

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**Produção de lipopeptídeos e glicolipídeos a partir da bioconversão do
co-produto da produção do biodiesel**

Juliana Rabelo de Sousa

São Carlos – SP

2012

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química

**Produção de lipopeptídeos e glicolipídeos a partir da bioconversão do
co-produto da produção do biodiesel**

Juliana Rabelo de Sousa

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de São Carlos como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador:
Prof. Dr. Antonio José Gonçalves Cruz

São Carlos – SP

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S725pL

Sousa, Juliana Rabelo de.

Produção de lipopeptídeos e glicolipídeos a partir da bioconversão do co-produto da produção do biodiesel / Juliana Rabelo de Sousa. -- São Carlos : UFSCar, 2012. 105 f.


Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Microbiologia industrial. 2. Biossurfactante. 3. Glicerina. 4. *Pseudomonas aeruginosa*. 5. *Bacillus subtilis*. 6. Modelagem matemática. I. Título.

CDD: 660.62 (20^a)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO DE **JULIANA RABELO DE SOUSA**, APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS EM 28 DE SETEMBRO DE 2012.

BANCA EXAMINADORA:




Antonio José Gonçalves da Cruz
Orientador / UFSCar



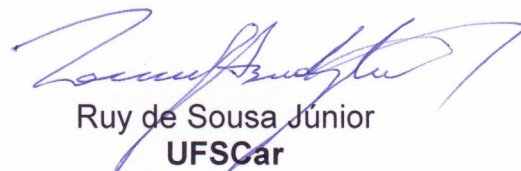
Edson Romano Nucci
UFSJ



Maria Lucia Gonsales da Costa Araújo
UNESP



Juliana Conceição Teodoro
CTC



Ruy de Sousa Junior
UFSCar

À minha família, pais e irmão, por seu amor
e dedicação durante toda a minha vida.
Ao meu companheiro Alexandre e
à nossa pequena Letícia pelo início
da nossa família e por proporcionarem
os melhores momentos da minha vida.

Agradecimentos

À Deus, por minha existência e por todas as experiências proporcionadas ao longo da minha vida.

Ao Professor Antonio José Gonçalves da Cruz por sua orientação, apoio e compreensão durante mais esta jornada da minha vida acadêmica. Obrigada pelos conhecimentos adquiridos e por todos os incentivos para a realização deste trabalho.

À Professora Luciana Rocha Barros Gonçalves pela sua participação como co-orientadora deste trabalho, pelas oportunidades concedidas e pelo apoio dado através da estrutura laboratorial disponibilizada.

À Professora Vânia M. M. Melo, coordenadora do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia do Departamento de Biologia - UFC, pela realização das análises de PCR, bem como, pela sua disponibilidade, apoio científico e novos conhecimentos adquiridos.

Ao Professor Roberto de Campos Giordano por sua contribuição científica como membro da banca de qualificação e por seu apoio como coordenador do PPGEQ.

Ao Professor Alberto Colli Badino Junior através da concessão da bolsa de doutorado.

À todos os membros das bancas de qualificação e de defesa, Professor Ruy de Sousa Júnior, Dra. Juliana Conceição Teodoro, Professor Edson Romano Nucci, Professora Maria Lucia Gonsales da Costa Araujo, Professora Rosineide Gomes da Silva Cruz, Professor Roberto de Campos Giordano e à Professora Luciana Rocha Barros Gonçalves através das contribuições científicas, questionamentos e correções que auxiliaram no aprimoramento deste trabalho.

Às graduandas em Engenharia Química, Lígia Miura e Jéssica Gonçalves por sua dedicação, carinho e amizade durante a realização de seus projetos de iniciação científica.

Aos amigos Sandrinha, Edson (Amigo), Adilson, Tiago, Inti, Carlos, KK, Aninha, André, Lionete e a todos pela amizade, momentos de alegria e trabalho, além de suas maravilhosas companhias durante minha moradia em São Carlos.

Às amigas Dasci, Geísa, Karol e Letícia por terem me recebido em sua casa, por seu apoio quando cheguei a São Carlos, pela amizade e carinho.

Às amigas Ana Iraydi, Camila, Kamilly, Ticiane, Jéssyca, Kênia, Izabelly, Vana e Mary que estiveram ao meu lado durante o desenvolvimento do trabalho em Fortaleza, muito obrigada pelo apoio, compreensão, amizade e alegria.

Aos amigos Dalton Eloy e Ana Cláudia França por seu apoio, confiança e incentivos durante momentos muito importantes desta caminhada.

À todos os integrantes do Grupo de Pesquisa de Processos Biotecnológicos (GPBio) pela companhia e troca de experiências, em especial, à equipe formada por Darlane, Ítalo e Diana, pelo seu apoio, dedicação e trabalho na etapa final de realização deste trabalho.

Aos docentes e funcionários do DEQ-UFC.

Aos docentes e funcionários do DEQ-UFSCar.

Ao CNPq pela bolsa de pesquisa fomentada.

À minha mãe, Elenice Rocha Rabelo Sousa, por seu amor incondicional, apoio constante, carinho e por seu exemplo de luta e trabalho que me inspiram e servem de modelo para o início da minha jornada como mãe.

Ao meu pai, Vicente de Paulo Sousa, pelo seu amor, proteção e apoio em etapas importantes da minha vida.

Ao meu esposo, amigo, companheiro e pai da minha filha, Alexandre Marques Moreira, por ter me acompanhado ao longo de 12 anos de minha vida, sempre ao meu lado, fornecendo o melhor de si, através de incentivos, amor, alegria e carinho, além de compartilhar dos meus objetivos para minha realização pessoal e profissional. À nossa filha, Letícia, nosso maior presente, que desde o início de sua vida tem nos fornecido momentos únicos de imensa felicidade.

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	xi
NOMENCLATURA.....	xiii
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	4
2.1. Surfactantes.....	4
2.2. Metabólitos Produzidos por Bactérias do gênero <i>Bacillus</i>	5
2.2.1. Lipopeptídeos Antibióticos.....	6
2.2.2. Ácido Poly(γ -glutâmico) (γ -PGA).....	9
2.3. Produção de Lipopeptídeos a partir de <i>B. subtilis</i> : Efeito de Condições Nutricionais, Ambientais e Tipo de Processo.....	9
2.4. Principais Genes envolvidos na Síntese dos Lipopeptídeos Surfactina e Iturina.....	13
2.5. Produção de Ramnolipídeos por Bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i>	14
2.6. Glicerina: Co-produto da Produção de Biodiesel.....	17
3. Material e Métodos.....	24
3.1. Caracterização da Matéria-Prima.....	24
3.2. Hidrólise Ácida da Glicerina.....	24
3.3. Microrganismos.....	24
3.4. Ensaio realizados com <i>P. aeruginosa</i> MSIC02.....	25
3.4.1. Propagação do Inóculo.....	25
3.4.2. Condições de Cultivo e Estudo Cinético em Frascos Agitados.....	25
3.4.3. Ensaio Fermentativos em Biorreator Tipo Tanque Agitado.....	26
3.5. Ensaio realizados com <i>B. subtilis</i> LAMI009.....	27

3.5.1. Ensaio em Biorreator Tanque Agitado.....	27
3.5.2. Ensaio Fermentativo em Frascos Agitados	29
3.6. Métodos Analíticos	32
3.6.1 Determinação de Glicerol.....	32
3.6.2 Determinação de Glicose.....	32
3.6.3 Determinação do crescimento celular.....	32
3.6.4 Determinação de N-amônio.....	33
3.6.5 Determinação de Lipopeptídeos	33
3.6.6 Determinação de ramnose	33
3.7. Caracterização do Biossurfactante	34
3.7.1 Tensão Superficial.....	34
3.7.2 Índice de Emulsificação.....	34
3.8. Pesquisa do Gene <i>sfp</i>	34
3.9. Pesquisa do Gene <i>ituD</i>	35
3.10. Cálculo dos Parâmetros Fermentativos	35
3.11. Modelagem Cinética do Crescimento Celular, Consumo de Substrato e Formação de Produto	37
4. Resultados e Discussão	39
4.1. Caracterização da Matéria-Prima	39
4.2. Cinética de Cultivos em Batelada para a Produção de Ramnolípido por <i>P. aeruginosa</i> MSIC02	40
4.3. Cultivos de <i>P. aeruginosa</i> MSCI02 em Biorreator Tanque Agitado	49
4.4. Ensaio em Biorreator de Bancada com a Cepa <i>B. subtilis</i> LAMI009	52
4.5. Desenvolvimento de um Protocolo de Adaptação/Ativação do <i>B. subtilis</i> LAMI009 em Meio contendo Glicerol como Fonte de Carbono	55
4.6. Estudos Cinéticos em Cultivos Submersos de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em Meio de Cultivo Contendo Glicerina como Fonte de Carbono e Energia.....	59
4.6.1. Efeito de Fontes de Nitrogênio.....	59

4.6.2. Avaliação de diferentes concentrações de (NH ₄) ₂ SO ₄	68
4.6.3. Efeito da Suplementação de Extrato de Levedura em Diferentes Meios de Cultivo	72
4.7. Pesquisa de Genes <i>sfp</i> , <i>lpa14</i> e <i>ituD</i>	79
4.8. Efeito do Inóculo sobre os Cultivos de <i>B. subtilis</i> LAMI009	80
4.9. Avaliação da Capacidade Emulsificante e Estabilidade de Emulsões em Solução Aquosa do Biossurfactante Bruto	87
5. Conclusões	93
6. Trabalhos Futuros	95
7. Referências Bibliográficas	96

RESUMO

Biossurfactantes são compostos químicos tensoativos sintetizados por microrganismos. Estes compostos possuem muitas vantagens quando comparados com seus equivalentes sintetizados quimicamente como ação específica, baixa toxicidade, alta biodegradabilidade, efetividade em condições extremas de temperatura, pH e força iônica. Apresentam-se como substitutos promissores aos surfactantes químicos derivados da indústria do petróleo. A utilização de substratos renováveis e de baixo custo, como os resíduos agroindustriais, consiste em um dos fatores mais importantes para a viabilização econômica da produção destes compostos em escala industrial. Neste trabalho avaliou-se o uso da glicerina, um co-produto da produção de biodiesel, como fonte de carbono para produção de biossurfactante. Dois microrganismos, *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 e *Bacillus subtilis* LAMI009, ambos isolados a partir de amostras ambientais, foram empregados neste trabalho. Na primeira parte do trabalho experimentos realizados em frascos agitados com a *P. aeruginosa* mostraram que o aumento da produtividade de ramnolipídeos foi favorecido pelo aumento da concentração da fonte de nitrogênio (nitrato de sódio) e pela redução da concentração da fonte de carbono (glicerina). Na faixa estudada a concentração máxima de biossurfactante obtida foi de 2,3 g·L⁻¹ (razão C/N de 12). O efeito da concentração de nitrogênio sobre a biossíntese de ramnolipídeos e o comportamento do pH em função da concentração de nitrato durante os cultivos indicou que esta cepa possivelmente realizou uma rota denitrificante favorecendo a produção de ramnolipídeos. Os cultivos realizados em biorreator indicaram que o processo de produção integrado a extração/concentração por fracionamento em coluna de bolhas acarretou diversos problemas operacionais, como o arraste de células, e a redução da concentração de ramnolipídeos no meio reacional para 0,4 g·L⁻¹. Foram avaliados dois modelos cinéticos de formação de produto para os ensaios realizados. O modelo de Luedeking-Piret não apresentou boa representatividade do processo. O modelo proposto por MERCIER *et al.* (1992) mostrou-se mais adequado para representar a produção de ramnolipídeos pela cepa estudada. A avaliação da capacidade emulsificante do meio de cultivo livre de células mostrou que o biossurfactante produzido pela *P. aeruginosa* teve um desempenho eficiente, sendo capaz de emulsificar óleos de origem vegetal e mineral e atingir índice de emulsificação (IE₂₄) maior que 55 %. Na segunda parte do trabalho, cultivos realizados em frascos agitados para avaliação da produção de biossurfactantes lipopeptídeos por *B. subtilis* LAMI009 indicaram que o crescimento desta cepa foi dependente da suplementação do meio com extrato de levedura. Uma adaptação ao meio de fermentação foi necessária para eliminar a extensa fase *lag* durante o processo fermentativo. A utilização de fontes de nitrogênio inorgânicas mostrou que tanto o nitrato de amônio quanto o sulfato de amônio apresentaram valores de concentração de surfactina e produtividade volumétrica da ordem de 35 mg·L⁻¹ e 6,1 mg·L⁻¹·h⁻¹, respectivamente. A tensão superficial do meio de cultivo livre de células também foi semelhante para ambas fontes de nitrogênio, cujo valor mínimo foi 29,7 mN·m⁻¹. O nitrato de sódio foi fonte de nitrogênio adequada para o crescimento celular, entretanto apresentou baixa produtividade quando comparado com as demais fontes de nitrogênio avaliadas. Com a suplementação do meio de cultivo com extrato de levedura

obteve-se maior concentração de surfactina ($60,0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) e produtividade volumétrica ($5,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) e menor tensão superficial ($28,1 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$) relativamente ao meio de cultivo contendo fonte de nitrogênio inorgânica. O tamanho do inóculo exerceu grande influência sobre a concentração de surfactina e a produtividade volumétrica. Quando se utilizou 2% (v/v) de inóculo a concentração de surfactina e a produtividade volumétrica alcançaram valores de $148,2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ e $14,22 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, respectivamente. A pesquisa de genes responsáveis pela produção dos lipopeptídeos surfactina e iturina indicou a presença dos genes *lpa14* e *ituD* no genoma da linhagem *B. subtilis* LAMI009. A avaliação do perfil cromatográfico dos extratos metanólicos de lipopeptídeos obtidos a partir dos cultivos com as fontes de nitrogênio nitrato de amônio e nitrato de sódio apresentou picos característicos de outro lipopeptídeo além da surfactina, a iturina,. Portanto, acredita-se que esta linhagem é uma co-produtora de surfactina e iturina. A capacidade emulsificante do meio de cultivo livre de células apresentou maior estabilidade com os cultivos com nitrato de amônio e nitrato de sódio, obtendo-se IE_{24} de 65 % com n-hexadecano e 45 % com querosene. A separação do biosurfactante por precipitação ácida a partir do meio de cultivo livre de células mostrou que esta etapa de pré-purificação promoveu um aumento da capacidade emulsificante da mistura de lipopeptídeos sintetizada por *B. subtilis* LAMI009. A solução aquosa do biosurfactante bruto foi capaz de emulsificar óleos naftênicos, óleos vegetais e um hidrocarboneto aromático, apresentando IE_{24} maiores que 65 % com os óleos avaliados. As emulsões formadas com óleos naftênicos, utilizados como base para lubrificantes, foram mais estáveis. Quanto menor o tamanho das gotas mais estável foi a emulsão formada.

Palavras-chave: Surfactina, ramnolipídeo, glicerina, surfactante, otimização de meio, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, modelagem matemática.

ABSTRACT

Production of lipopeptides and glycolipids from the bioconversion of co-product of biodiesel production process

Biosurfactants are a surface-active chemical compounds synthesized by microorganisms. These compounds have many advantages when compared to their chemically synthesized counterparts as specific action, low toxicity, higher biodegradability, effectiveness at extreme temperatures, pH and strength ionic. They appear as promising candidates to replace chemical surfactants produced from petrochemicals. The use of renewable and low cost substrates such as agro based industrial wastes is one of the attractive strategies for economical large scale biosurfactants production. In this work, it was evaluated glycerol, a co-product of biodiesel production, as carbon source for biosurfactant production. Two microorganisms, *Pseudomonas aeruginosa* MSCIC02 and *Bacillus subtilis* LAMI009, both isolated from environmental sources, were used thorough this work. In the first part of the work experiments were carried out in shake flasks using *P. aeruginosa*. The results showed that the increase in nitrogen source (sodium nitrate) and the decrease in the carbon source (glycerin) favored rhamnolipids production. In the range studied, the maximum biosurfactant concentration obtained was $2.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (C/N ratio 12). The effect of nitrogen concentration on the biosynthesis of rhamnolipids and pH behavior as a function of the nitrate concentration in the cultures indicated that this strain probably carried a denitrification route favoring the production of rhamnolipids. Experimental runs carried out in bioreactor indicated that the integrated process of production and separation/concentration by fractionation in bubble column equipment caused many operation problems, such as the drag cell, and reducing the concentration of rhamnolipids to $0.4 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the reaction medium. The kinetics of product formation was evaluated by two models. The Luedeking-Piret model was not able to represent the process. The model proposed by MERCIER et. al. (1992) could adequately describe the rhamnolipids production from *P. aeruginosa* strain. Emulsifying capacity of the cell-free culture medium was assessed by the emulsification index (EI_{24}). The biosurfactant produced was able to emulsify vegetable oils as well as mineral oils. EI_{24} greater than 55% was reached. In the second part of the work experimental data from *Bacillus subtilis* LAMI009 cultivated in shake flasks showed that the growth of this strain was dependent on

the medium supplementation with yeast extract. A change in culture medium was implemented in order to reduce the length of the lag phase. The use of inorganic nitrogen sources showed that both ammonium nitrate and ammonium sulphate reached similar values of surfactin concentration and volumetric productivity. It was obtained 35 mg·L⁻¹ and 6.1 mg·L⁻¹·h⁻¹, respectively. Surface tension of the cell-free culture medium was similar for both nitrogen sources. The minimal value obtained was 29.7 mN·m⁻¹. Sodium nitrate was found to be an adequate nitrogen source for cell growth. However, in these assays low productivity and low surface tension reduction were obtained when compared to the other nitrogen sources evaluated. The supplementation of the culture medium with yeast extract improves the surfactin concentration (60.0 mg·L⁻¹) and volumetric productivity (5.2 mg·L⁻¹·h⁻¹). In this assay the surface tension reached 28.1 mN·m⁻¹. The inoculum size had a great influence on cell growth and production of surfactin. When 2% (v/v) of inoculum was used the surfactin concentration and volumetric productivity obtained were 148.2 mg·L⁻¹ e 14.22 mg·L⁻¹·h⁻¹, respectively. The search for genes responsible for production of lipopeptides surfactin and iturine indicated the presence of the genes *lpa14* and *ituD* in *B. subtilis* LAMI009 genome. Analysis of the chromatography profile of methanol extracts of the lipopeptides from culture medium with ammonium nitrate and sodium nitrate as nitrogen source showed characteristic peaks of the surfactin and iturine. Thereby, it is believed that this strain is a co-producer of both surfactin and iturine. Emulsifying capacity of the cell-free culture medium showed higher stability with the media that employed ammonium nitrate and sodium nitrate as nitrogen source. It was obtained EI₂₄ of 65% with n-hexadecane and 45% with kerosene. The acid precipitation of biosurfactant from the cell-free culture medium showed that this pre-purification step promoted an increase in the emulsifying capacity of the mixture of lipopeptides synthesized by *B. subtilis* LAMI009. The aqueous solution of crude biosurfactant was able to emulsify naphthenic oils, vegetable oils, and an aromatic hydrocarbon. Values of EI₂₄ greater than 65% were obtained. Emulsions formed with naphthenic oils were more stable according to droplet-size distribution. The smaller the size of droplets, the more stable was the emulsion.

