/L NH₄Cl.

Tempo (h)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	
			Sem Ajuste de pH	Com Ajuste de pH
0	8,90	0,78	1,317	0,980
12	7,46	0,96	1,726	1,617
24	7,39	1,43	1,532	1,557
36	7,12	1,73	1,556	1,566
48	7,20	1,82	1,732	1,755
60	7,05	1,85	1,592	1,564
72	7,22	1,84	1,596	1,636

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

APÊNDICE A

Tabela A-15 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita fermentador de bancada (Bioflo III) com pH inicial 9,0, a 38°C, 300 rpm e 0,5 VVM.

Tempo (h)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	
			Sem Ajuste de pH	Com Ajuste de pH
0	8,84	2,56	1,559	0,858
12	8,45	2,63	1,468	0,917
24	8,06	2,97	1,538	1,046
36	7,79	2,78	1,476	1,233
48	7,86	2,89	1,431	1,145
60	7,66	3,09	1,487	1,175
72	7,66	3,13	1,274	1,249

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

Tabela A-16 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita fermentador de bancada (Bioflo III) com pH inicial 9,0, a 38°C, 300 rpm e 1,5 VVM.

Tempo (h)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	
			Sem Ajuste de pH	Com Ajuste de pH
0	8,93	0,54	1,456	0,714
12	7,72	0,84	1,537	1,454
24	7,57	1,14	1,933	1,753
36	7,15	0,96	1,686	1,672
48	7,08	1,25	1,682	1,652
60	7,14	1,40	1,638	1,609
72	7,20	0,99	1,744	1,685

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

APÊNDICE A

Tabela A-17 – Valores de pH, massa celular seca (MCS) e atividade de emulsificação (AE) da fermentação de óleo de soja (5% v/v) feita fermentador de bancada (Bioflo III) com pH inicial 9,0, a 38°C, 300 rpm e 2,0 VVM.

Tempo (h)	pH	MCS (g/L)	AE (UA)	
			Sem Ajuste de pH	Com Ajuste de pH
0	9,08	0,51	1,572	0,975
12	8,48	0,84	1,484	1,041
24	8,62	1,07	1,519	1,000
36	8,60	1,13	1,595	1,034
48	8,65	1,16	1,556	1,065
60	8,63	1,10	1,576	1,050
72	8,58	1,08	1,565	1,176

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

Tabela A-18 – Variação da atividade de emulsificação de diferentes óleos em caldo fermentado pela bactéria *Kocuria rhizophila* com pH ajustado para 7,0.

Óleo	AE (UA)
Soja	1,795
Milho	1,922
Canola	1,911
Benzeno	0,514
Querosene	1,003

OBS: Valores médios de análises em triplicata.

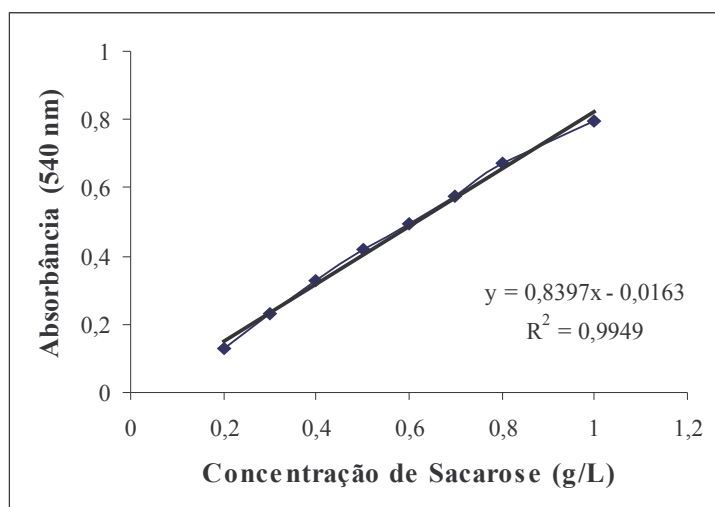


Figura B-1 – Curva padrão utilizada para quantificação do consumo de sacarose pelo método DNS.