Keywords: Surfactin, rhamnolipid, glycerin, surfactant, medium optimization, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, mathematical modeling.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 2.1 Estrutura primária da surfactina (SEYDLOVÁ e SVODOBOVÁ, 2008).....	7
FIGURA 2.2 Estrutura da iturina A (NORIYASU, SHAHEDUR e TAKASHI, 2009).	8
FIGURA 2.3 Reação de transesterificação metílica (MOTA e PESTANA, 2011).	17
FIGURA 2.4 Dados da produção brasileira de biodiesel de 2005 a 08/2012. Fonte: ANP (2012).....	18
FIGURA 2.5 Dados da produção brasileira de glicerina estimada a partir da produção de biodiesel. Fonte: ANP (2012).	18
FIGURA 2.6 Mapa com as usinas de biodiesel autorizadas a funcionar pela ANP no Brasil (atualizadas até 2009). Fonte: ANP(2012).....	19
FIGURA 3.1 Representação esquemática da configuração do biorreator utilizado nos experimentos.	28
FIGURA 4.1 Cinética do crescimento celular (A) e da produção de ramnolípídeos (B) em cultivo em frascos agitados de <i>P. aeruginosa</i> MSIC02 em meio sintético contendo glicerina como fonte de carbono.....	43
FIGURA 4.2 Comportamento do pH ao longo do tempo para os ensaios avaliados.....	44
FIGURA 4.3 Cinética do crescimento celular, produção de ramnolípídeo e consumo de substrato durante o cultivo de <i>P. aeruginosa</i> MSIC02 em frascos agitados em razão C/N = 12: (A) Modelo Luedeking-Piret e (B) Modelo Mercier <i>et al.</i> (1992).....	45
FIGURA 4.4 Cinética do crescimento celular, produção de ramnolípídeo e consumo de substrato durante o cultivo de <i>P. aeruginosa</i> MSIC02 em frascos agitados em razão C/N = 21: (A) Modelo Luedeking-Piret e (B) Modelo Mercier <i>et al.</i> (1992).....	45
FIGURA 4.5 Cinética do crescimento celular, produção de ramnolípídeo e consumo de substrato durante o cultivo de <i>P. aeruginosa</i> MSIC02 em frascos agitados em razão C/N = 36: (A) Modelo Luedeking-Piret e (B) Modelo Mercier <i>et al.</i> (1992).....	46

FIGURA 4.6 Cinética do crescimento celular, produção de ramnolipídeo e consumo de substrato durante o cultivo de <i>P. aeruginosa</i> MSIC02 em frascos agitados em razão C/N = 59: (A) Modelo Luedeking-Piret e (B) Modelo Mercier <i>et al.</i> (1992).....	46
FIGURA 4.7 Cinética do crescimento celular, produção de ramnolipídeo e consumo de substrato durante o cultivo de <i>P. aeruginosa</i> MSIC02 em frascos agitados em razão C/N = 86: (A) Modelo Luedeking-Piret e (B) Modelo Mercier <i>et al.</i> (1992).....	47
FIGURA 4.8 Cinética de crescimento celular, produção de surfactante e consumo de glicerol durante o cultivo de <i>P. aeruginosa</i> MSC102 em biorreator tipo tanque agitado com coleta de espuma e sem reciclo de células.	49
FIGURA 4.9 Cinética de crescimento celular, produção de ramnolipídeo e consumo de glicerol durante o cultivo de <i>P. aeruginosa</i> MSC102 em biorreator tipo tanque agitado com coleta de espuma e reciclo de células.	50
FIGURA 4.10 Comportamento da tensão superficial do meio livre de células durante o cultivo em biorreator tanque agitado de <i>P. aeruginosa</i> MSIC02.	50
FIGURA 4.11 Índice de emulsificação com diferentes substratos hidrofóbicos realizados em meio de cultura livre de células obtido a partir do cultivo de <i>P. aeruginosa</i> MSC102 em biorreator tipo tanque agitado.	52
FIGURA 4.12 Perfis de crescimento celular, consumo de glicerol e O ₂ durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em biorreator tipo tanque agitado com coleta de espuma e reciclo de células. (OD – oxigênio dissolvido).....	53
FIGURA 4.13 Tensão superficial do meio de cultura livre de células a partir do cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em biorreator tipo tanque agitado utilizando glicerol como fonte de carbono e energia.	53
FIGURA 4.14 Perfis de crescimento celular, consumo de glicose e de O ₂ durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em biorreator tipo tanque agitado com coleta de espuma e reciclo de células. (OD – oxigênio dissolvido).....	54
FIGURA 4.15 Crescimento de <i>B. subtilis</i> ATCC6633 em meio Morán modificado suplementado com 5 g/L de extrato de levedura.	56

FIGURA 4.16 Crescimento <i>B. subtilis</i> ATCC6633 em meio Morán modificado sem extrato de levedura.....	56
FIGURA 4.17 Crescimento de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em meio Morán modificado suplementado com extrato de levedura.....	57
FIGURA 4.18 Crescimento celular durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados com glicerol como substrato a partir de inóculos obtidos nos meios (a) PGE (peptona-glicose-extrato de levedura) e (b) Meio Morán, após adaptação.....	58
FIGURA 4.19 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e NH_4^+ e comportamento do pH durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 180 rpm e 30 °C com glicerina como fonte de carbono e energia e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio.....	59
FIGURA 4.20 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e NH_4^+ e comportamento do pH durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 180 rpm e 30 °C com glicerina como fonte de carbono e energia e NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio.....	60
FIGURA 4.21 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e comportamento do pH durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 180 rpm e 30 °C com glicerina como fonte de carbono e energia e NaNO_3 como fonte de nitrogênio.....	60
FIGURA 4.22 Determinação das velocidades específicas de crescimento celular durante a fase exponencial de crescimento para diferentes fontes de nitrogênio durante os cultivos em frascos agitados de <i>B. subtilis</i> LAMI009 a 30 °C e 180 rpm. (a) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, (b) NH_4NO_3 , (c) NaNO_3	62
FIGURA 4.23 Influência de fontes de nitrogênio sobre a produtividade volumétrica, produção de surfactina e produtividade específica a partir de cultivos em frascos agitados de <i>B. subtilis</i> LAMI009 a 180 rpm e 30 °C.....	64
FIGURA 4.24 Efeito de fontes de nitrogênio sobre o comportamento da tensão superficial do meio de cultivo livre de células durante o cultivo em frascos agitados de <i>B. subtilis</i> LAMI009 a 180 rpm e 30 °C em meio mineral com glicerina como fonte de carbono e energia.....	65

FIGURA 4.25 Cromatogramas obtidos a partir do meio de cultivo livre de células após extração líquido-líquido de lipopeptídeos de acordo com a fonte de nitrogênio: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (a), NH_4NO_3 (b), NaNO_3 (c), iturina padrão Sigma (d) e surfactina padrão Sigma (e).....	67
FIGURA 4.26 Cromatograma dos extratos metanólicos da iturina obtida a partir de <i>B. subtilis</i> RB14 (HUANG, ANO, SHODA, 1993).....	68
FIGURA 4.27 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e de NH_4^+ , e comportamento do pH durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 180 rpm e 30 °C com glicerina como fonte de carbono e energia e 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	69
FIGURA 4.28 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e de NH_4^+ , e comportamento do pH durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 180 rpm e 30 °C com glicerina como fonte de carbono e energia e 3,7 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	70
FIGURA 4.29 Efeito da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre o comportamento da tensão superficial do meio de cultivo livre de células durante o cultivo em frascos agitados de <i>B. subtilis</i> LAMI009 a 180 rpm e 30 °C em meio mineral com glicerina como fonte de carbono e energia.	72
FIGURA 4.30 Influência de diferentes meios de cultivo e suplementação de extrato de levedura sobre a produtividade volumétrica, produção de surfactina e o fator de conversão biomassa em produto ($Y_{P/X}$) a partir de cultivos em frascos agitados de <i>B. subtilis</i> LAMI009 a 180 rpm e 30 °C.	74
FIGURA 4.31 Influência do meio de cultivo sobre o comportamento da produção de surfactina durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados a 180 rpm e 30 °C.	74
FIGURA 4.32 Influência do meio de cultivo sobre o crescimento celular de <i>B. subtilis</i> LAMI009 ao longo de 72 horas de cultivo em frascos agitados a 180 rpm e 30 °C.	75
FIGURA 4.33 Comportamento do consumo de NH_4^+ ao longo do cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 a 180 rpm e 30 °C em frascos agitados e em diferentes meios de cultivo.....	76

FIGURA 4.34 Comportamento das velocidades específicas de crescimento celular e de produção de surfactina ao longo do cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados a 180 rpm e 30 °C em função de diferentes meios de cultivo.	77
FIGURA 4.35 Comportamento da tensão superficial do meio livre de células durante o cultivo em frascos agitados de <i>B. subtilis</i> LAMI009 a 180 rpm e 30 °C em meios de cultivo suplementados com extrato de levedura.	78
FIGURA 4.36 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e comportamento do pH (A) e comportamento das velocidades específicas (B) durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados a 180 rpm e 30 °C em meio proposto por MORÁN (2000) suplementado com extrato de levedura e 0,5 % de inóculo.	81
FIGURA 4.37 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e comportamento do pH (A) e comportamento das velocidades específicas (B) durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados a 180 rpm e 30 °C em meio proposto por MORÁN (2000) suplementado com extrato de levedura e 2,0 % de inóculo.	82
FIGURA 4.38 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e comportamento do pH (A) e comportamento das velocidades específicas (B) durante o cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados a 180 rpm e 30 °C em meio proposto por MORÁN (2000) suplementado com extrato de levedura e 10,0 % de inóculo.	83
FIGURA 4.39 Influência do tamanho do inóculo sobre o comportamento da tensão superficial do meio livre de células durante o cultivo em frascos agitados de <i>B. subtilis</i> LAMI009 a 180 rpm e 30 °C.	86
FIGURA 4.40 Capacidade emulsificante (IE_{24}) do meio de cultivo livre de células ao longo dos cultivos de <i>B. subtilis</i> LAMI009 com diferentes fontes de nitrogênio: (a) $NaNO_3$, (b) NH_4NO_3 , (c) $(NH_4)_2SO_4$	88
FIGURA 4.41 Capacidade emulsificante (IE_{24}) do meio de cultivo livre de células após 48 horas de cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 com diferentes fontes de nitrogênio.	89
FIGURA 4.42 Capacidade emulsificante (IE_{24}) do meio de cultivo livre de células ao longo do cultivo de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados a 180 rpm e 30 °C em (a) meio	

proposto por SAR e ROSEMBERG (1983) modificado e em (b) meio proposto por MORÁN (2000) suplementado com 5,0 g/L de extrato de levedura.....	90
FIGURA 4.43 Capacidade emulsificante da solução aquosa de biossurfactante bruto com diferentes tipos de óleo.	91
FIGURA 4.44 Micrografias (65X, microscópio óptico) de emulsões obtidas com meio de cultivo livre de células e NH10 (a) e solução aquosa de biossurfactante bruto (pH 9,0) com NH10 (b), NH20 (c) e NH140 (d).....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Aplicações de surfactantes.....	4
Tabela 2.2 Unidades produtoras de biodiesel instaladas no Brasil (até 2009).....	19
Tabela 3.1 Concentrações de NaNO ₃ e glicerol utilizadas para o estudo cinético.....	26
Tabela 3.2 Composição do meio de cultivo.....	28
Tabela 3.3 Composição da solução de micronutrientes.....	29
Tabela 3.4 Composição do meio de cultivo SAR e ROSEMBERG (1983).....	31
Tabela 4.1 Caracterização de macro e microelementos da glicerina tratada resultante da transesterificação do óleo de soja.....	39
Tabela 4.2 Parâmetros cinéticos e estequiométricos da fermentação em frascos agitados da linhagem <i>P. aeruginosa</i> MSIC02 em meio sintético com glicerina de mamona como substrato realizados em diferentes razões C/N.....	42
Tabela 4.3 Parâmetros estimados para os modelos logístico e Luedeking-Piret para as cinéticas de crescimento celular, produção de ramnolípideos e consumo de substrato durante o cultivo do <i>P. aeruginosa</i> MSIC02 em frascos agitados.....	47
Tabela 4.4 Parâmetros estimados para os modelos logístico e Mercier <i>et al.</i> (1992) para as cinéticas de crescimento celular, produção de ramnolípideos e consumo de substrato durante o cultivo do <i>P. aeruginosa</i> MSIC02 em frascos agitados.....	48
Tabela 4.5 Velocidades específicas de crescimento, período da fase exponencial e densidade celular máxima obtidas nos cultivos de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 30 °C e 180 rpm.....	62
Tabela 4.6 Tensão superficial mínima e redução da tensão superficial do meio de cultivo livre de células obtidas a partir do cultivo em frascos agitados de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em meio mineral com glicerina como fonte de carbono e energia.....	65

Tabela 4.7 Consumo de NH_4^+ e glicerol, e pH final obtidos nos cultivos de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 30 °C e 180 rpm com diferentes concentrações de nitrogênio.....	71
Tabela 4.8 Tensão superficial mínima e redução da tensão superficial do meio de cultivo livre de células obtidas a partir do cultivo em frascos agitados de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em meios de cultivo suplementados com extrato de levedura.	79
Tabela 4.9 Parâmetros de fermentação em função do tamanho do inóculo a partir de cultivos em frascos agitados de <i>B. subtilis</i> LAMI009 a 180 rpm e 30 °C.....	84
Tabela 4.10 Densidade celular, consumo de substrato e fator de conversão biomassa produto em função do tamanho do inóculo a partir de cultivos em frascos agitados de <i>B. subtilis</i> LAMI009 a 180 rpm e 30 °C.....	84
Tabela 4.11 Tensão superficial mínima do meio de cultivo livre de células e concentração de surfactina obtidas a partir do cultivo em frascos agitados de <i>B. subtilis</i> LAMI009 em meios de cultivo suplementados com extrato de levedura.	86

NOMENCLATURA

P_0 e P_{max} são as concentrações inicial e máxima de lipopeptídeo, respectivamente

P_{max} – concentração máxima de produto (g/L)

P_r – razão entre a taxa volumétrica inicial de formação do produto (r_p) e a concentração inicial de produto P_0 (g/L)

$X_{máx}$ – concentração de biomassa na fase estacionária de crescimento (g/L)

X_{max} e X_0 são os valores máximo e inicial da concentração de biomassa, respectivamente

t - tempo (h)

P_X – Produtividade volumétrica de biomassa (mg /L.h)

P_B – Produtividade volumétrica do biossurfactante (mg/L.h)

Y_{pS} – Fator de conversão substrato em produto (g/g)

Y_{XS} – Fator de conversão substrato em biomassa (g/g)

Y_{pX} – Fator de conversão biomassa em produto (g/g)

Letras gregas:

α – parâmetro relacionado ao metabolismo primário (g_p/g_X)

β – parâmetro relacionado ao metabolismo secundário (g_p/g_X/h)

μ_{max} - velocidade específica máxima de crescimento celular (h⁻¹)

μ_X - velocidade específica de crescimento celular (h⁻¹)

μ_p - velocidade específica de formação do produto (g_p/g_X.h)

μ_s - velocidade específica de consumo de substrato (g_S/g_X.h)

1. Introdução

O aumento na busca por fontes alternativas de energia e processos sustentáveis tem estimulado o mercado mundial de biocombustíveis, dentre eles, o biodiesel (RIVALDI *et al.*, 2007). A produção deste biocombustível encontra-se em crescimento acelerado tanto em países desenvolvidos, como também em países em desenvolvimento, como Brasil, Argentina, Indonésia e Malásia (AMARAL *et al.*, 2009), gerando uma quantidade proporcional de subprodutos. A glicerina constitui o principal co-produto gerado na produção de biodiesel, correspondendo a 10 % do seu volume total (DASARI *et al.*, 2005). De acordo com estimativa realizada em 2007 pelo Ministério de Minas e Energia, o incremento do volume de biodiesel na matriz energética nacional aumentaria a produção de glicerina de 83 para 330 milhões L/ano até 2010. Em 2011 a produção anual de biodiesel foi de aproximadamente 2,7 milhões m³/ano (ANP, 2012). O incremento do volume de biodiesel deve-se à obrigatoriedade da adição deste biocombustível ao combustível de petróleo (Lei 11.097/2005) que, até 2013, deverá ser equivalente a 5 % do volume total de diesel utilizado (ANP, 2007). Os setores industriais que atualmente utilizam a glicerina são incapazes de absorver o volume gerado devido ao aumento da produção de biodiesel, acarretando um volume excedente no mercado nacional o que, por consequência, ocasiona sua desvalorização (GONÇALVES *et al.*, 2006).

Apesar do aumento de fontes de energia alternativas, ainda existe uma grande dependência da indústria do petróleo. Desta forma, as atividades relacionadas com a produção, transporte e estocagem de petróleo são inevitáveis e envolvem potenciais riscos de acidentes envolvendo derramamentos. Atualmente, as soluções mais frequentemente utilizadas para resolver os problemas de derramamento de óleo compreendem a utilização de substâncias químicas dispersantes, coagulantes e/ou uso de redes de contenção de óleo. Os surfactantes constituem uma importante classe desses produtos químicos aplicados com esta finalidade. Tais compostos disponíveis atualmente no mercado são, em sua maioria, derivados do petróleo o que lhes confere um caráter não biodegradável e tóxico ao meio ambiente. Entretanto, o crescente aumento na produção mundial destes derivados, da preocupação ambiental e as novas legislações de controle do meio ambiente estão levando à procura por substâncias naturais como opção aos produtos existentes (NITSCHKE e PASTORE, 2002). Uma alternativa atraente é a biorremediação, que consiste na utilização de microrganismos ou de seus produtos capazes de degradar o petróleo e/ou seus derivados (ROCHA *et al.*, 2007).

Os biossurfactantes constituem uma classe de surfactantes que são produzidos a partir de organismos vivos, podendo ser encontrados em superfícies de células microbianas ou excretados extracelularmente. Apesar de apresentarem diversas vantagens sobre os surfactantes químicos, os surfactantes microbianos ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação do produto e ao uso de substratos caros. O problema econômico da produção de biossurfactantes pode ser significativamente reduzido através do uso de fontes alternativas de nutrientes, facilmente disponíveis e de baixo custo e que permitam altas concentrações de biossurfactante (KOSARIC, 1992, ROCHA *et al.*, 2006).

Glicolipídeos são surfactantes microbianos formados por uma ou duas unidades de açúcar ligadas por meio de ligação glicosídica a uma unidade de ácido graxo. Dentre estes, destacam-se os ramnolipídeos, produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas*, e os soforolipídeos, produzidos por leveduras pertencentes ao gênero *Torulopsis* (FIECHTER, 1992; ASHBY *et al.*, 2005; SOUSA, 2008).

Lipopetídeos representam uma classe de biossurfactantes que tem atraído grande interesse na área científica. Surfactina e iturina destacam-se dentro desta classe de surfactantes microbianos devido às suas excelentes propriedades tensoativas e à atividade antifúngica, respectivamente. Tais compostos são encontrados na natureza e são produzidos por vários microrganismos, principalmente, do gênero *Bacillus sp.*

Assim, este trabalho teve por objetivo investigar o uso do co-produto do processo de produção do biodiesel, a glicerina, como fonte de carbono e energia para a produção de biossurfactantes lipopeptídeos e glicolipídeos via rota bioquímica. Os primeiros ensaios foram realizados empregando a bactéria *P. aeruginosa* MSC102 em biorreator automatizado no Laboratório de Desenvolvimento e Automação de Bioprocessos no Departamento de Engenharia Química da UFSCar (LaDABio/DEQ-UFSCar), com o objetivo de avaliar o processo de produção-extração por fracionamento em colunas de bolhas. Entretanto, estes foram interrompidos em função do questionamento da necessidade de o laboratório ser certificado para Nível de Biossegurança 2 (NB-2). *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa amplamente distribuída na natureza. Raramente causa infecções, entretanto, em pacientes hospitalizados, está associada a uma alta taxa de mortalidade, associada a outras infecções. Embora o trabalho não envolvesse a modificação genética do microrganismo, optou-se por iniciar processo de certificação do laboratório antes de dar prosseguimento aos experimentos. Também, naquele momento, havia a opção por iniciar os estudos com linhagem de *B. subtilis* isolada a partir da Estação de Tratamento de Efluentes da Universidade Federal

do Ceará (Fortaleza, CE). Assim, optou-se por utilizar esta nova linhagem (*B. subtilis* LAMI 009) em substituição à *Pseudomonas*. A linhagem *B. subtilis* LAMI009 já havia sido prospectada quanto à sua capacidade de produzir biossurfactantes em meio de cultivo composto por glicerina como fonte de carbono e energia. Resultados preliminares mostraram que a linhagem produzia composto com boas propriedades tensoativas e capacidade emulsificante (SOUSA *et al.*, 2011). Dessa forma optou-se por dar continuidade à tese empregando este microrganismo em substituição à *Pseudomonas aeruginosa*.

Com o intuito de desenvolver este processo, os seguintes objetivos foram definidos:

- Avaliação de microrganismos, *P. aeruginosa* e de *Bacillus sp.*, para produção de biossurfactantes, empregando como substrato a glicerina, co-produto da produção de biodiesel;
- Avaliação, em escala de laboratório, das condições de cultivo para a produção do biossurfactante;
- Avaliação de modelos cinéticos sobre a biossíntese de ramnolipídeos em frascos agitados;
- Produção de biossurfactantes por fermentação em biorreator tanque agitado operado no modo batelada;
- Caracterização dos biossurfactantes produzidos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Surfactantes

Surfactantes são compostos anfífilos que possuem a capacidade de reduzir a tensão interfacial e superficial através de adsorção na interface de líquidos imiscíveis, promovendo o aumento da solubilidade, mobilidade, biodisponibilidade e conseqüentemente a biodegradação de compostos hidrofóbicos ou orgânicos insolúveis (SINGH, HAMME e WARD, 2007). Possuem aplicabilidade em várias áreas industriais devido à sua diversidade funcional. A Tabela 2.1 apresenta a relação entre a função e as aplicações de compostos tensoativos.

Tabela 2.1 Aplicações de surfactantes.

Área	Aplicação	Função
Petróleo	Recuperação melhorada do petróleo	Melhoramento da drenagem do óleo dentro do poço; molhabilidade de superfícies sólidas; redução da viscosidade do óleo; redução da tensão interfacial.
	Desemulsificante	Desemulsificação de emulsões de óleo; redução da viscosidade; agente umectante.
Ambiental	Biorremediação	Emulsificação de hidrocarbonetos; redução da tensão interfacial; complexação de metais.
Alimentícia	Emulsificação e Desemulsificação	Emulsificante; solubilizante; desemulsificante; agente lubrificante.
	Ingrediente Funcional	Interação com lipídeos, proteínas e carboidratos.
Biologia	Microbiológica	Comportamento fisiológico como mobilidade celular, comunicação celular, competição célula-célula, disponibilidade de nutrientes.
Agrícola	Biocontrole	Facilitação de mecanismos de biocontrole de microrganismos tais como parasitismo, antibiose, competição e hipovirulência

Fonte: SINGH, HAMME e WARD (2007).

SHALIGRAM e SINGHAL (2010) relatam a grande demanda industrial por surfactantes, estimando o mercado mundial em US\$ 9 milhões por ano.

Surfactantes quimicamente sintetizados são em sua maioria de origem petroquímica, e, portanto, obtidos através de síntese orgânica sob condições drásticas que inevitavelmente acarreta a geração de produtos secundários (HOLMBERG *et al.*, 2003). Além disso, a biodegradação destes compostos no ambiente, mecanismo mais importante para remoção irreversível dessas substâncias, acarreta a geração de intermediários potencialmente tóxicos durante a rota de biodegradação (TIEHM, 1994; LIMA *et al.*, 2011). Desta forma, a utilização de produtos ambientalmente favoráveis, de toxicidade reduzida, obtidos a partir de matérias-primas renováveis e que apresentem funcionalidade semelhante, sendo capazes de substituí-los, constituem vantagens importantes sobre os surfactantes químicos. Os biosurfactantes, surfactantes de origem microbiana, apresentam estas características, além de grande diversidade química e estrutural conferindo-lhes aplicações em diversas áreas da indústria (SINGH, HAMME e WARD, 2006). Possuem como principais propriedades a efetividade em condições extremas de pH, temperatura e salinidade, elevada biodegradabilidade, baixa toxicidade, biocompatibilidade, digestibilidade e especificidade (KOSARIC, 1992). Além disso, biosurfactantes são mais eficientes do que surfactantes químicos, pois apresentam concentração micelar crítica (concentração de surfactante a partir da qual as moléculas de surfactante formam agregados denominados micelas) inferior à maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente (FIECHTER, 1992). Os biosurfactantes podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química e seu peso molecular (FIECHTER, 1992; ROSENBERG e RON, 1999). Dentre estes ressaltam-se biosurfactantes pertencentes à classe dos glicolipídeos, constituídos por moléculas de carboidratos ligadas a uma cadeia de ácido β -hidroxigraxo, e a classe dos lipopeptídeos, que consistem de peptídeos cíclicos ligados a uma cadeia de ácido β -hidroxigraxo ou β -aminograxo. Ambos são bioemulsificantes de baixa massa molecular (ROSENBERG e RON, 1999).

2.2. Metabólitos Produzidos por Bactérias do gênero *Bacillus*

B. subtilis é uma rizobactéria gram-positiva, esporulante, produtora de diversos metabólitos secundários, cuja variabilidade de estruturas e atividades biológicas tem atraído o interesse de pesquisadores de diversas áreas (STEIN, T., 2005). Além disso, estas linhagens

possuem elevada capacidade em produzir proteínas extracelularmente, sendo excretadas diretamente ao meio externo (WESTERS, WESTERS e QUAX, 2004).

Dentre os metabólitos excretados por *Bacillus sp.* destacam-se os antibióticos, antifúngicos, sideróforos, proteínas (enzimas) e polipeptídeos (ácido poly(γ -glutâmico)) (ADINARAYANA e ELLAIAH, 2002; XU *et al.*, 2005; SANSINENEA e ORTIZ, 2011).

2.2.1. Lipopeptídeos Antibióticos

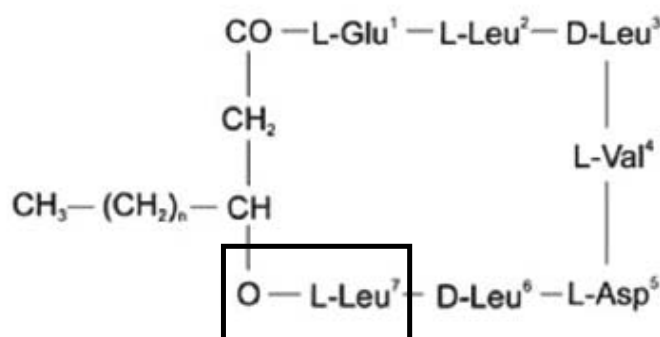
Os antibióticos produzidos por *B. subtilis* apresentam mais de duas dúzias de estruturas distintas e são predominantemente peptídeos que apresentam uma grande diversidade estrutural (CABOCHE *et al.*, 2010). Dentre as biomoléculas com ação antimicrobiana produzidas por *B. subtilis*, encontram-se os compostos anfipáticos classificados como biossurfactantes devido à sua capacidade tensoativa e elevada atividade superficial. Tais compostos, que apresentam propriedades antimicrobianas e antifúngicas, apresentam-se como lipopeptídeos cíclicos representados, principalmente, por: surfactinas, iturinas, liquenisininas, fengicinas, pumilacidinas e isohalobacilinas (PUEYO *et al.*, 2009).

Os lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* são classificados em três famílias, de acordo com a sequência de aminoácidos que compõem a parte peptídica da molécula e o tipo e grau de ramificação do ácido graxo (ROMERO *et al.*, 2007). A família iturina, representada por iturina A, micosubtilina e bacilomicina (TSUGE *et al.*, 2005). A família das fengicinas, que incluem as plipastatinas A e B, compostos de grande espectro de ação antifúngica e antibiótica (VOLPON, BESSON e LANCELIN, 2000). Por fim, a família surfactina que consiste na mais estudada família de lipopeptídeos e destaca-se através de sua poderosa ação surfactante (MAGNET-DANA *et al.* 1992).

O primeiro relato na literatura sobre a surfactina ocorreu em 1968, quando Arima *et al.* apresentaram um novo composto biologicamente ativo presente no meio de cultivo de *B. subtilis*. O nome surfactina foi atribuído devido às suas excelentes propriedades tensoativas. Posteriormente, KAKINUMA *et al.* (1969a) elucidaram a sua estrutura como a de um lipopeptídeo macrolídeo, cuja estrutura determinada a partir de métodos espectroscópicos, foi constituída por um heptapeptídeo ligado a um ácido β -hidroxigraxo através de um anel lactona (KAKINUMA *et al.*, 1969b). A Figura 2.1 apresenta a estrutura primária da surfactina. O principal composto, Leu⁷-surfactina, que constitui esta estrutura é formada por um resíduo L-leucina com o C-terminal do aminoácido ligado através de uma ligação éster ao

ácido β -hidroxigraxo, como ilustrado na Figura 2.1. Os isômeros que constituem este lipopeptídeo diferem-se através do número de carbonos na cadeia lipídica, que pode variar de 13 a 15 átomos, bem como, da composição da parte peptídica (PEYPOUX e MICHEL, 1992). Tais variações estruturais são função da linhagem utilizada e das condições de cultivo (LIU *et al.*, 2012).

FIGURA 2.1 Estrutura primária da surfactina (SEYDLOVÁ e SVODOBOVÁ, 2008).



PEYPOUX *et al.* (1991) relataram a produção de uma nova variante da estrutura primária da surfactina a partir de *B. subtilis* S499 cultivado em meio LANDY *et al.* (1948) em mesa agitadora a 32 °C durante cinco dias. A nova variante diferiu da Leu⁷-surfactina através da substituição do resíduo aminoácido C-terminal por valina. O cultivo da mesma linhagem em meio LANDY *et al.* (1948), em que a fonte de nitrogênio ácido glutâmico foi substituída por alanina na mesma concentração original (5,0 g/L), forneceu três lipopeptídeos do grupo surfactina: Leu⁷-surfactina, Val⁷-surfactina e a nova isoforma Ala⁴-surfactina (PEYPOUX *et al.*, 1994).

ITOKAWA *et al.* (1994) relataram uma estrutura de surfactina, até então inédita, identificada como Ile⁷-surfactina co-produzida com Leu⁷-surfactina. Esta nova variante contém o aminoácido isoleucina no resíduo 7 e exibiu uma conformação diferenciada. A parte peptídica do novo composto, elucidada através de técnicas espectroscópicas, apresentou uma sequência de aminoácidos correspondente a Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Ile, além de apresentar um grupo metileno a menos comparativamente ao seu homólogo Leu⁷-surfactina.

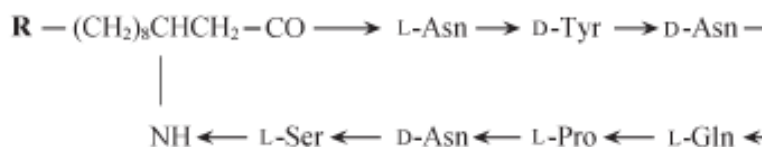
Isoformas de surfactina que apresentam diferenças no comprimento da cadeia carbônica do ácido β -hidroxigraxo, bem como na proporção entre estas isoformas, tem sido relatadas na literatura (WEI e CHU, 2002; WEI *et al.*, 2003; ABDEL-MAWGOUD, ABOULWafa e HASSOUNA, 2008). A surfactina obtida a partir de *B. subtilis* ATCC 21332 cultivado em

meio quimicamente definido contendo glicose como fonte de carbono apresentou seis isoformas cujos tempos de retenção foram semelhantes à surfactina padrão (WEI e CHU, 2002). ABDEL-MAWGOUD, ABOULWABA e HASSOUNA (2008) verificaram que a surfactina padrão e a surfactina teste obtida a partir de *B. subtilis* BS5, cultivado em meio mineral suplementado com melaço, apresentaram nove picos, entre estes seis majoritários. Os autores relataram, através do perfil cromatográfico destes lipopeptídeos, que estes se diferenciaram através da proporção entre as isoformas. SOUSA *et al.* (2011) avaliaram duas cepas de *B. subtilis* acerca do potencial em produzir lipopeptídeos a partir da glicerina, co-produto do biodiesel, como fonte de carbono. Os autores relataram que a cepa *B. subtilis* LAMI009 apresentou oito picos, relativos às isoformas da surfactina, dentro da mesma faixa de eluição da surfactina padrão. Já a cepa *B. subtilis* LAMI005 apresentou apenas seis picos principais, sob as mesmas condições de cultivo, indicando que o número de tipo de isoformas variou em função da linhagem de *B. subtilis* produtora de surfactina.

As diferenças estruturais das isoformas e as proporções entre elas conferem a este lipopeptídeo diversas propriedades, pois além de ser um tensoativo excelente, a surfactina apresenta propriedades fisiológicas importantes, como um inibidor da coagulação de fibrina (ARIMA *et al.*, 1968), e ações antimicrobiana e antitumoral (TSUKAGOSHI *et al.* 1970; KAMEDA *et al.* 1972), mostrando sua potencial aplicabilidade na medicina e na produção de fármacos.

Na família iturina, a iturina A destaca-se por sua elevada ação antifúngica e antibiótica (HSIEH, *et al.*, 2008). Sua estrutura foi elucidada por PEYPOUX, F. (1978) que relatou a estrutura da parte peptídica formada por sete aminoácidos, sendo o resíduo serina ligado ao ácido β -aminográxo através de uma ligação peptídica (Figura 2.2). Oito homólogos têm sido reportados na literatura que se diferenciam através do comprimento da cadeia carbônica e da presença de cadeias laterais (NORIYASU, SHAHEDUR e TAKASHI, 2009).

FIGURA 2.2 Estrutura da iturina A (NORIYASU, SHAHEDUR e TAKASHI, 2009).



2.2.2. Ácido Poly(γ -glutâmico) (γ -PGA)

γ -PGA consiste em um polímero aminoácido contendo unidades de ácido D,L-glutâmico produzido por várias linhagens de *Bacillus sp.* (URUSHIBATA, TOKUYAMA e TAHARA, 2002). Este polímero é solúvel em água, biodegradável, comestível além de apresentar várias aplicações industriais (BAJAJ e SINGHAL, 2011).

A utilização de glicerol como fonte de carbono para a produção de γ -PGA foi avaliada por XU *et al.* (2005). Nos estudos iniciais os autores realizaram um *screening* de cepas potencialmente produtoras de γ -PGA isoladas de amostras de solo. Foram selecionadas as cepas que apresentaram colônias altamente mucóides em meio de cultivo contendo 10,0 g/L glicose, 5,0 g/L extrato de levedura, 5,0 g/L de ácido glutâmico, 0,5 g/L KH_2PO_4 , 0,1 g/L MgSO_4 e 15,0 g/L de ágar e incubação a 37 °C por 48 horas. As cepas selecionadas foram inoculadas em meio basal contendo 20,0 g/L glicose, 20,0 g/L ácido glutâmico, 5,0 g/L extrato de levedura, 0,5 g/L KH_2PO_4 , 0,1 g/L MgSO_4 . Após incubação a 37 °C em mesa agitadora a 220 rpm durante 24 horas, selecionou-se a linhagem *B. subtilis* NX-2 como a melhor produtora de γ -PGA. Foram avaliadas dez fontes de carbono sobre a produção de γ -PGA, dentre estes cinco carboidratos (glicose, sacarose, maltose, lactose e amido), quatro ácidos orgânicos e glicerol a uma concentração de 30,0 g/L em meio basal suplementado com 30,0 g/L de ácido glutâmico. As fontes de carbono que apresentaram maior produção de γ -PGA por *B. subtilis* NX-2 foram glicose e sacarose (30,0 g/L), seguidas por glicerol, a partir do qual obteve-se 24,3 g/L deste polipeptídeo.

2.3. Produção de Lipopeptídeos a partir de *B. subtilis*: Efeito de Condições Nutricionais, Ambientais e Tipo de Processo

Estudos para a otimização da produção de surfactina tem sido realizados em frascos agitados, bem como em biorreatores operando em sistemas contínuos ou em batelada alimentada (COOPER *et al.* 1981; MULLIGAN e GIBBS 1990; LIN *et al.* 1994). O estudo da influência das condições nutricionais foi realizado desde então, com a finalidade de obter condições ótimas de produção de surfactina, já que estudos iniciais utilizando caldo nutritivo (peptona 5 g/L, extrato de carne 3 g/L) apresentaram baixa produtividade, cerca de 0,1 g/L de surfactina (ARIMA *et al.*, 1968). A avaliação de fontes de carbono e nitrogênio, bem como,

microelementos, como ferro e manganês mostrou grande influência sobre a biossíntese de surfactina. Dentre as fontes de carbono e nitrogênio estudadas, a glicose e o NH_4NO_3 apresentaram elevada produtividade (439 mg/L) de acordo com estudos realizados por COOPER *et al.* (1981) e DAVIS *et al.* (1999). Com relação à fonte de nitrogênio, o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ também foi eficiente para *B. subtilis* (FISHER, 1999). Além disso, fatores como temperatura, pH, agitação, aeração e cátions mono- e divalentes também têm sido variáveis de estudo na produção de biossurfactantes por contribuírem fortemente no crescimento de células microbianas, bem como na produção de lipopeptídeos.

O efeito da adição de cátions sobre a produção de surfactina por *B. subtilis* foi avaliada por COOPER *et al.* (1981). Os estudos foram conduzidos com a cepa *B. subtilis* ATCC 21332 em meio mineral com 4 % de glicose como fonte de carbono. Os autores avaliaram o efeito da suplementação do meio de cultivo com sais de ferro e manganês, caldo nutritivo, extrato de levedura, hexadecano, D,L-valina, D,L-leucina, D,L-ácido aspártico e ácido L-glutâmico. Obtiveram-se valores de 20 a 40 vezes a CMC (CMC^{-1}) nos cultivos com o meio mineral com 4 % de glicose, tensão superficial mínima de 27 mN/m e tensão interfacial contra hexadecano de 1 mN/m. A suplementação do meio contendo glicose com caldo nutritivo, extrato de levedura ou aminoácidos não aumentou a produção de biossurfactantes. A adição de hexadecano promoveu apenas maior crescimento celular, não influenciando a concentração de biossurfactantes. Os sais MnSO_4 , FeSO_4 e $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ promoveram grande aumento na produção de biossurfactantes, sendo que, os demais sais, MgSO_4 , CaCl_2 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaNO_3 , ZrOCl_2 não exerceram efeito no crescimento celular ou produção de surfactina. O aumento da concentração de FeSO_4 para $1,3 \times 10^{-3}$ M promoveu aumento de cinco vezes na concentração de surfactina. Acima dessa concentração não houve incremento significativo na produção de biossurfactante. Entretanto, o manganês teve o maior efeito sobre a produção do lipopeptídeo em cultivo realizado sem a adição de sais de ferro. A suplementação do meio apenas com MnSO_4 a uma concentração de 4×10^{-6} M promoveu aumento de CMC^{-1} para 240. Em outro estudo realizado por WEI e CHU (2002), cujo objetivo foi elucidar o efeito do manganês sobre a produção de surfactina, esse mesmo efeito foi verificado em cultivos com *B. subtilis* ATCC 21332, em que a concentração de surfactina aumentou de 0,33 g/L para 2,6 g/L quando adicionou-se 0,01 mM de íons Mn^{2+} .

A relação entre o metabolismo de nitrogênio, disponibilidade de oxigênio e biossíntese de surfactina foi estudada por DAVIS *et al.* (1999) em cultivos realizados em biorreator variando-se a concentração de oxigênio em meio de cultivo contendo NH_4NO_3 e glicose como fontes de nitrogênio e carbono, respectivamente. Os autores obtiveram maior produtividade

em cultivo realizado sob limitação de nitrato e de oxigênio, verificando que a produção melhorada de surfactina foi obtida durante a fase de consumo de nitrato sob condição anaeróbia.

O efeito de vários fatores que influenciam o crescimento celular e a produção de surfactina por *B. subtilis* MTCC 2423 foi avaliado por MAKKAR e CAMEOTRA (1999). Os cultivos conduzidos em frascos contendo 200 mL de meio mineral suplementado com sacarose como fonte de carbono a uma concentração de 2 % foram realizados a 45 °C e 200 rpm. KNO₃, NaNO₃ foram as melhores fontes de nitrogênio obtendo-se, aproximadamente, 2,3 g/L de surfactina bruta. A adição dos aminoácidos ácido aspártico, asparagina, ácido glutâmico, valina e lisina, separadamente ao meio de cultivo aumentou a produção de biossurfactante em até 60 %, relativamente ao experimento controle, sem a adição de aminoácidos. A adição de glicina e leucina não afetou a produção de biossurfactante. Alanina e arginina inibiram a produção de surfactina. Dentre os suplementos peptona, triptona, extrato de carne e extrato de levedura, apenas a peptona resultou no aumento da produção de surfactina. Os demais inibiram a produção deste lipopeptídeo. A análise da atividade tensoativa do meio de cultivo livre de células mostrou que o biossurfactante produzido por *B. subtilis* MTCC 2423 foi capaz de reduzir a tensão superficial do meio para 28,0 mN/m em pH 7,0. A solução de biossurfactante bruto, obtido por precipitação ácida, apresentou tensão superficial mínima de aproximadamente 30 mN/m, a uma concentração de 100 mg/mL.

REIS, SÉRVULO e FRANÇA (2004) avaliaram fontes de carbono de baixo custo e renováveis sobre a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 6633 em meio mineral suplementado com diferentes fontes de carbono. Foram avaliados açúcar comercial, caldo de cana de açúcar, melaço de cana de açúcar, glicerol, manitol, e óleo de soja. A produção de surfactina foi fortemente influenciada pela fonte de carbono. O açúcar comercial apresentou os melhores resultados obtendo-se tensão superficial equivalente a 28,7 mN/m, CMC⁻¹ = 78,6 após 48 horas de cultivo. A suplementação do meio de cultivo com metais traço e EDTA acarretou a redução da tensão superficial do meio para 27,1 mN/m. A utilização de extrato de levedura afetou apenas o crescimento celular.

ABDEL-MAWGOUD, ABOULWAFI e HASSOUNA (2008) conduziram estudos de otimização da produção de surfactina por *B. subtilis* BS5 a partir da avaliação do efeito de diferentes nutrientes e sua concentração e das condições ambientais em cultivos realizados em frascos agitados. Dentre as fontes de nitrogênio orgânicas e inorgânicas testadas, o NaNO₃ a uma concentração de 5 g/L constituiu a melhor fonte de nitrogênio para a linhagem testada. A adição de aminoácidos que constituem a porção peptídica da molécula de surfactina a uma

concentração de 0,1 mM em substituição ao NaNO_3 não promoveram aumento da produtividade do biossurfactante. A fonte de carbono que promoveu maior produção foi melação a uma concentração de 160 mL/L e os micronutrientes foram $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,16 g/L), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,27 g/L) e $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,017 g/L) atingindo-se uma concentração equivalente a 1,12 g/L de surfactina bruta (obtida através de precipitação ácida).

ROCHA *et al.* (2009) avaliaram o suco de caju clarificado como fonte de carbono e energia para a produção de biossurfactantes pela linhagem *B. subtilis* LAMI008. Os cultivos realizados em frascos agitados foram conduzidos a 30 °C e 180 rpm durante 18 horas em meio mineral suplementado com suco de caju a uma concentração final de 10 g/L de glicose (MM-CAJC) e 0,1 % de solução de micronutrientes. Os autores avaliaram a suplementação do meio com extrato de levedura a 5,0 g/L. A produção de biossurfactantes por *B. subtilis* LAMI008 foi estimulada por extrato de levedura, obtendo-se 21,4 % de redução da tensão superficial e índice de emulsificação com querosene equivalente a 65 % após 72 horas de cultivo.

A produção e caracterização estrutural da surfactina obtida a partir de *B. subtilis* LSFM-05 foi avaliada através de cultivos em biorreator de bancada com coleta de espuma em meio mineral suplementado com 5 % de glicerina bruta (FARIA *et al.*, 2011). A propagação do inóculo foi realizada em frascos contendo caldo nutritivo e incubado a 32 °C e 150 rpm durante 48 horas. Após este período, a cultura foi submetida à centrifugação e as células foram lavadas duas vezes com solução de NaCl 0,85 % e ressuspensas no meio mineral utilizado nos cultivos para produção de surfactina. A surfactina bruta foi determinada gravimetricamente através de precipitação ácida, lavagem e secagem do precipitado. O crescimento de *B. subtilis* LSFM-05 foi caracterizado com uma fase lag de 24 horas seguida por uma fase exponencial que foi completa após 48 horas do início do cultivo. A velocidade específica máxima de crescimento ocorreu entre 24 e 36 horas atingindo um valor de $0,24 \text{ h}^{-1}$. O consumo máximo de glicerol foi de 52 % com máximo entre 36 e 48 horas de cultivo. A produção de biossurfactante na espuma atingiu um valor máximo de 1,37 g/L a 60 horas de cultivo e a produção total de espuma atingiu um valor de 2,4 L com 48 horas de fermentação. A produtividade de biossurfactante correspondente à produção máxima de surfactina foi 11,42 mg/L.h. Obteve-se tensão superficial mínima equivalente a 29,5 mN/m em 36 horas de cultivo no sobrenadante livre de células. A capacidade emulsificante da solução do biossurfactante purificado a uma concentração de 1,0 g/L mostrou que a surfactina produzida por *B. subtilis* LSFM-05 foi mais eficiente do que os surfactantes SDS (DodecilSulfato de Sódio) e Triton X.

A caracterização estrutural do lipopeptídeo através de métodos espectroscópicos identificou a produção da variante Leu⁷-surfactina com 14 átomos de carbono.

O co-produto da produção do biodiesel, glicerina, foi avaliado como fonte de carbono e energia em cultivos realizados em frascos agitados com as cepas *B. subtilis* LAMI005 e *B. subtilis* LAMI009 (SOUSA *et al.*, 2011). Os ensaios fermentativos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio mineral suplementado com 0,4 % de extrato de levedura e 2 % de glicerina. A propagação do inóculo foi realizada em frascos contendo meio PGE (peptona 5,0 g/L, glicose 5,0 g/L e extrato de levedura 2,5 g/L) e incubados a 30 °C e 180 rpm durante 24 horas. O inóculo utilizado nos experimentos foi 1 % da cultura com densidade ótica ajustada entre 0,1 – 0,2. Os experimentos foram conduzidos em mesa agitadora a 30 °C e 180 rpm durante 72 horas. A produtividade de surfactina obtida a partir dos cultivos com *B. subtilis* LAMI005 foi 6,13 mg/L.h, superior à obtida com a cepa *B. subtilis* LAMI009, que foi 4,83 mg/L.h. A síntese de surfactina por *B. subtilis* LAMI005 não foi associada ao crescimento celular, contrariamente à síntese deste lipopeptídeo por *B. subtilis* LAMI009 que apresentou-se caracteristicamente como um metabólito primário. O consumo de glicerol após 72 horas de cultivo também foi diferente para as linhagens estudadas, atingindo 97 % no cultivo com a cepa *B. subtilis* LAMI005 e 53,6 % com *B. subtilis* LAMI009. A avaliação da eficiência do biosurfactante realizada no meio de cultivo livre de células apresentou CMC equivalente a 28,0 mg/L e 32,4 mg/L com as linhagens *B. subtilis* LAMI005 e *B. subtilis* LAMI009, respectivamente. Desta forma, a glicerina tem apresentado potencial para produção de biosurfactantes lipopeptídeos a partir de diferentes linhagens de *B. subtilis*.

2.4. Principais Genes envolvidos na Síntese dos Lipopeptídeos Surfactina e Iturina

Um dos genes identificado como responsável pela biossíntese de surfactina por *B. subtilis* ATCC21332, o gene *sfp*, foi caracterizado por NAKANO, MARAHIEL e ZUBER (1988). O gene *sfp*, um fragmento de 675 pb, é responsável pela expressão de enzimas pertencentes ao complexo enzimático surfactina sintetase e, portanto, relacionadas à biossíntese de surfactina (PEYPOUX, BONMATIN e WALLACH, 1999). HSIEH *et al.* (2004) relataram a técnica de PCR para detecção do gene *sfp* como uma forma rápida de identificação de linhagens de *Bacillus sp.* produtoras de surfactina.

Linhagens co-produtoras de surfactina e iturina tem sido relatadas na literatura (SANDRIN, PEYPOUX e MICHEL, 1990; HIRAOKA *et al.*, 1992). A identificação e caracterização dos genes responsáveis pela co-produção destes lipopeptídeos foi relatada por HUANG, ANO e SHODA (1993) e HIRAOKA *et al.* (1992). A identificação do gene *lpa-14* (lipopeptide antibiotic production) a partir da linhagem *B. subtilis* RB14, cuja sequência nucleotídica apresentou alta homologia com *sfp*, foi relatada por HUANG, ANO e SHODA (1993). De acordo com os autores, a biossíntese de iturina A e surfactina por aquela linhagem foi corregulada pelo gene *lpa-14*. Quanto à síntese de iturina, HSIEH *et al.* (2008) atribuíram a produção deste lipopeptídeo aos genes *ituD* e *lpa-14*. O gene *ituD* codifica a coenzima malonil A transacilase e o gene *lpa-14* codifica uma 4'-fosfopantetínil transferase. Ambas as enzimas estão envolvidas em etapas necessárias à síntese e maturação da iturina. Portanto, os autores mostraram que todas as espécies de *Bacillus* que apresentaram este par de genes foram produtoras de iturina (HSIEH *et al.*, 2008).

2.5. Produção de Ramnolipídeos por Bactérias do gênero *Pseudomonas*

A produção de ramnolipídeos tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores desde 1949 (JARVIS e JOHNSON, 1949) até os dias atuais (SILVA *et al.*, 2010). Desde então, várias cepas selvagens e cepas obtidas de Bancos de coleções de cultura de *P. aeruginosa* têm sido cultivadas com o objetivo de obter informações sobre o metabolismo da biossíntese de ramnolipídeos e a influência do metabolismo de nutrientes, como nitrogênio, fósforo e ferro, sobre a produção deste bioproduto. (MULLIGAN e GIBBS, 1989; GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; SILDATK *et al.* 1985; RAMANA e KARANTH, 1989; CHAYABUTRA *et al.*, 2001).

Vários autores (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; SANTA ANNA *et al.* 2002) apontam que uma limitação de nutrientes favoreceu a produção de ramnolipídeos, sendo geralmente, o nitrogênio o nutriente limitante utilizado. WU *et al.* (2008) verificaram este efeito em cultivo em frascos agitados de *P. aeruginosa* EM1 utilizando glicerol e NaNO₃ como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, obtendo uma razão C/N ótima equivalente a 52. CHEN *et al.* (2007) verificaram que a razão C/N ótima para a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* S2 foi 11.4 em fermentação em frascos agitados utilizando glicose e NH₄NO₃ como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente, valor este inferior ao reportado em dados da literatura (GUERRA-SANTOS *et al.*, 1984; SANTA ANNA *et al.* 2002). Assim,

pode-se verificar que o efeito da limitação de nutrientes sobre a biossíntese de ramnolipídeos é fortemente dependente da linhagem utilizada.

O efeito da fonte de nitrogênio exerce grande influência sobre o metabolismo e produção de ramnolipídeos por linhagens de *Pseudomonas*, mostrando o nitrato como fonte de nitrogênio preferencial (MULLIGAN e GIBBS, 1989; MANRESA *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 2010). Alguns autores (CHEN, 2005; MANRESA *et al.*, 1991) tem atribuído esse preferência a capacidade de linhagens de *Pseudomonas* em assimilar nitrato como aceptor final de elétrons em condições microaeróbias ou anaeróbias (CHEN, 2005). Esta hipótese foi confirmada por MANRESA *et al.* (1991) ao avaliarem a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas* 44T1 em óleo de soja como fonte de carbono e nitrato como fonte de nitrogênio, observando que a produtividade específica de ramnolipídeos aumentou com a diminuição da razão C/N, em cultivo em frascos agitados. Da mesma forma, em trabalho mais recente, PINZON-GAMEZ (2009) obteve aumento no crescimento celular e na produtividade de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* E03-40 e *P. aeruginosa* PAO1 em condição de fermentação denitrificante, utilizando aeração superficial e agitação magnética, empregando o glicerol como fonte de carbono.

Os modelos cinéticos utilizados na literatura para o estudo da cinética de processos fermentativos para a produção de biossurfactantes utilizam, geralmente, o modelo logístico para crescimento celular e, para a produção de ramnolipídeo, o modelo de Luedeking-Piret ou um modelo para produção de ácido lático proposto por MERCIER *et al.* (1992) (LIMA *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2006).

RODRIGUES *et al.*, (2006) utilizaram lactose para a produção de biossurfactante pelas linhagens *Lactococcus lactis* 53 e *Streptococcus thermophilus* A. Neste estudo os autores avaliaram o modelo proposto por MERCIER *et al.* (1992) para a produção de biossurfactante e o modelo logístico para crescimento celular obtendo bons ajustes para as cinéticas de ambos os microrganismos. LIMA *et al.* (2009) utilizaram o modelo de Luedeking-Piret para a modelagem da produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* PACL a partir de óleo de soja residual em reator tipo tanque agitado. Neste trabalho, o ramnolipídeo comportou-se como um metabólito primário, sendo o modelo capaz de descrever a cinética de biossíntese daquele metabólito. O crescimento celular foi modelado através da equação logística.

O uso de modelos mecanísticos para a cinética de crescimento de linhagens de *Pseudomonas* é bastante limitado, de acordo com os dados apresentados na literatura. A publicação de artigos que utilizam modelos como Monod, Tessier ou Contois, que apresentam parâmetros significativos para o processo bioquímico, para a cinética de processos

fermentativos de produção de biossurfactantes é bastante escassa. Como uma exceção, em artigo publicado em 2008, ANNUAR *et al.* (2008) avaliaram diversos modelos mecanísticos para o crescimento celular de *P. putida* durante o processo de produção de polihidroxicanoatos (PHA). Neste processo, como na maioria dos processos que envolvem a produção de biossurfactantes ou biopolímeros por linhagens de *Pseudomonas*, o nitrogênio foi o nutriente limitante. Assim, os autores acompanharam o consumo da fonte de nitrogênio, que foi utilizada como o substrato para o ajuste dos modelos mecanísticos. O modelo de Tessier, que considerou o efeito de inibição do amônio em elevadas concentrações, e o modelo de Luedeking-Piret foram capazes de prever com acuidade a cinética de crescimento celular, produção de PHA e o consumo de substrato da linhagem de *P. putida*.

O cultivo aeróbio de microrganismos produtores de compostos que apresentam elevada atividade superficial e interfacial acarreta uma formação intensa de espuma, que ocasiona, além de diversas dificuldades operacionais, a redução da produtividade por perda do produto e redução do volume de trabalho do biorreator. Desta forma, a eliminação da espuma torna-se necessária, sendo geralmente feita através da adição de anti-espumantes. Entretanto, anti-espumantes químicos possuem elevado custo e podem reduzir a taxa de transferência de oxigênio e exercer efeitos adversos sobre a fisiologia celular (DAVIS *et al.*, 2001).

A recuperação de biossurfactantes através do fracionamento em coluna de bolhas tem sido aplicada com sucesso para a concentração de compostos que apresentam características tensoativas, como proteínas e surfactantes (DAVIS *et al.*, 2001). Na aplicação para a remoção de biossurfactantes a partir de caldos fermentativos, este método tem sido alvo de diversas pesquisas (MAKKAR e CAMEOTRA, 2001; DAVIS *et al.*, 2001; HEYD *et al.*, 2007). Davis *et al.* (2001) avaliaram a recuperação de surfactina a partir de caldo fermentativo utilizando processo não integrado (com e sem células) e integrado ao estágio de cultivo. O emprego da coluna de bolhas e espuma mostrou ser um processo eficiente para a extração de surfactina, atingindo-se até 70 % de recuperação e enriquecimento equivalente a 50. No processo integrado ao cultivo celular, a taxa de formação da espuma apresentou-se altamente influenciada pela intensidade de agitação, influenciando o enriquecimento e a recuperação final do produto, cujos valores ótimos foram de 71 % e 62, respectivamente. O efeito da extração contínua de biossurfactante durante o processo fermentativo sobre a produtividade foi avaliado por MAKKAR e CAMEOTRA (2001). O experimento conduzido em biorreator tipo tanque agitado forneceu uma produção de surfactina 4,5 vezes maior do que a obtida em frascos agitados. Outro método de avaliação da extração contínua de surfactante microbiano foi proposto por HEYD *et al.* (2008). O processo consistiu de duas etapas utilizando o mesmo

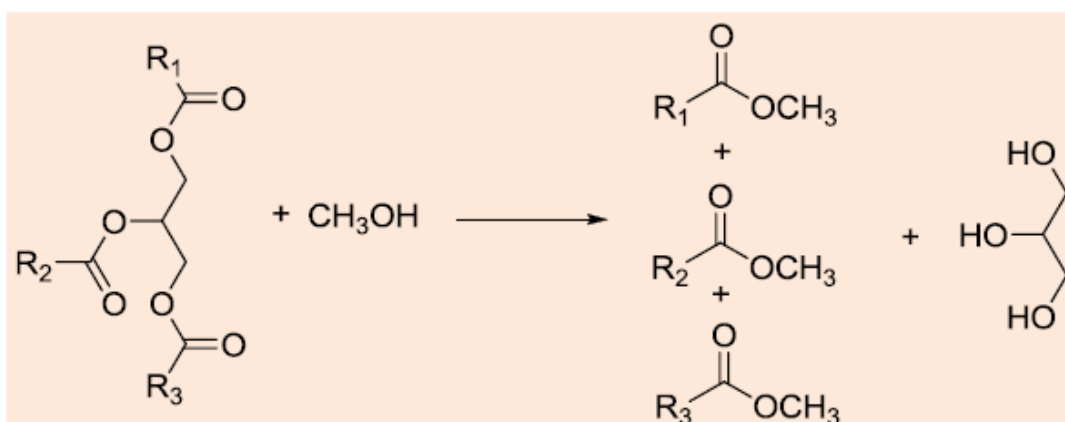
reator tipo tanque agitado inicialmente para produção de biomassa e posteriormente para a produção de ramnolípídeo com células de *P. aeruginosa* imobilizadas em um suporte contendo magnetita.

2.6. Glicerina: Co-produto da Produção de Biodiesel

Diversos setores das indústrias de cosméticos, saboaria, farmacêutico, alimentício, entre outros, empregam a glicerina como matéria-prima. São chamados de glicerina os produtos comerciais com aproximadamente 95% de glicerol, o 1,2,3-propanotriol, mas atualmente, com o aumento da produção de biodiesel em todo o mundo, uma fração com cerca de 80% de glicerol é normalmente denominada de glicerina loira ou bruta. A produção industrial de glicerol também pode advir de fontes fósseis. O processo mais comum envolve a cloração do propeno em alta temperatura para produzir o cloreto de alila, seguida de adição de ácido hipocloroso e tratamento em meio básico, fornecendo o glicerol como produto. Em função do aumento da produção mundial de biodiesel, esta rota de produção está sendo descontinuada havendo atualmente uma única planta em operação em todo o planeta (MOTA E PESTANA, 2011).

Estima-se que para cada 1.000 L de biodiesel produzidos pelo processo de transesterificação de óleos vegetais são gerados aproximadamente 100 kg de glicerina. A reação de transesterificação metílica, principal rota de obtenção do biodiesel (ésteres metílicos) e glicerina, está representada na Figura 2.3. A glicerina obtida neste processo apresenta diversas impurezas como água, catalisador alcalino, álcool não reagido, e ácidos graxos. Devido ao alto custo envolvido no processo de purificação da glicerina, uma alternativa é utilizá-la em processos que não necessitem alto grau de pureza.

FIGURA 2.3 Reação de transesterificação metílica (MOTA e PESTANA, 2011).



No Brasil, a quantidade de glicerina bruta gerada vem crescendo com o aumento da produção de biodiesel. A partir de 2008, a mistura de biodiesel puro (B100) ao óleo diesel passou a ser obrigatória (ANP, 2012). Entre janeiro e junho de 2008, a mistura de biodiesel puro (B100) ao óleo diesel foi de 2%, entre julho de 2008 e junho de 2009 foi de 3% e entre julho e dezembro de 2009 foi de 4%. A partir de 1º de janeiro de 2010, o biodiesel passou a ser adicionado ao óleo diesel na proporção de 5% em volume, conforme Resolução CNPE nº 6 de 16/09/2009.

Os dados da produção de biodiesel e de glicerina bruta são apresentados nas Figuras 2.4 e 2.5.

FIGURA 2.4 Dados da produção brasileira de biodiesel de 2005 a 08/2012. Fonte: ANP (2012)

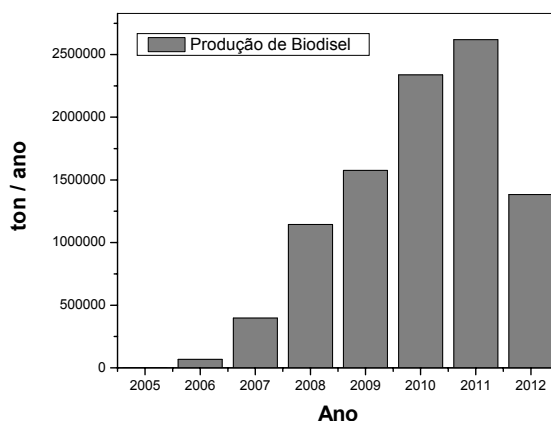
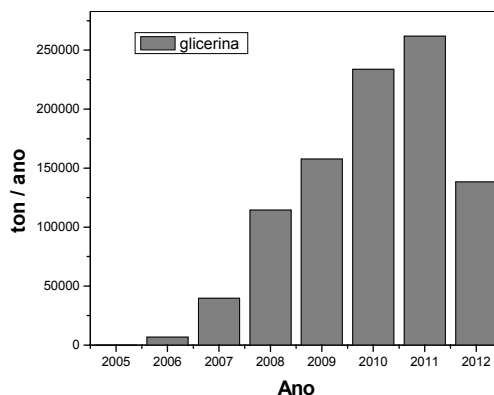


FIGURA 2.5 Dados da produção brasileira de glicerina estimada a partir da produção de biodiesel. Fonte: ANP (2012).



A Figura 2.6 ilustra o mapa com a localização das usinas de biodiesel autorizadas pela ANP a funcionar (dados atualizados até 2009).

FIGURA 2.6 Mapa com as usinas de biodiesel autorizadas a funcionar pela ANP no Brasil (atualizadas até 2009). Fonte: ANP(2012)



A Tabela 2.2 lista as empresas, sua localização e a capacidade instalada.

Tabela 2.2 Unidades produtoras de biodiesel instaladas no Brasil (até 2009).

Unidade Produtora	Localidade	Capacidade produtiva
Usibio	Sinop, MT	20 mil litros por dia, 6 milhões de litros por ano
Oleoplan	Veranópolis (RS)	600 mil litros por dia, 198 milhões de litros/ano
Brasil Biodiesel	Teresina (PI)	600 mil litros/ano
Brasil Ecodiesel	Iraquara (BA)	108 milhões de litros/ano
Brasil Ecodiesel	Cratêus (CE)	360 mil litros/dia, 108 milhões de litros/ano
Nutec	Fortaleza (CE)	2,4 mil litros por dia, 720 mil litros/ano
Comanche, Ex-Indústria Brasileira	Simões Filho (BA)	19,5 MM de litros/ano

de Resinas (IBR)		
Granol	Anapólis, GO	407 mil litros por dia, 122 milhões de litros por ano
Binatural	Formosa (GO)	84 mil litros/dia, 25,2 milhões de litros/ano
Soyminas	Cássia (MG)	40 mil litros por dia, 12 milhões de litros por ano
Fusermann	Barbacena (MG)	30 mil litros por dia, nove milhões de litros por ano
Renobras	Dom Aquino MT	20 mil litros por dia, 6 milhões de litros por ano
Barrálcool	Barra do Bugres (MT)	166 mil litros/dia, 50 milhões de litros/ano
DVH	Tailândia (PA)	35 mil litros/dia, 10,5 milhões de litros/ano
Brasil Ecodiesel	Florianópolis (PI)	270 mil litros/dia, 81 milhões de litros/ano
Biolix	Rolândia (PR)	30 mil litros/dia, 9 milhões de litros/ano
Fertibom	Catanduva, SP	40 mil litros por dia, 12 milhões de litros por ano
Granol (SP)	Campinas, SP	300 mil litros por dia, 90 milhões de litros por ano
Biocapital	Charqueada(SP)	824 mil litros/dia, 247,2 milhões de litros/ano
Dhayers	Taboão da Serra (SP)	7,8 milhões de litros/ano
Ponte di Ferro	Taubaté (SP)	27 MM litros/ano
Ouro Verde	Rolim de Moura, RO	17 mil litros por dia, 5 milhões de litros por ano
Ponte di Ferro	Ponte di Ferro (RJ)	48 MM litros/ano
Agrosoja	Sorriso (MT)	24 MM de litros por ano, 80 mil litros por dia
Caramuru	São Simão (GO)	112,5 MM de litros/ano, 375 mil litros por dia
Brasil Ecodiesel	Porto Nacional (TO)	108 MM litros/ano, 360 mil litros/dia
Brasil Ecodiesel	São Luís (MA)	108 MM litros por ano, 360 mil litros/dia.
Brasil Ecodiesel	Rosário do Sul (RS)	108 milhões de litros por ano, 360 mil litros por dia
Biocamp	Campo Verde (MT)	154 mil litros por dia, ou 46,2 milhões de litros por ano
Biopar	Rolândia (PR)	capacidade diária de 120 mil litros por dia, ou 36 milhões de litros por ano
KGB	Sinop, MT	5 mil litros por dia, 1,5 milhão de litros por ano
BSBIOS	Passo Fundo (RS)	345 mil litros por dia, ou 103,5 milhões de litros por ano

Bracol (ex-Bertin)	Lins (SP)	333 mil litros por dia ou 100 milhões de litros por ano
Frigol	Lençóis Paulistas (SP)	40 mil litros por dia, ou 12 milhões de litros por ano
Ambra	Varginha (MG)	2,4 mil litros por dia, ou 720 mil litros por ano (300 dias de operação)
Inovatti	Mairinque (SP)	30 mil litros por dia, 6,74 milhões de litros por ano
ADM	Rondonópolis, MT	Capacidade de 565 mil litros por dia e 169,5 milhões de litros por ano
Araguassú	Porto Alegre do Norte, MT	100 mil litros por dia, 30 milhões de litros por ano
Biopar Parecis	Nova Marilândia, MT	36 mil litros por dia, 10,8 milhões de litros por ano
Bioverde	Taubaté, SP	267,44 mil litros por dia, 80,2 milhões de litros por ano
Fiagril	Lucas do Rio Verde, MT	410 mil litros por dia, 123 milhões de litros por ano
CLV	Colíder, MT	100 mil litros por dia, 30 milhões de litros por ano
Cooami	Sorriso, MT	10 mil litros por dia, 3 milhões de litros por ano
Cooperbio	Lucas do Rio Verde, MT	10 mil litros por dia, 3 milhões de litros por ano
Granol (RS)	Cachoeira do Sul, RS	409 mil litros por dia, 122,7 milhões de litros por ano
Agrenco	Alto Araguaia, MT	660 mil litros/dia, 198 milhões de litros/ano
Amazonbio	Ji Paraná, RO	45 mil litros/dia, 13,5 milhões de litros/ano
Big Frango	Rolândia, PR	40 mil litros/dia, 12 milhões de litros/ano
Biotins	Paraíso do Tocantins, TO	27 mil litros/dia, 8,1 milhões de litros/ano
Cesbra	Volta Redonda, RJ	60 mil litros/dia, 18 milhões de litros/ano
Comandolli	Rondonópolis, MT	10 mil litros por dia, 3 milhões de litros por ano
Coomisa	Sapezal, MT	12 mil litros por dia, 3,6 milhões de litros por ano
Cooperfeliz	Feliz Natal, MT	10 mil litros por dia, 3 milhões de litros por ano
Agropalma	Belém, PA	80 mil litros por dia, 24 milhões de litros por ano
SSIL	Rondonópolis, MT	5 mil litros por dia, 1,5 milhão de litros por ano

Vermoehlen	Rondonópolis, MT	5 mil litros por dia, 1,5 milhão de litros por ano
Bio Óleo	Cuiabá, MT	10 mil litros por dia, 3 milhões de litros por ano
Biominas	Araxá, MG	30 mil litros por dia, 9 milhões de litros por ano
Tauá	Nova Mutum, MT	100 mil litros por dia, 30 milhões de litros por ano
Petrobras (BA)	Candeias, BA	57 milhões de litros por ano
Abdiesel	Araguari (MG)	2,16 milhões de litros/ano
Biocar	Dourados (MS)	10,8 milhões de litros/ano
Bionorte	São Miguel do Araguaia (GO)	29,4 milhões de litros/ano
Caibiense	Rondonópolis (MT)	5,4 milhões de litros/ano
Petrobras (MG)	Montes Claros (MG)	57 milhões de litros por ano
Petrobras (CE)	Quixadá (CE)	57 milhões de litros por ano
SPBio	Sumaré (SP)	10 milhões de litros por ano

Fonte: ANP(2012).

Em 2005, o preço médio da glicerina era de R\$ 3,00 / kg. Dois anos depois caiu para valores entre R\$ 1,60 e R\$ 1,70 / kg. Nas regiões onde usinas de biodiesel estão instaladas este valor chegou a R\$ 0,60 a R\$ 0,70 / kg (BIODIESELBR, 2011). A maioria das plantas industriais de biodiesel não valoriza efetivamente a glicerina. A glicerina obtida na produção de biodiesel possui impurezas como água, catalisador alcalino, álcool não reagido, e ácidos graxos, entre outros compostos. Como o processo de purificação da glicerina é bastante oneroso, é interessante que a glicerina seja utilizada em processos que não dependam de alto grau de pureza (MOTA E PESTANA, 2011). Assim, as rotas biotecnológicas de aproveitamento de glicerina têm sido bastante exploradas a fim de obter bio-produtos de alto valor agregado (PAPANIKOLAOU *et al.*, 2002; ASHBY, *et al.*, 2005; ASHBY, SOLAIMAN e FOGLIA, 2006; SOUSA *et al.*, 2011). Tais estudos apontam como principais bio-produtos a partir da conversão microbiana da glicerina o 1,3-propanodiol, etanol, ácidos orgânicos, polihidroxicanoatos, ácido graxo poliinsaturado ômega-3 e biossurfactantes (RIVALDI, *et al.*, 2007; AMARAL, *et al.*, 2009). No Brasil, estão sendo realizados estudos sobre diversas rotas de bioconversão da glicerina por bactérias, leveduras e fungos, tais como, produção de corantes naturais por *Monascus ruber*, biossíntese de ramnolípideos por *P. aeruginosa*,

seleção de cepas de *B. subtilis* com potencial para produção de lipopeptídeos, seleção de leveduras com potencial para a produção de etanol utilizando glicerol como única fonte de carbono e energia, produção de lipases por linhagens de *Bacillus*, produção via rota fermentativa de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* e produção de 1,3-propanodiol (RIVALDI *et al.*, 2007). Desta forma, observa-se o grande potencial de utilização do glicerol em diversos processos microbianos, bem como, os avanços nacionais em investimentos científicos para aprimorar o conhecimento de novas tecnologias para o aproveitamento deste co-produto.

Dentro deste panorama, o presente trabalho teve como finalidade apresentar a viabilidade da bioconversão de glicerina, um co-produto, em produtos de alto valor agregado, como os biossurfactantes, a partir de novas linhagens isoladas de amostras ambientais no Estado do Ceará e potencialmente produtoras de bioemulsificantes eficientes.

3. Material e Métodos

3.1. Caracterização da Matéria-Prima

A matéria-prima utilizada, glicerina, foi tratada por hidrólise ácida (item 3.2) e caracterizada quanto à presença de macro e microelementos. Durante a realização dos ensaios foi utilizado um lote de glicerina fornecido pela Empresa Brasileira de Bioenergia (EBB-NUTEC, Fortaleza, CE). A metodologia utilizada encontra-se descrita em SOUSA (2008). Os microelementos cobre, ferro, manganês, zinco, cálcio e magnésio foram analisados por absorção atômica em equipamento Perkin Elmer Analyst 300 (LEAL *et al.*, 2007). Enxofre e fósforo foram analisados por espectrofotometria de UV-visível em espectrofotômetro 600 plus (LEAL *et al.*, 2007). Todas as análises foram realizadas na EMBRAPA Agroindústria Tropical.

3.2. Hidrólise Ácida da Glicerina

A glicerina bruta, co-produto da transesterificação do óleo de soja, foi submetida à hidrólise ácida, à temperatura ambiente, com H₂SO₄ concentrado (98 %). Em seguida, foi transferida para funil de separação, permanecendo em repouso durante 24 horas, para permitir a separação das fases, denominadas de glicerínica e ácido graxo. A fase glicerínica, que continha a glicerina, foi utilizada como fonte de carbono e energia na formulação do meio de cultivo para fermentação.

3.3. Microrganismos

Foram avaliadas neste trabalho duas cepas isoladas a partir de diferentes ambientes. A linhagem de *Bacillus* pertence a um conjunto de cepas de *Bacillus* isoladas a partir da Estação de Tratamento de Efluentes da Universidade Federal do Ceará (Fortaleza, CE). O *B. subtilis* LAMI009 foi previamente selecionado, dentre as cepas isoladas, como potencial produtor de surfactina utilizando glicerina como fonte de carbono (SOUSA, 2011). Sua taxonomia é definida pela informação contida no gene ribossomal 16S rRNA e esta encontra-se depositada no Genbank com número de acesso FJ413049. A cepa *Pseudomonas aeruginosa* MSIC02 foi

isolada a partir de um solo contaminado por petróleo no litoral cearense. Sua sequência de rRNA 16S foi depositada no GenBank com o número de acesso FJ876297. A cepa *P. aeruginosa* foi mantida sob refrigeração a 4 °C em ágar nutriente (peptona 5,0 g/L; extrato de carne 3,0 g/L; ágar 15,0 g/L) e repicada mensalmente. Os métodos de preservação da cultura de *B. subtilis* LAMI009 estão descritos nos itens 3.5.1.1 e 3.5.2.1.

3.4. Ensaio realizado com *P. aeruginosa* MSIC02

3.4.1. Propagação do Inóculo

A linhagem *P. aeruginosa* MSIC02 foi transferida a partir da cultura estoque para uma placa de petri contendo agar nutritivo e incubada a 35.5 °C durante 24 horas. Após esse período, três alças foram transferidas para 50 mL de caldo nutritivo (extrato de carne, 3 g / L, peptona 5 g / L) contido em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Este foi mantido sob agitação de 150 rpm a 30 °C durante 18 horas em mesa incubadora rotativa (Rocha *et al.* 2007). Então, a densidade ótica foi determinada a 600nm em espectrofotômetro (Spectronic® 20 GENESYS) e ajustada, se necessário, para 1.25.

3.4.2. Condições de Cultivo e Estudo Cinético em Frascos Agitados

Os cultivos foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de meio. Os frascos foram incubados em mesa incubadora rotativa a 150 rpm e 37 °C durante 72 horas. A composição do meio foi (g/L): KH₂PO₄ 8.43, MgSO₄.7H₂O 0.2 e pH 7.0. A Tabela 3.1 mostra as concentrações de NaNO₃ e de glicerol e as correspondentes razões C/N. O tamanho do inóculo foi 2 % (v / v) para todos os experimentos. Alíquotas foram retiradas a intervalos de 0, 5, 8, 24, 48, 72 horas, e seguiram para as determinações analíticas de densidade ótica, glicerol, ramnose e pH. Os experimentos foram conduzidos em duplicata.

Tabela 3.1 Concentrações de NaNO₃ e glicerol utilizadas para o estudo cinético.

NaNO ₃ (g/L)	Glicerol (g/L)	Razão C/N
1,0	42,0	86
1,45		59
2,40		36
4,0		21
4,0	24,0	12

O cálculo da razão C/N foi baseado na determinação da quantidade de carbono na fórmula química do glicerol (C₃H₈O₃), correspondente a 39,1 %, e na quantidade de nitrogênio na fórmula química do NaNO₃, equivalente a 19,2 %. Assim, calculou-se as concentrações de carbono e de nitrogênio multiplicando-se as proporções percentuais pelas respectivas concentrações de glicerol e de nitrato de sódio.

3.4.3. Ensaios Fermentativos em Biorreator Tipo Tanque Agitado

Os ensaios fermentativos foram conduzidos em biorreator tanque agitado seguindo a configuração apresentada na Figura 3.1 (Yeh *et al.*, 2006). O equipamento utilizado para estes ensaios foi biorreator de bancada (4 litros de volume útil) automatizado (Marconi, Piracicaba, SP). Foram realizados dois ensaios, sendo um com reciclo de células e coleta de espuma e outro apenas com coleta da espuma, sem o reciclo de células. Utilizou-se inoculo de 10 % (v/v), pH 7,0, controlado durante o experimento, e temperatura de 37°C. Utilizaram-se as concentrações de carbono e nitrogênio que apresentaram maior produtividade de ramnolípido nos cultivos realizados em frascos agitados, sendo 2 % de glicerina (p/v) e 4 g/L de NaNO₃. A vazão de ar e a agitação foram variadas de acordo com a taxa de formação de espuma para cada experimento. Para o acompanhamento cinético foram retiradas amostras periodicamente do biorreator as quais foram submetidas aos métodos analíticos descritos no item 3.6.

3.5. Ensaios realizados com *B. subtilis* LAMI009

3.5.1. Ensaios em Biorreator Tanque Agitado

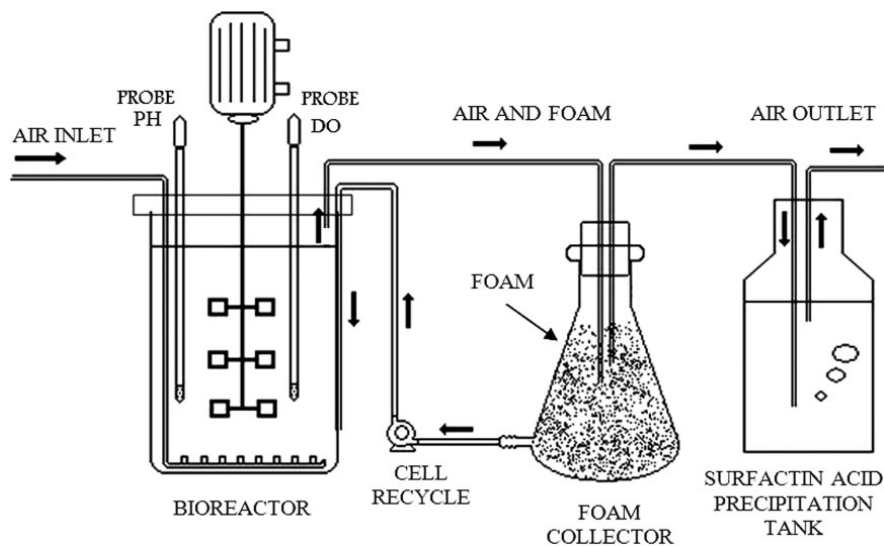
3.5.1.1 Propagação do Inóculo

A cepa, preservada em ultrafreezer a -80 °C em meio PGE (peptona 5,0 g/L, glicose 5,0 g/L e extrato de levedura 2,5 g/L) acrescido de glicerol a uma concentração final de 30 %, foi ativada em placa de Petri contendo o mesmo meio e incubada a 30 °C durante 18-20 horas em estufa bacteriológica. Em seguida, foram transferidas três alçadas para 100 mL de meio PGE contido em frasco de Erlenmeyer de 500 mL. Este foi mantido sob agitação de 180 rpm a 30 °C durante 18-20 horas. A densidade ótica da cultura foi determinada, após este período, e padronizada para 2,0 através de ajuste com o mesmo meio de propagação, se necessário.

3.5.1.2. Ensaios Fermentativos

Os ensaios fermentativos conduzidos em biorreator tanque agitado seguiram a configuração apresentada na Figura 3.1 (YEH *et al.*, 2006). O biorreator utilizado para estes ensaios foi biorreator de bancada (4 litros de volume útil) automatizado (Marconi, Piracicaba, SP). Utilizou-se inóculo de 10 % (v/v), pH 7,0 (controlado durante o experimento) e temperatura de 30°C. A vazão de ar e a agitação foram variadas de acordo com a taxa de formação de espuma para cada experimento.

FIGURA 3.1 Representação esquemática da configuração do biorreator utilizado nos experimentos.



O meio de cultivo utilizado foi proposto por MORÁN *et al.* (2000), cuja composição encontra-se descrita nas Tabelas 3.2 e 3.3.

Tabela 3.2 Composição do meio de cultivo.

Nutriente	Concentração (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	7,2
KH_2PO_4	3,0
NaCl	2,7
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,6
Solução de micronutrientes	0,1 %

MORÁN *et al.*, 2000

O meio mineral foi esterilizado a 121 °C durante 15 minutos, com exceção do $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, que foi esterilizado separadamente, sob as mesmas condições, para evitar a precipitação de sais.

Tabela 3.3 Composição da solução de micronutrientes.

Micronutriente	Composição (g/L)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10,95
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,54
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,39
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0,17
EDTA	2,5

MORÁN *et al.*, 2000

Avaliou-se as concentrações de glicerina 2 % (p/v) e glicose 10,0 g/L como fontes de carbono e energia.

Para o acompanhamento cinético foram retiradas amostras periodicamente do biorreator as quais foram submetidas aos métodos analíticos descritos nos itens subsequentes.

3.5.2. Ensaio Fermentativos em Frascos Agitados

3.5.2.1. Propagação do Inóculo

A cepa foi mantida sob refrigeração a 5 °C em meio APGE (ágar 15,0 g/L, peptona 5,0 g/L, glicose 5,0 g/L e extrato de levedura 2,5 g/L) e repicada periodicamente. Para esta etapa, foi desenvolvido um protocolo de ativação/propagação do inóculo. A ativação do microrganismo, a partir da cultura-estoque, foi realizada em placa de Petri contendo o mesmo

meio utilizado no ensaio fermentativo, suplementado com extrato de levedura. A placa foi incubada a 30 °C durante 18 horas em estufa bacteriológica. Após este período, foram transferidas três alçadas para 50 mL de meio de fermentação suplementado com extrato de levedura contido em frasco de Erlenmeyer de 250 mL. Os meios foram suplementados com 0,1 % de solução de micronutrientes (Tabela 3.3). Este foi incubado em mesa agitadora a 180 rpm e 30 °C durante 18-20 horas. A densidade ótica da cultura foi determinada, após este período, e padronizada para 2,0 através de ajuste com o mesmo meio, se necessário.

3.5.2.2 Ensaio Fermentativos

Os ensaios fermentativos foram realizados, inicialmente, em meio proposto por MORÁN *et al.* (2000) (Tabela 3.2). Os cultivos em frascos agitados foram realizados em mesa incubadora rotativa a 30 °C e 180 rpm durante 48-72 horas, em duplicata. Utilizou-se 10 % (v/v) inóculo. Amostras foram retiradas em intervalos regulares para avaliação do crescimento celular, produção de lipopeptídeo, consumo de glicerol, consumo de NH₄, pH, redução da tensão superficial e capacidade emulsificante. Os demais ensaios seguiram as mesmas condições de incubação.

3.5.2.3. Avaliação de Fontes de Nitrogênio

Ensaio foram conduzidos com diferentes fontes de nitrogênio. Foram avaliados como fontes de nitrogênio, além do (NH₄)₂SO₄, o NH₄NO₃ e o NaNO₃ no meio de cultivo proposto por MORÁN *et al.* (2000) (Tabela 3.2) mantendo-se a mesma razão C/N do meio original.

3.5.2.4. Avaliação da concentração de (NH₄)₂SO₄

O estudo da variação da concentração de N-amônio foi realizado através de ensaios cinéticos com o meio proposto por MORÁN *et al.* (2000) (Tabela 3.2), como descrito no item 3.5.2.2. Para tanto, variou-se a concentração de (NH₄)₂SO₄ de 1,0 g/L a 3,7 g/L.

3.5.2.5. Avaliação da Suplementação com Extrato de Levedura

A suplementação com extrato de levedura foi avaliada em dois meios distintos. Meio proposto por MORÁN *et al.* (2000) (Tabela 3.2), suplementado com 5,0 g/L de extrato de levedura e o meio proposto por SAR e ROSEMBERG (1983), descrito na Tabela 3.4. Ambos

os meios de fermentação foram suplementados com 0,1 % de solução de micronutrientes (Tabela 3.3).

Tabela 3.4 Composição do meio de cultivo SAR e ROSEMBERG (1983).

Nutriente	Concentração (g/L)
K_2HPO_4	13,99
KH_2PO_4	6,0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
$(NH_4)_2SO_4$	4,0
Extrato de levedura	0,4

O efeito da concentração do extrato de levedura e da solução de micronutrientes foi avaliado no meio proposto por SAR e ROSEMBERG (1983), utilizando 0,8 g/L de extrato de levedura e 0,2% de solução de micronutrientes. Com base na análise dos dados de produção de lipopeptídeo, selecionou-se o meio de cultivo proposto por MORÁN *et al.* (2000) suplementado com 5,0 g/L de extrato de levedura, para os demais experimentos.

3.5.2.6. Avaliação do Tamanho do Inóculo

O estudo do tamanho do inóculo foi realizado com as seguintes concentrações: 0,5 %, 2,0 % e 10,0 %. As concentrações foram selecionadas de acordo com dados da literatura (ABDEL-MAWGOUD, ABOULWafa e HASSOUNA, 2008). O inóculo de 2,0 % foi selecionado, de acordo com a análise da produtividade de lipopeptídeos, para a realização dos ensaios subsequentes.

3.6. Métodos Analíticos

3.6.1 Determinação de Glicerol

A concentração de glicerol foi determinada a partir do kit enzimático para análise de triglicerídeos (marca Katal[®], Fortaleza, CE). O princípio do método é quantificar o teor de glicerol através da enzima glicerolquinase. A metodologia consistiu em misturar 10 µL de amostra e 1 mL do reativo enzimático em um tubo de ensaio. Este foi incubado em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. Após este período, a absorbância da amostra foi determinada a 505 nm em espectrofotômetro UV-VIS. A curva padrão foi obtida com soluções de glicerol PA na faixa de concentração de 0,05 a 0,80 g/L.

3.6.2 Determinação de Glicose

Glicose foi determinada através de kit enzimático (marca Laborlab[®], Guarulhos, SP). Este se baseia no método enzimático GOD-POD (glicose oxidase e peroxidase) para quantificação da glicose. A metodologia consistiu em misturar 10 µL de amostra e 1 mL do reativo enzimático em um tubo de ensaio. Este foi incubado em banho-maria a 37 °C durante 10 minutos. Após este período, a absorbância da amostra foi determinada em comprimento de onda de 500 nm em espectrofotômetro UV-VIS. A curva padrão foi obtida com soluções de glicose PA na faixa de concentração de 0,1 a 1,0 g/L.

3.6.3 Determinação do crescimento celular

O crescimento celular foi realizado por medidas de densidade ótica em comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro UV-VIS. A curva de calibração foi obtida de acordo com metodologia descrita por BENINCASA (2000). A cepa utilizada foi cultivada em meio PGE (5,0 g/L glicose, 5,0 g/L peptona, 2,5 g/L extrato de levedura) sob agitação de 180 rpm a 30 °C durante 72 horas. Em seguida, o caldo fermentado foi centrifugado a 10.000-g durante 10 minutos, e a biomassa obtida foi submetida a três lavagens com água. A biomassa foi transferida para um cadinho previamente pesado e prosseguiu a secagem em estufa a 60 °C até peso constante. Prepararam-se suspensões padrão através de diluições seriadas e determinou-se a absorbância em comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro UV-VIS.

3.6.4 Determinação de N-amônio

Utilizou-se um kit enzimático para análise de uréia (marca Katal, Fortaleza, CE). O método baseia-se na reação de Berthelot modificada para determinação de íons amônio cuja reação com salicilato, hipoclorito e nitroprussiato produz o corante azul de indofenol com máximo de absorvância em 600nm. A fim de evitar o efeito de interferentes, a etapa relacionada à hidrólise enzimática da uréia foi excluída. Para tanto, adicionou-se 1 mL da solução tampão de uso, 1 mL do reagente de cor de uso e 10 µL da amostra a um tubo de ensaio. Após incubação a 37 °C durante 10 minutos em banho-maria determinou-se a absorvância a 600nm em espectrofotômetro de UV-VIS. A curva-padrão foi obtida com (NH₄)₂SO₄ como padrão, em faixa de concentração de 0,1 a 4,0 g/L.

3.6.5 Determinação de Lipopeptídeos

Uma alíquota de 20 mL de meio de cultivo livre de células foi submetida à acidificação (pH 2,0) com HCl 3M. Após refrigeração por 24 horas, o meio acidificado foi centrifugado a 10000rpm durante 15 minutos a 4 °C e o precipitado foi dissolvido em água deionizada a pH 8. Em seguida, realizou-se extração líquido-líquido com diclorometano. O extrato obtido após evaporação do solvente foi dissolvido em 2 mL de metanol e seguiu para determinação por cromatografia líquida de alta eficiência. As condições de análise foram: fase móvel (80% de acetronitrila e 20% de solução de ácido trifluoroacético 3,8 mM) a uma vazão de 1 mL/min, detector UV a 205 nm e volume de injeção de 20 µL. A curva de calibração foi realizada com surfactina padrão Sigma, em faixa de concentração de 0,2 mg/mL a 1,0 mg/mL. A determinação do cromatograma da iturina foi realizada sob as mesmas condições, utilizando-se como padrão uma solução de iturina padrão Sigma contendo 0,2 mg/mL.

3.6.6 Determinação de Ramnose

A determinação de ramnose, uma forma direta de quantificação de ramnolipídeos, foi realizada através do método orcinol-sulfúrico, descrito por Pham *et al.* (2004). A solução de orcinol, a 0,19 % (p/v), foi preparada dissolvendo este reagente em uma solução de ácido sulfúrico a 53 % (v/v). O método consistiu em adicionar 0,9 mL desta solução a uma alíquota de 0,1 mL de amostra, seguido de aquecimento a 80 °C durante 30 minutos. Após este período, o meio reacional permaneceu em repouso durante 15 minutos, determinou-se a

absorbância em espectrofotômetro UV-VIS a 421 nm. A curva padrão foi obtida com soluções de ramnose com concentrações conhecidas, entre 5 e 50 mg/L.

3.7. Caracterização do Biosurfactante

3.7.1 Tensão Superficial

A tensão superficial, uma medida indireta da produção de biosurfactantes, foi determinada no meio livre de células utilizando um Tensiômetro (Krüss K6) a 25 °C. As medidas foram realizadas em triplicata.

3.7.2 Índice de Emulsificação

A capacidade emulsificante foi avaliada através do método de COOPER e GOLDEMBERG (1987). À um tubo de fundo chato, adicionaram-se 2 mL de solução aquosa de biosurfactante ou meio de cultivo livre de células e 2 mL de substância hidrofóbica. Foram avaliados querosene e N-hexadecano. O tubo foi submetido à agitação em velocidade máxima em agitador tipo vortex durante 2 minutos. Após agitação, o tubo permaneceu em repouso durante 24 horas. O índice de emulsificação (E_{24}) foi determinado pela razão entre a altura da fase emulsionada e a altura do volume total, de acordo com a equação (3.1), proposta por WEI *et al.* (2005).

$$IE_{24}(\%) = \frac{H_{FE}}{H_{total}} \cdot 100 \quad (3.1)$$

3.8. Pesquisa do Gene *sfp*

A metodologia seguiu a descrita em BARRETO (2011). O DNA genômico do isolado foi amplificado com os primers *sfp*-F (5'-ATGAAGATTTACGGAATTTA-3') e *sfp*-R (5'-TTATAA AAGCTCTTCGTACG-3') usando a seguinte programação da PCR: desnaturação a 94 °C por 30 segundos; 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 46 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 min, e 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%, marcado com SYBR-*Safe DNA* em

0,5X TBE (Invitrogen). A cepa *B. subtilis* LAMI008, reconhecidamente produtora de surfactina (BARRETO *et al.*, 2010), foi utilizada como controle positivo.

3.9. Pesquisa do Gene *ituD*

O gene *ituD* foi identificado mediante metodologia descrita em BARRETO (2011). Para esta análise, o DNA genômico foi amplificado com dois pares de iniciadores: *ituD*-F (5'-ATG AAC AAT CTT GCC TTT TTA-3') e *ituD*-R (5'-TTA TTT TAA AAT CCG CAA TT-3'). A reação de amplificação obedeceu à seguinte sequência: desnaturação a 94 °C por 30 segundos; 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 1 min e extensão a 72 °C por 1,5 min, e 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%, marcado com *SYBR™ Safe DNA*. Para a região amplificada o tamanho das bandas foi de 1203 pb (HSIEH *et al.*, 2008).

3.10. Cálculo dos Parâmetros Fermentativos

A produtividade volumétrica de biomassa (P_X), expressa como $\text{mg}_X \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, foi calculada a partir da equação (3.2).

$$P_X = \frac{X_{\max} - X_0}{t} \quad (3.2)$$

onde: X_{\max} e X_0 são os valores máximo e inicial da concentração de biomassa, respectivamente, e t o tempo necessário para atingir X_{\max} .

A produtividade volumétrica de lipopeptídeo (P_B), expressa como $\text{mg}_P \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, foi calculada de acordo com a equação (3.3).

$$P_B = \frac{P_{\max} - P_0}{t} \quad (3.3)$$

onde: P_0 e P_{\max} são as concentrações inicial e máxima de lipopeptídeo, respectivamente, e t o tempo necessário para atingir P_{\max} .

Os fatores de conversão de substrato em biomassa e biomassa em produto foram calculados a partir das equações (3.4) e (3.5).

$$Y_{XS} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3.4)$$

$$Y_{PX} = \frac{P}{X - X_0} \quad (3.5)$$

As velocidades específicas de crescimento celular (μ_x), formação de biossurfactante (μ_p) e consumo de substrato (μ_s) foram expressas, respectivamente, como h^{-1} , $g_p/g_x \cdot h$ e $g_s/g_x \cdot h$, respectivamente, e determinadas segundo as definições abaixo (Equações 3.6 a 3.8):

$$\mu_x = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3.6)$$

$$\mu_p = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad (3.7)$$

$$\mu_s = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt} \quad (3.8)$$

A velocidade específica de crescimento na fase exponencial foi determinada a partir dos dados experimentais de acordo com a definição, para processo batelada, equação (3.9).

$$\frac{dX}{dt} = \mu_x \cdot X \quad (3.9)$$

onde:

μ_x velocidade específica de crescimento celular (h^{-1})

A partir da integração da equação (3.9), entre o início da fase exponencial (t_i) e um instante t arbitrário (SCHMIDELL, 2001), obteve-se a equação (3.10).

$$\ln\left(\frac{X}{X_i}\right) = \mu_{\max} \cdot (t - t_i) \quad (3.10)$$

onde:

μ_{\max} velocidade específica máxima de crescimento celular (h^{-1})

3.11. Modelagem Cinética do Crescimento Celular, Consumo de Substrato e Formação de Produto

O crescimento celular foi modelado matematicamente empregando modelo logístico, equação (3.11).

$$\mu_X = \mu_{\max} \cdot \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) \quad (3.11)$$

onde:

X_{\max} – concentração de biomassa na fase estacionária de crescimento (g/L)

Para a modelagem da produção de biossurfactante foram avaliados dois modelos: o modelo de Luedeking-Piret (1959) (equação 3.12) e o modelo proposto por Mercier *et al.* (1992) (equação 3.13):

$$\mu_p = \alpha \cdot \mu_X + \beta \quad (3.12)$$

onde: μ_p - velocidade específica de formação do produto (h^{-1})

α – parâmetro relacionado ao metabolismo primário (gp/gX)

β – parâmetro relacionado ao metabolismo secundário (gp/gX/h)

$$\frac{dP}{dt} = P_r \cdot P \cdot \left(1 - \frac{P}{P_{\max}}\right) \quad (3.13)$$

onde: P_r – razão entre a taxa volumétrica inicial de formação do produto (r_p) e a concentração inicial de produto P_0 (g/L)

P_{\max} – concentração máxima de produto (g/L)

O comportamento do consumo de glicerol foi descrito considerando-se que este foi consumido apenas para crescimento celular (BIEBL *et al.*, 1999). A equação (3.14) apresenta o balanço de massa para o processo descontínuo que foi utilizado.

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (3.14)$$

O conjunto de dados utilizados para modelagem foram os obtidos a partir dos ensaios descritos no item 3.4.2. Esses modelos foram ajustados aos dados experimentais usando o método de regressão não-linear seguindo o procedimento de Marquardt (MARQUARDT, 1963) com 95 % de intervalo de confiança, a partir de algoritmo implementado em Fortran. O ajuste dos modelos foi avaliado a partir do desvio padrão dos parâmetros.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização da Matéria-Prima

Foi realizada a caracterização química da glicerina tratada, após hidrólise ácida (ver item 3.2), cujos dados estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 Caracterização de macro e microelementos da glicerina tratada resultante da transesterificação do óleo de soja.

Elementos	Concentração (mg/kg)
Ferro	6,6
Zinco	ND
Cobre	ND
Manganês	ND
Cálcio	4,2
Magnésio	1,2
Enxofre	160,0
Fósforo	193,3
Sódio	4.987,5
Potássio	2.312,5

O teor de enxofre na glicerina pode ser atribuído à grande formação de sulfato de sódio, resultado da reação entre os sais de ácido graxo (sabões) e o H_2SO_4 , durante a hidrólise ácida. O elevado teor de sódio deve ter sua origem na etapa de formação do catalisador da reação de transesterificação, o metóxido de sódio, que é obtido através da adição de NaOH na mistura reacional para a obtenção dos ésteres metílicos.

Os resultados mostraram que a glicerina contém importantes micronutrientes para o crescimento microbiano e produção de biossurfactantes, tais como fósforo (193,3 ppm) e ferro (6,6 ppm) (Tabela 4.1) (SYLDATK *et al.*, 1985; BENINCASA *et al.*, 2002). O efeito da suplementação, bem como da concentração, de cátions multivalentes, como magnésio, cálcio, ferro e manganês, sobre o crescimento celular e produção de surfactina foi avaliado por alguns autores (ABDEL-MAWGOUD, ABOULWafa e HASSOUNA, 2008; MAKKAR e CAMEOTRA, 2002; SEN., R., 1997) que observaram um aumento tanto no crescimento como na produção de surfactina por espécies de *B. subtilis*. Os cátions multivalentes Fe^{2+} e Mn^{2+} foram os que promoveram acréscimos mais significativos na produção de surfactina, de acordo com COOPER *et al.* (1981), que observou ainda que o manganês promoveu maior efeito sobre a produtividade de surfactina em relação ao ferro. Dentre os elementos citados, a glicerina apresentou ferro (6,6 ppm), cálcio (4,2 ppm) e magnésio (1,2 ppm) (Tabela 4.1), sendo que o manganês permaneceu abaixo do limite de detecção do método utilizado. Deste modo, a caracterização da matéria-prima mostrou a provável necessidade de suplementar o meio de cultivo contendo glicerina como fonte de carbono e energia para a produção de lipopeptídeos por *B. subtilis* LAMI009.

4.2. Cinética de Cultivos em Batelada para a Produção de Ramnolípido por *P. aeruginosa* MSIC02

Os ensaios cinéticos realizados neste trabalho consistiram em verificar a influência da razão C/N sobre a cinética e os parâmetros de fermentação de cultivos em frascos agitados da linhagem *P. aeruginosa* MSIC02 em meio sintético com glicerina como substrato. Para tanto, foram realizados experimentos variando-se a concentração de $NaNO_3$ de 1,0 a 4,0 g/L com concentração de glicerina de 42,0 g/L, obtendo-se razões C/N de 86 a 21, e variando-se a concentração de glicerina, de 42,0 g/L a 23,14 g/L, obtendo-se razões C/N de 21 e 12, respectivamente, com 4,0 g/L de $NaNO_3$. A Tabela 4.2 mostra estes parâmetros para os diferentes ensaios realizados.

Através da Tabela 4.2 verificou-se que a variação da razão C/N afetou significativamente os parâmetros referentes a produção de biossurfactante. O fator de conversão biomassa em produto (Y_{px}) aumentou por um fator de 5 quando reduziu-se a razão CN de 86 para 12. Aumento significativo também foi obtido na concentração máxima (P_{max}) e na produtividade volumétrica (P_B) de ramnolípídeos. Os parâmetros referentes ao crescimento celular foram menos influenciados, observando-se que a concentração máxima (X_{max}) e a

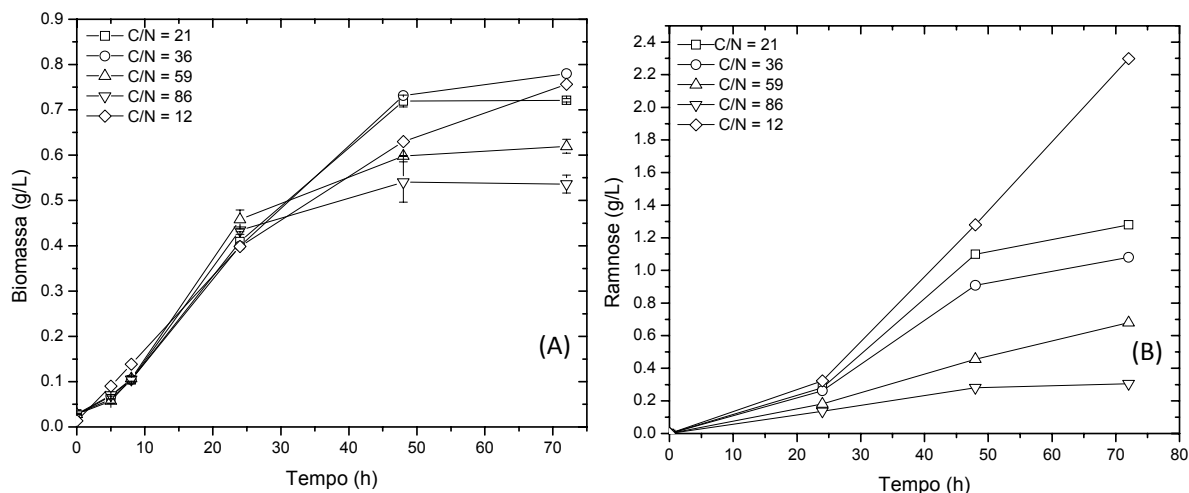
produtividade volumétrica (P_X) de biomassa aumentaram em torno de 1,4 vezes e 2,0 vezes, respectivamente, com a redução da razão CN (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Parâmetros cinéticos e estequiométricos da fermentação em frascos agitados da linhagem *P. aeruginosa* MSIC02 em meio sintético com glicerina de mamona como substrato realizados em diferentes razões C/N.

Glicerol (g/L)	NaNO ₃ (g/L)	Razão C/N	Y _{px} (g/g)	Y _{ps} (g/g)	Y _{xs} (g/g)	P _B (mg/Lh)	P _X (mg/Lh)	Consumo de glicerol (%)
24,0	4,0	12	3,040	0,189	0,060	31,94	10,50	50,77
42,0	4,0	21	1,994	0,061	0,033	17,78	13,56	50,27
42,0	2,4	36	1,649	0,061	0,042	15,00	9,10	42,37
42,0	1,45	59	1,228	0,049	0,038	9,43	7,40	36,61
42,0	1,0	86	0,678	0,022	0,027	4,24	6,26	44,81

Além da concentração de nitrogênio, a concentração inicial de glicerina também exerceu influência sobre o crescimento celular, sendo que a fase estacionária se iniciou com 72 horas de crescimento para o ensaio realizado com concentração inicial de glicerol de 24 g/L (Figura 4.1A), enquanto que para os ensaios em que se utilizou uma concentração de glicerol maior (42 g/L) a fase estacionária de crescimento foi atingida entre 24 horas e 48 horas de cultivo. As curvas de crescimento celular mostraram que a fase de desaceleração do crescimento iniciou em 24 horas para os ensaios C/N 59 e 86 e 48 horas para os ensaios com maior concentração de nitrogênio (Figura 4.1A), mostrando que o nitrogênio foi o elemento estequiometricamente limitante ao crescimento celular.

FIGURA 4.1 Cinética do crescimento celular (A) e da produção de ramnolipídeos (B) em cultivo em frascos agitados de *P. aeruginosa* MSIC02 em meio sintético contendo glicerina como fonte de carbono.

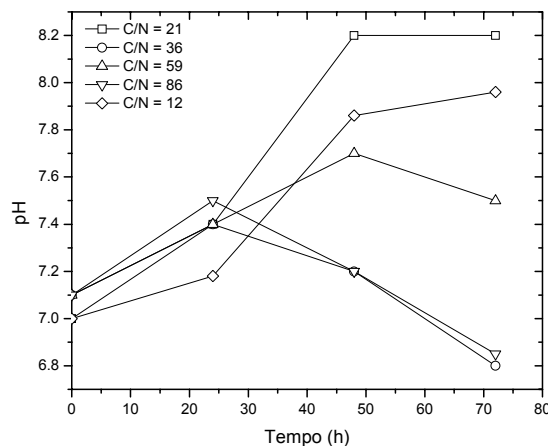


O comportamento cinético da produção de ramnolipídeos pode ser observado na Figura 4.1B. A redução da razão C/N e da concentração inicial de glicerol acarretou uma maior produção de ramnolipídeos, expresso em termos de ramnose, atingindo 2.3 g/L para a razão C/N 12. Comparativamente ao ensaio com mesma concentração de nitrogênio, C/N 21, obteve-se uma produção de ramnolipídeo de 1.27 g/L, cerca de 50 % menor que a obtida anteriormente. O efeito inibidor do glicerol em concentrações elevadas sobre a produção de ramnolipídeos também foi observado por Chen *et al.* (2007), ao verificar que a linhagem de *P. aeruginosa* S2 apresentou baixa produtividade

de biossurfactante utilizando 4 % de glicerol, ocorrendo aumento de 5 vezes na produção deste bioproduto ao reduzir a concentração de glicerol para 2 %.

O comportamento do pH está apresentado na Figura 4.2 para os ensaios avaliados. As curvas de pH mostraram que houve, inicialmente, aumento do pH com posterior redução deste para os ensaios C/N 86 a 36. No ensaio C/N 21 e C/N 12 o pH manteve-se constante de 48 a 72 horas. Observou-se também, que o pH final aumentou com o aumento da concentração de nitrogênio no meio. Comportamento semelhante foi observado por Pinzon-Gamez (2009) ao cultivar a linhagem *P. aeruginosa* E03-40 em frascos agitados, contendo meio com sais minerais suplementado com extrato de levedura e peptona na presença de nitrato e glicerol. Foram obtidos valores de pH entre 8.0 e 8.5 após 40 horas de cultivo, sendo este aumento atribuído a denitrificação em condições microaeróbias.

FIGURA 4.2 Comportamento do pH ao longo do tempo para os ensaios avaliados



A avaliação de modelos cinéticos para o crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato durante a produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* MSIC02 em meio contendo glicerina e nitrato de sódio como fontes de carbono e nitrogênio foi avaliada. Para tanto, avaliou-se o modelo logístico para descrever o crescimento celular e os modelos de Luedeking-Piret (1959) e Mercier *et al.*(1992) para a formação de produto.

As Figuras 4.3 a 4.7 mostram os ajustes obtidos pelos modelos propostos e os parâmetros estimados das variáveis de fermentação são mostrados nas Tabelas 4.3 e 4.4.

FIGURA 4.3 Cinética do crescimento celular, produção de ramnolipídeo e consumo de substrato durante o cultivo de *P. aeruginosa* MSIC02 em frascos agitados em razão C/N = 12: (A) Modelo Luedeking-Piret e (B) Modelo Mercier *et al.* (1992).

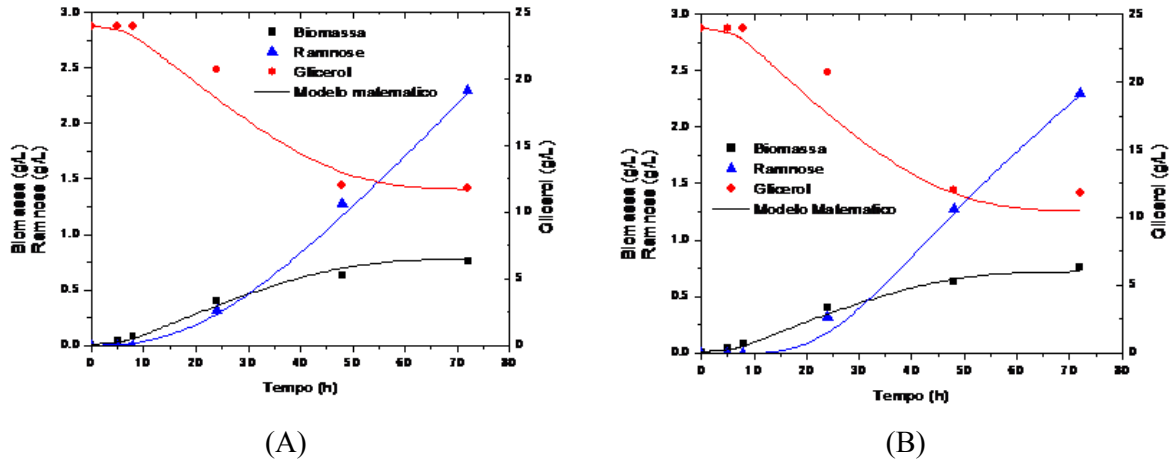


FIGURA 4.4 Cinética do crescimento celular, produção de ramnolipídeo e consumo de substrato durante o cultivo de *P. aeruginosa* MSIC02 em frascos agitados em razão C/N = 21: (A) Modelo Luedeking-Piret e (B) Modelo Mercier *et al.* (1992).

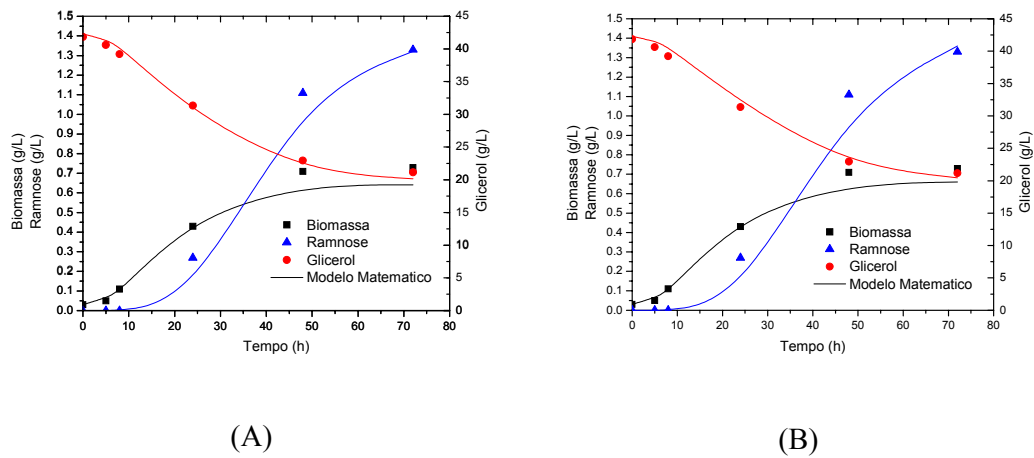


FIGURA 4.5 Cinética do crescimento celular, produção de ramnolipídeo e consumo de substrato durante o cultivo de *P. aeruginosa* MSIC02 em frascos agitados em razão C/N = 36: (A) Modelo Luedeking-Piret e (B) Modelo Mercier *et al.* (1992).

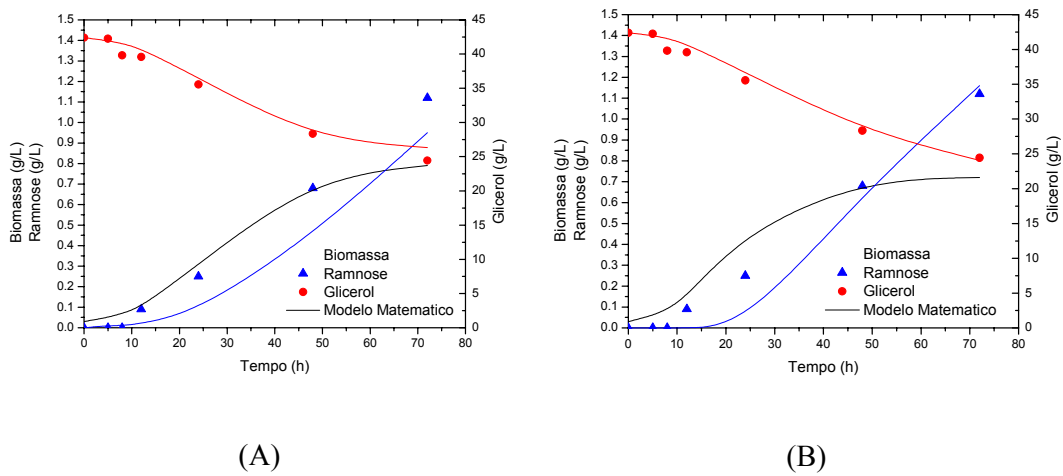


FIGURA 4.6 Cinética do crescimento celular, produção de ramnolipídeo e consumo de substrato durante o cultivo de *P. aeruginosa* MSIC02 em frascos agitados em razão C/N = 59: (A) Modelo Luedeking-Piret e (B) Modelo Mercier *et al.* (1992).

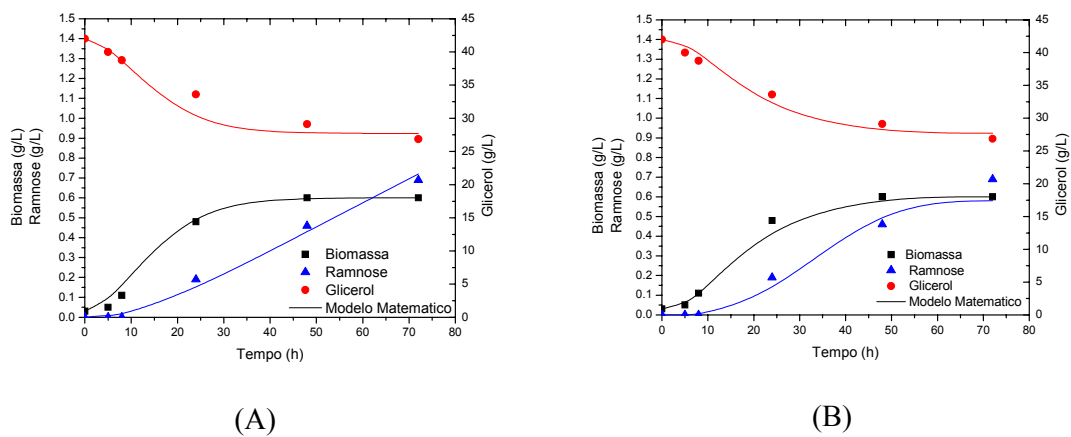


FIGURA 4.7 Cinética do crescimento celular, produção de ramnolipídeo e consumo de substrato durante o cultivo de *P. aeruginosa* MSIC02 em frascos agitados em razão C/N = 86: (A) Modelo Luedeking-Piret e (B) Modelo Mercier *et al.* (1992).

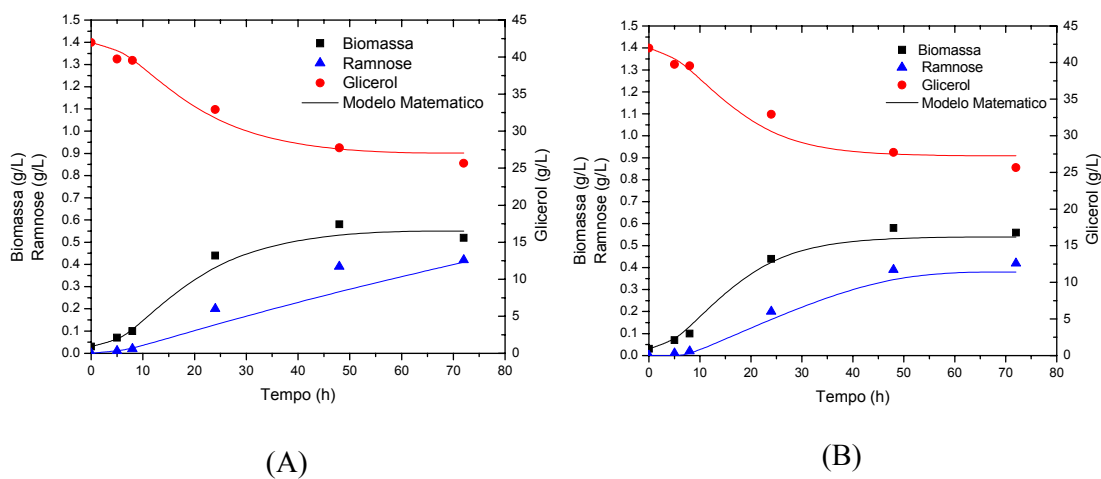


Tabela 4.3 Parâmetros estimados para os modelos logístico e Luedeking-Piret para as cinéticas de crescimento celular, produção de ramnolipídeos e consumo de substrato durante o cultivo do *P. aeruginosa* MSIC02 em frascos agitados.

Parâmetros	Razão C/N				
	12	21	36	59	86
Crescimento celular					
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,165 ± 1,118	0,171 ± 0,014	0,120 ± 0,429	0,250 ± 0,094	0,180 ± 0,003
X_{\max} (g/L)	0,782 ± 16,004	0,658 ± 0,091	0,793 ± 10,349	0,600 ± 0,513	0,550 ± 0,035
Consumo de Substrato					
Y_{xs} (g/g)	0,063 ± 1,538	0,046 ± 0,006	0,048 ± 0,539	0,040 ± 0,036	0,030 ± 0,002
Y_{ps} (g/g)	---	0,169 ± 0,038	----	----	----
Formação de Produto					
α	0,050 ± 65,608	0,19 ± 0,006	0,010 ± 43,295	0,001 ± 4,537	0,200 ± 0,156
β	0,061 ± 2,373	1,36 ± 0,157	0,027 ± 1,295	0,020 ± 0,060	0,010 ± 0,001

Tabela 4.4 Parâmetros estimados para os modelos logístico e Mercier *et al.* (1992) para as cinéticas de crescimento celular, produção de ramnolipídeos e consumo de substrato durante o cultivo do *P. aeruginosa* MSIC02 em frascos agitados.

Parâmetros	Razão C/N				
	12	21	36	59	86
Crescimento celular					
μ_{\max} (h ⁻¹)	0,167 ± 0,014	0,170 ± 0,029	0,162 ± 0,066	0,180 ± 0,007	0,218 ± 0,016
X_{\max} (g/L)	0,720 ± 0,239	0,645 ± 0,090	0,709 ± 0,244	0,600 ± 0,071	0,544 ± 0,108
Consumo de Substrato					
Y_{xs} (g/g)	0,052 ± 0,019	0,037 ± 0,010	0,076 ± 0,051	0,040 ± 0,005	0,035 ± 0,007
Y_{ps} (g/g)	---	0,233 ± 0,150	0,156 ± 0,125		
Formação de Produto					
$C_{p\max}$ (g/L)	2,298 ± 0,398	1,320 ± 0,159	1,260 ± 0,375	0,578 ± 0,120	0,377 ± 0,177
PR (h ⁻¹)	0,229 ± 0,015	0,197 ± 0,012	0,230 ± 0,016	0,229 ± 0,081	0,266 ± 0,113

Pode-se observar a partir dos desvios obtidos para os parâmetros de crescimento celular que o modelo logístico forneceu descrição cinética adequada para todos os ensaios (Tabela 4.4). Este modelo, comparado a outros modelos cinéticos não estruturados, como Monod, Tessier e Contois, não considera a presença de um substrato limitante, mas relaciona o crescimento celular a um fator de inibição, que é proporcional a x . Esta consideração permitiu a modelagem do crescimento de *P. aeruginosa* MSIC02, visto que o substrato limitante, neste caso, foi a fonte de nitrogênio.

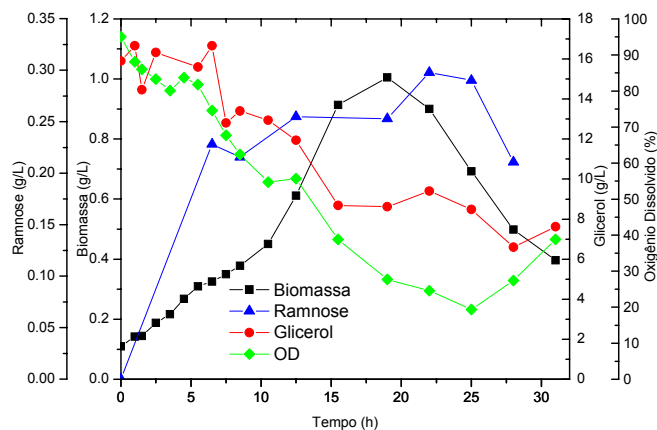
O modelo proposto por MERCIER *et al.* (1992) foi capaz de descrever a produção de ramnolipídeos para todos os ensaios obtendo-se desvio padrão aceitável para todos os parâmetros (Tabela 4.4). Este modelo foi desenvolvido para descrever a biossíntese de lactato de amônio a partir de uma bactéria homofermentativa, a *Lactobacillus amylophilus*, sendo obtido por analogia ao modelo logístico para crescimento celular. MERCIER *et al.* (1992) observaram comportamento semelhante entre a velocidade específica de produção de ácido láctico *versus* concentração de ácido láctico e a velocidade específica de crescimento celular *versus* concentração celular. O modelo apresentou, portanto, uma abordagem simplificada para a produção de ramnolipídeos, sem fornecer parâmetros que esclareçam o mecanismo de biossíntese deste bioproduto. Este modelo tem sido apresentado na literatura como um modelo adequado para descrever a cinética de síntese de biossurfactantes (Rodrigues *et al.*, 2006) para descrever a produção de biossurfactantes por bactéria probiótica, obtendo ajustes aceitáveis ($R^2 > 0.91$).

O consumo de substrato foi explicado pelo crescimento celular. Os valores de Y_{xs} foram semelhantes aos valores obtidos experimentalmente (Tabelas 4.2, 4.3, 4.4) para todos os ensaios. Durante as simulações não foi possível ajustar os parâmetros Y_{ps} e m_s , pois estes não apresentaram valores significativos para a minimização dos resíduos, bem como desvio padrão aceitável.

4.3. Cultivos de *P. aeruginosa* MSC102 em Biorreator Tanque Agitado

A Figura 4.8 mostra o cultivo de *P. aeruginosa* MSC102 em biorreator tipo tanque agitado, com coleta de espuma e sem reciclo de células.

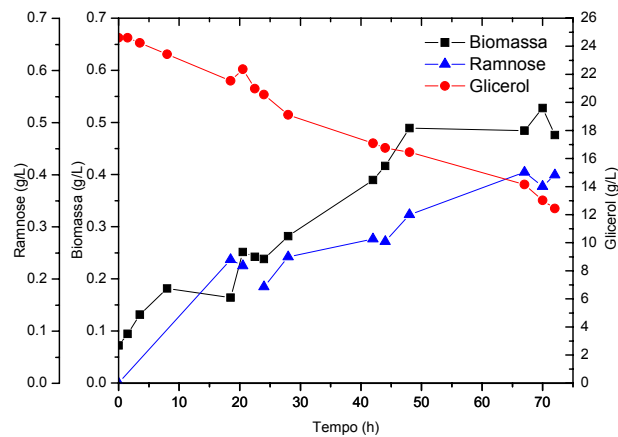
FIGURA 4.8 Cinética de crescimento celular, produção de surfactante e consumo de glicerol durante o cultivo de *P. aeruginosa* MSC102 em biorreator tipo tanque agitado com coleta de espuma e sem reciclo de células.



Observou-se um decréscimo da concentração celular a partir de 20 horas de cultivo. Esse fato demonstrou que houve grande arraste de células através da espuma devido à adsorção preferencial da célula bacteriana com relação ao próprio biosurfactante e outras substâncias que apresentem caráter tensoativo, como proteínas e peptídeos (HEYD *et al.*, 2007). Outro fato relacionado à formação da espuma foi a baixa produtividade de ramnolípídeo, expresso em termos de ramnose, durante o cultivo, atingindo uma concentração máxima de 300 mg/L, comparativamente à produção atingida em frascos agitados com o mesmo microrganismo utilizando glicerina como substrato (2300 mg/L) (Figura 4.1B). Houve consumo de glicerol de, aproximadamente, 65 % durante o cultivo.

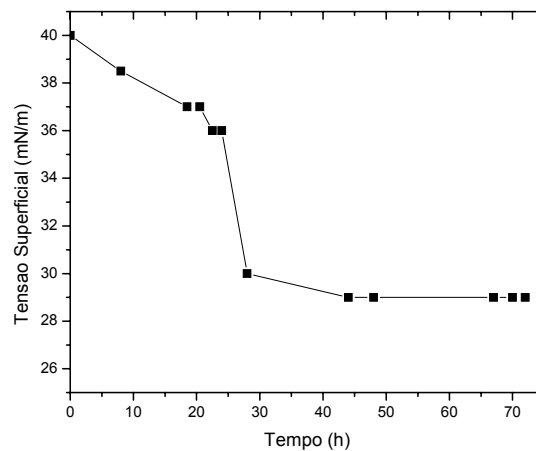
A Figura 4.9 mostra o cultivo de *P. aeruginosa* MSC102 no mesmo sistema, porém com reciclo de células.

FIGURA 4.9 Cinética de crescimento celular, produção de ramnolipídeo e consumo de glicerol durante o cultivo de *P. aeruginosa* MSC102 em biorreator tipo tanque agitado com coleta de espuma e reciclo de células.



Neste caso, observou-se que o crescimento celular não apresentou um decréscimo ao longo do cultivo. A cinética do crescimento celular e da síntese de biosurfactante mostrou que houve produção de biosurfactante durante a fase exponencial de crescimento. A Figura 4.10 apresenta o acompanhamento da tensão superficial, uma medida da presença de surfactante no meio de cultivo, mostrando que houve redução da tensão superficial nos instantes iniciais do cultivo.

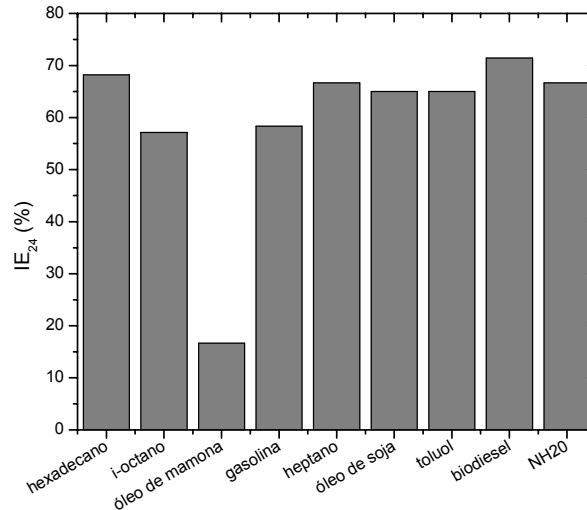
FIGURA 4.10 Comportamento da tensão superficial do meio livre de células durante o cultivo em biorreator tanque agitado de *P. aeruginosa* MSIC02.



Desta forma, sugere-se que a síntese de biosurfactante seguiu uma cinética mista, semi-associada ao crescimento. Santos (2003) verificaram comportamento semelhante ao cultivar *P. aeruginosa* PA1 em meio sintético com glicerol como fonte de carbono e nitrato de sódio como fonte de nitrogênio em biorreator de bancada. A baixa produtividade de ramnolípídeo pode estar relacionada à adsorção deste na espuma, reduzindo a sua concentração no meio de cultivo. Outra possibilidade seria o efeito positivo da rota denitrificante sobre a produção deste surfactante, que foi suprimida devido à presença de oxigênio no meio impedindo a utilização do nitrato comoceptor final de elétrons. O cultivo de *Pseudomonas* em fermentação utilizando rota denitrificante tem sido apresentado como alternativa para a redução dos problemas operacionais relacionados a cultivos aeróbios. Os cultivos, neste caso, seriam conduzidos com aeração superficial evitando a turbulência promovida pela aeração submersa. Outra alternativa consiste na utilização de células imobilizadas e retenção destas no biorreator para a utilização da técnica de fracionamento em espuma integrado ao processo fermentativo (HEYD *et al.* 2007).

Avaliou-se, ainda, a capacidade do surfactante produzido por *P. aeruginosa* MSC102 em emulsificar hidrocarbonetos. O meio de cultivo livre de células apresentou índice de emulsificação de, cerca de, 65 % para os substratos hidrofóbicos utilizados, exceto para gasolina e iso-octano, em que o índice foi de 55 %, (Figura 4.11) indicando a boa ação emulsificante para emulsões formadas tanto com substrato de origem vegetal (óleo de soja e biodiesel), quanto com os de origem mineral. A emulsão com óleo de mamona apresentou o menor resultado, cerca de 15 %. A redução da capacidade emulsificante com o óleo de mamona pode ser atribuída à elevada viscosidade deste óleo (194,3 cP a 40 °C), comparativamente, aos demais óleos avaliados. A elevada viscosidade da fase dispersa, óleo de mamona, aumenta o coeficiente de difusão das gotas e, portanto, a frequência de colisões entre elas favorecendo a coalescência e, conseqüentemente, a quebra da emulsão (ROSEN, 2004)

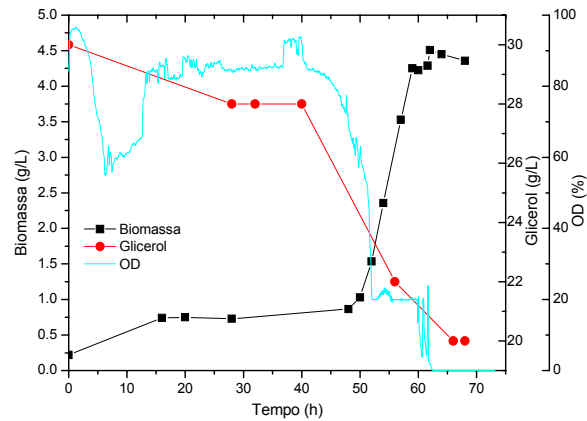
FIGURA 4.11 Índice de emulsificação com diferentes substratos hidrofóbicos realizados em meio de cultura livre de células obtido a partir do cultivo de *P. aeruginosa* MSC102 em biorreator tipo tanque agitado.



4.4. Ensaios em Biorreator de Bancada com a Cepa *B. subtilis* LAMI009

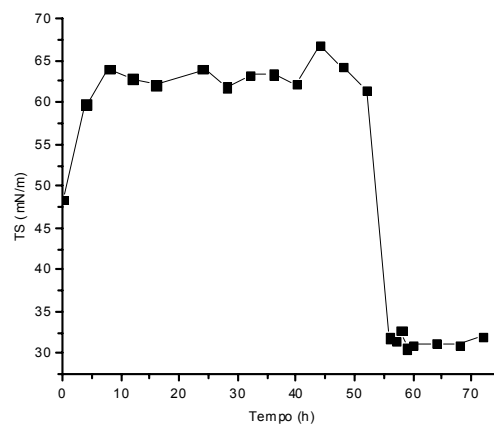
A Figura 4.12 mostra os perfis de crescimento celular, consumo de substrato e de O₂ durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em meio de cultivo contendo glicerina como fonte de carbono. Observou-se um discreto crescimento celular no início da fermentação, até 15 horas, que foi acompanhado de consumo de O₂ e baixo consumo de glicerol. A partir deste período, deu-se início a uma extensa fase de ausência de crescimento celular que se manteve até 49 horas de cultivo, ocasionando um aumento da concentração de O₂ (% saturação) sem consumo de substrato. Esta fase de adaptação ou esporulação pode ser atribuída à exaustão de nutrientes oriundos do inóculo implicando na necessidade de adaptação do microrganismo aos novos nutrientes fornecidos pelo meio de cultivo. Bactérias do gênero *Bacillus* possuem forte tendência à esporulação que é causada, principalmente, pelo esgotamento de nutrientes (SERRANO *et al.*, 2001). A seguir, o microrganismo entrou na fase de crescimento exponencial, de curta duração (8 a 10 horas) e velocidade máxima de crescimento celular de celular igual a 0,155 h⁻¹.

FIGURA 4.12 Perfis de crescimento celular, consumo de glicerol e O_2 durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em biorreator tipo tanque agitado com coleta de espuma e reciclo de células. (OD – oxigênio dissolvido)



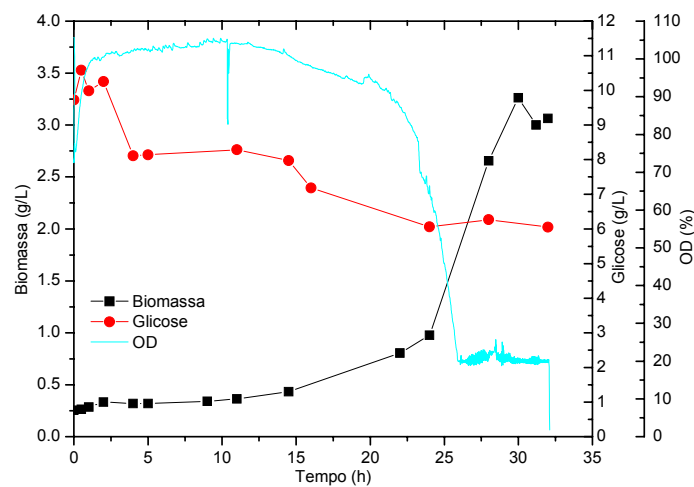
A análise da tensão superficial (TS) durante o cultivo (Figura 4.13) mostrou que esta atingiu um valor mínimo durante a fase exponencial de crescimento, bem como, houve aumento considerável da formação de espuma. Como a tensão superficial consiste em uma medida direta da concentração de surfactantes pode-se observar que as maiores concentrações foram obtidas quando o microrganismo apresentou taxa de crescimento máxima.

FIGURA 4.13 Tensão superficial do meio de cultura livre de células a partir do cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em biorreator tipo tanque agitado utilizando glicerol como fonte de carbono e energia.



De acordo com FISHER e SONENSHEIN (1991) bactérias da espécie *B. subtilis* preferem glicose como fonte de carbono e energia. Para avaliar o efeito da fonte de carbono, um ensaio comparativo com glicose foi realizado sob as mesmas condições, a fim de avaliar o comportamento do crescimento celular, consumo de substrato e de O₂ (Figura 4.14).

FIGURA 4.14 Perfis de crescimento celular, consumo de glicose e de O₂ durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em biorreator tipo tanque agitado com coleta de espuma e reciclo de células. (OD – oxigênio dissolvido)



O microrganismo apresentou ainda a necessidade de uma grande adaptação ao meio, que foi expressa por uma extensa fase lag (Figura 4.14). A fase exponencial de crescimento ocorreu durante 8 horas do cultivo (entre 22 e 30 horas), apresentando valor de $\mu_X = 0,186 \text{ h}^{-1}$, valor semelhante ao obtido com glicerol. A presença de fatores de crescimento, como aminoácidos e vitaminas, provenientes do meio de inóculo (PGE), que não estão presentes no meio de fermentação (meio mineral) pode ser uma possível razão para este comportamento. REIS *et al.* (2004), ao estudarem o efeito de diferentes meios de cultivo para a produção de lipopeptídeos por *B. subtilis*, verificaram que o extrato de levedura apresentou-se como uma importante fonte de vitaminas do complexo B, que são necessárias para sintetizar enzimas e coenzimas, além de fornecer aminoácidos e outros importantes compostos estimulantes do crescimento celular. Assim, a adaptação a uma fonte de nitrogênio inorgânica e a escassez destes promotores de crescimento no meio de cultivo utilizado pode conduzir a uma longa adaptação do microrganismo ao meio de cultivo ou à esporulação. Portanto, propôs-se o

desenvolvimento de um protocolo de adaptação/ativação do *B. subtilis* LAMI009 ao meio de cultivo empregado para a obtenção de lipopeptídeos a partir do co-produto do biodiesel em meio mineral.

4.5. Desenvolvimento de um Protocolo de Adaptação/Ativação do *B. subtilis* LAMI009 em Meio contendo Glicerol como Fonte de Carbono

O desenvolvimento do método seguiu as seguintes etapas:

1 – Ativação em meio Morán sólido (meio mineral descrito no item 3.4.2): A partir da cultura em APGE, repicar com auxílio de uma alça de níquel-cromo para placa contendo meio Morán. Incubar por 12 a 15 horas a 30 °C. As células devem estar na fase exponencial de crescimento.

2 – Crescimento em meio Moran com glicerol suplementado com extrato de levedura

O preparo do inóculo seguiu as seguintes etapas. A partir da cultura ativada em placa, transferir três alçadas para 100 mL de meio Moran contido em erlenmeyer de 500 mL. Incubar sob agitação de 180 rpm a 30 °C. O tempo de incubação foi determinado de acordo com a fase exponencial de crescimento. O protocolo de propagação do inóculo foi realizado com as cepas *Bacillus subtilis* LAMI009 e *B. subtilis* ATCC6633. Avaliou-se a suplementação do meio Morán modificado com 5 g/L de extrato de levedura. As curvas de crescimento para as cepas *B. subtilis* LAMI009 e *B. subtilis* ATCC6633 estão apresentadas nas Figuras 4.15 a 4.17.

FIGURA 4.15 Crescimento de *B. subtilis* ATCC6633 em meio Morán modificado suplementado com 5 g/L de extrato de levedura.

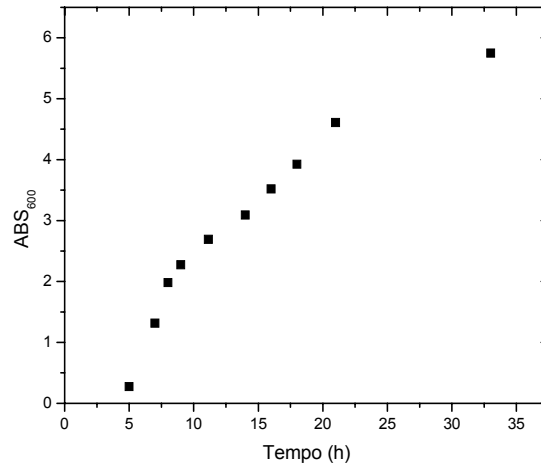


FIGURA 4.16 Crescimento *B. subtilis* ATCC6633 em meio Morán modificado sem extrato de levedura.

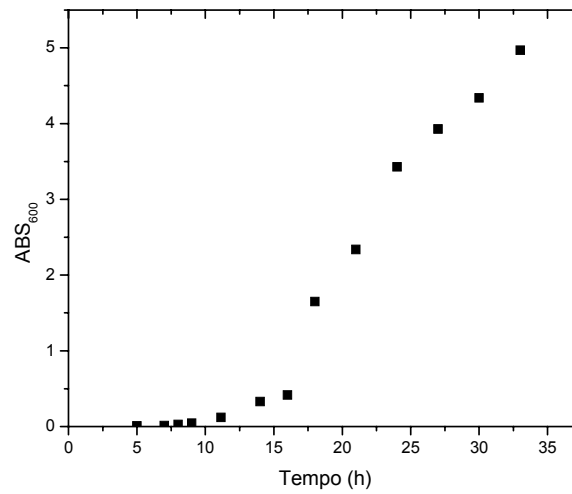
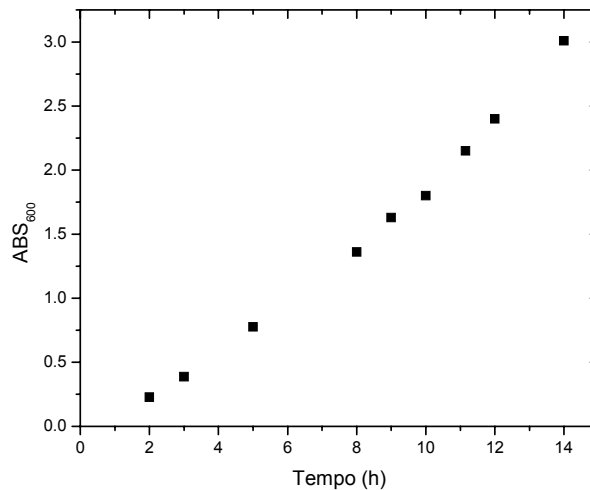


FIGURA 4.17 Crescimento de *B. subtilis* LAMI009 em meio Morán modificado suplementado com extrato de levedura.

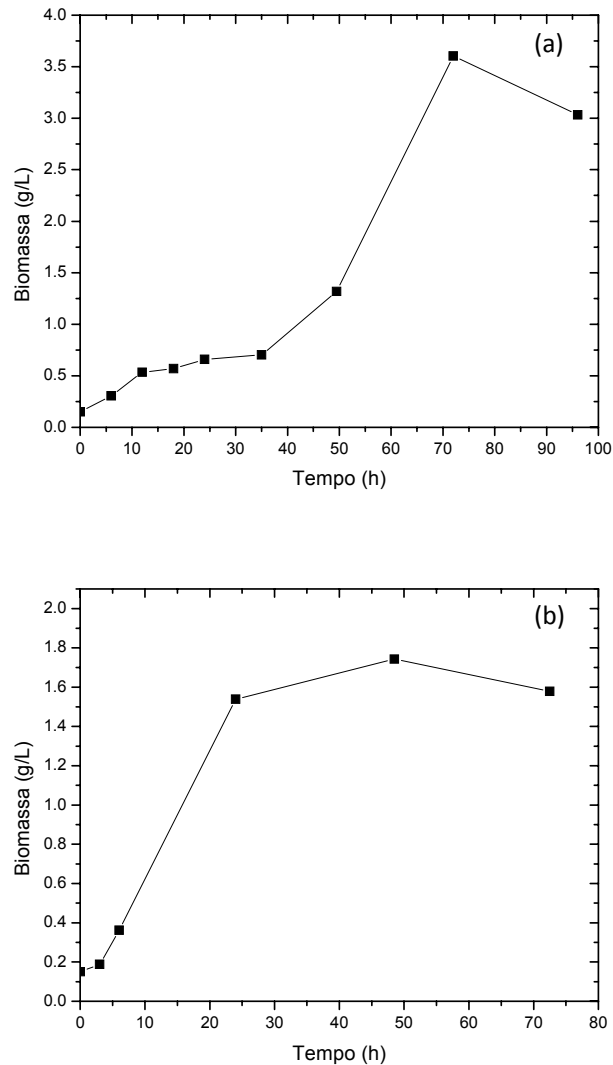


O crescimento da cepa foi dependente da suplementação do meio mineral com extrato de levedura (Figura 4.15), pois não houve crescimento da cepa na ausência deste suplemento, utilizando glicerol ou glicose como fonte de carbono (dados não mostrados). Entretanto, o crescimento da linhagem *B. subtilis* ATCC6633 não foi dependente do extrato de levedura. As Figuras 15 e 16 mostram o comportamento do crescimento celular nos meios com e sem extrato de levedura, respectivamente, cuja diferença foi a presença de fase de adaptação no meio sem extrato de levedura.

Efeito do inoculo sobre o crescimento celular no cultivo submerso de B. subtilis LAMI009 em meio MORÁN com glicerol

A fim de avaliar o efeito da adaptação/ativação da cepa em meio contendo glicerol como substrato, realizou-se um cultivo em frascos agitados com o acompanhamento do crescimento celular (Figura 4.18).

FIGURA 4.18 Crescimento celular durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados com glicerol como substrato a partir de inóculos obtidos nos meios (a) PGE (peptona-glicose-extrato de levedura) e (b) Meio Morán, após adaptação.



O crescimento celular de *B. subtilis* LAMI009 a partir do inóculo em meio PGE em meio mineral apresentou um discreto crescimento celular até 12 horas de cultivo, seguido de uma fase de ausência de crescimento (fase lag) entre 12 e 36 horas, a partir do qual iniciou-se o crescimento exponencial (Figura 4.18(a)). Este comportamento foi semelhante ao obtido no ensaio em biorreator sob as mesmas condições de cultivo (Figura 4.12). Este comportamento foi significativamente alterado após a adaptação da

cepa em meio mineral (Figura 4.18(b)), eliminando a fase lag. Desta forma, o protocolo desenvolvido foi adequado para a adaptação da cepa ao meio mineral contendo glicerol como fonte de carbono e energia (Figura 4.18(b)).

A partir dos resultados obtidos, este protocolo foi utilizado para todos os meios de cultivo avaliados nas etapas subsequentes deste trabalho.

4.6. Estudos Cinéticos em Cultivos Submersos de *B. subtilis* LAMI009 em Meio de Cultivo Contendo Glicerina como Fonte de Carbono e Energia

4.6.1. Efeito de Fontes de Nitrogênio

As Figuras 4.19 a 4.21 mostram a cinética de crescimento celular, produção de biosurfactante, consumo de glicerol e NH_4^+ e comportamento do pH durante o cultivo submerso de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados com diferentes fontes de nitrogênio.

FIGURA 4.19 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e NH_4^+ e comportamento do pH durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 180 rpm e 30 °C com glicerina como fonte de carbono e energia e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de nitrogênio.

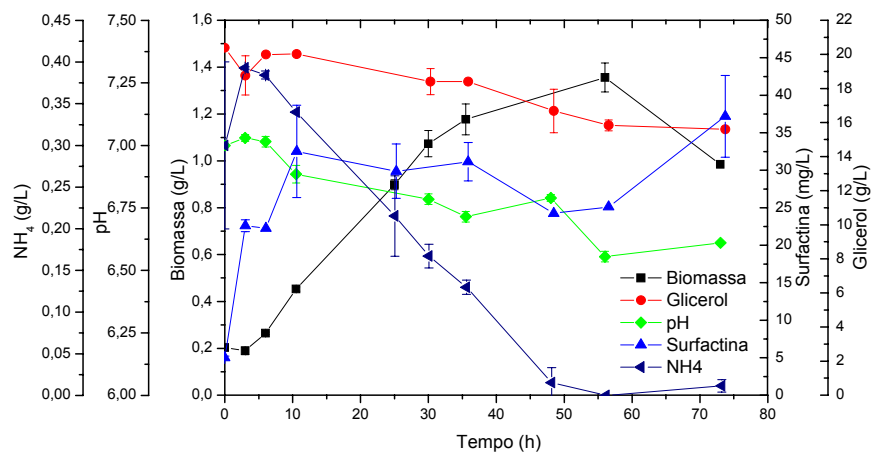


FIGURA 4.20 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e NH_4^+ e comportamento do pH durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 180 rpm e 30 °C com glicerina como fonte de carbono e energia e NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio.

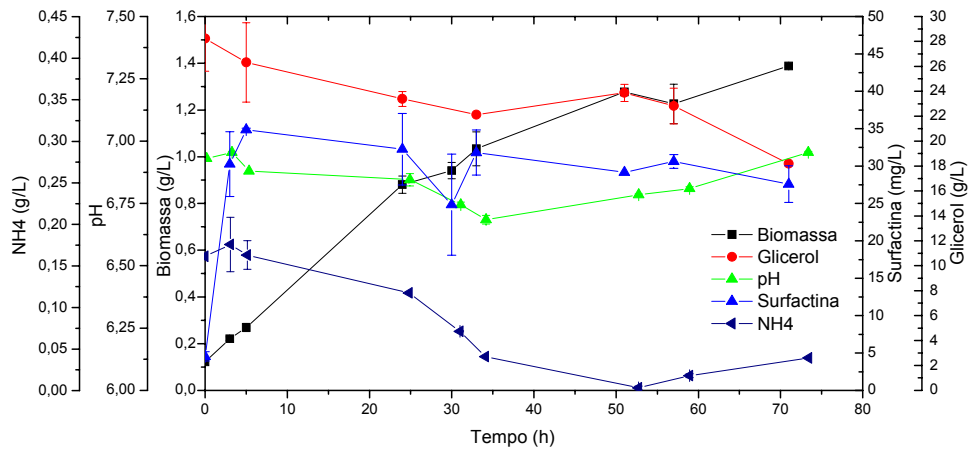
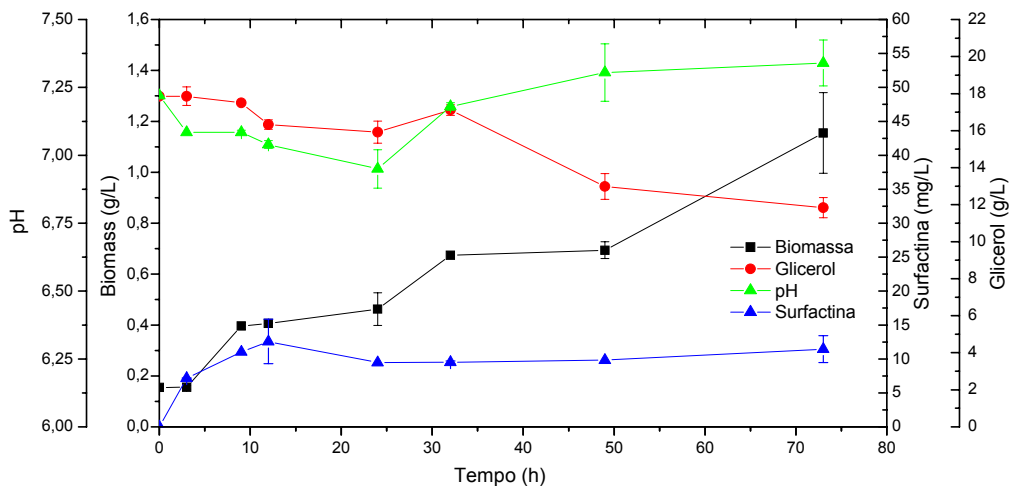


FIGURA 4.21 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e comportamento do pH durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 180 rpm e 30 °C com glicerina como fonte de carbono e energia e NaNO_3 como fonte de nitrogênio.



Os cultivos de *B. subtilis* LAMI009 realizados em frascos agitados mostraram que houve influência da fonte de nitrogênio sobre o comportamento do crescimento celular, produção de surfactina e comportamento do pH. O crescimento celular foi bem suportado por todas as fontes de nitrogênio, sendo $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_4NO_3 , os que apresentaram maiores velocidades específicas de crescimento (Tabela 4.5 e Figura 4.22). O cultivo com NaNO_3 , apesar de ter apresentado densidade celular semelhante aos cultivos com as demais fontes de nitrogênio (Tabela 4.5), resultou em velocidade específica de crescimento cerca de 4 vezes menor comparativamente às obtidas com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_4NO_3 (Tabela 4.5). DAVIS *et al.* (1999) obtiveram resultado semelhante em cultivos de *B. subtilis* ATCC 21332 em frascos agitados realizados com NaNO_3 como única fonte de nitrogênio. Pode-se observar, também, que nos cultivos com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_4NO_3 , houve total consumo de NH_4^+ entre 50 e 55 horas. No cultivo com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ observou-se que o nitrogênio limitou o crescimento celular, cuja exaustão após 55 horas de cultivo acarretou o início da fase estacionária (Figura 4.19). Pode-se observar, ainda, um discreto crescimento celular no cultivo com NH_4NO_3 , após a exaustão de NH_4^+ , podendo ser atribuído à utilização de NO_3^- disponível no meio como fonte de nitrogênio para anabolismo. Na presença de nitrato e sob condições de baixa disponibilidade de oxigênio, *B. subtilis* pode crescer anaerobicamente, utilizando nitrato como acceptor final de elétrons (NAKANO e HULLET, 1997).

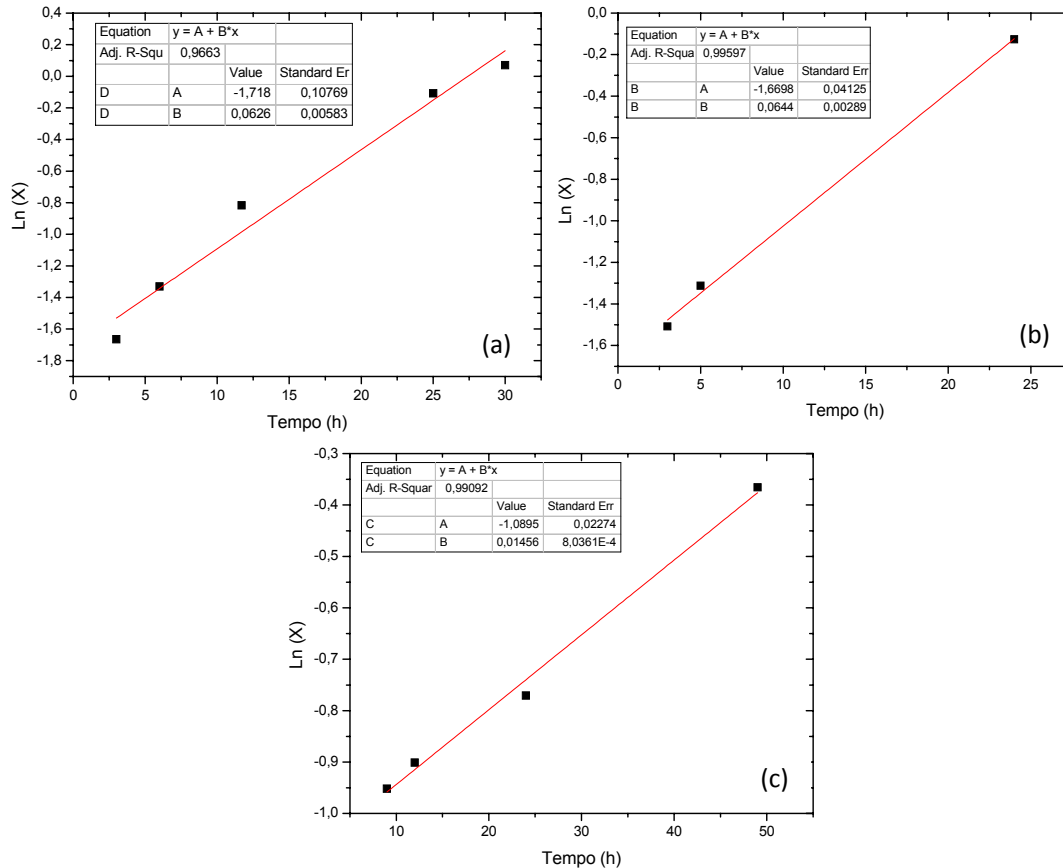
O consumo de glicerol sofreu pequena variação de acordo com a fonte de nitrogênio utilizada, na faixa de 25,0 a 30,0 %, o que pode ser atribuído à obtenção de densidades celulares semelhantes entre os cultivos realizados (Tabela 4.5).

O comportamento do pH ao longo dos cultivos foi influenciado pela fonte de nitrogênio. A Figura 4.19 mostra que, na presença de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, houve tendência à acidificação do meio ao longo do cultivo. Na presença de NH_4NO_3 houve uma discreta redução do pH até 35 horas de cultivo ocorrendo aumento após este período (Figura 4.20). Comportamento semelhante foi obtido durante o cultivo com NaNO_3 (Figura 4.21). Essa variação no comportamento do pH durante o cultivo indicou, provavelmente, uma mudança no metabolismo que pode estar relacionada ao mecanismo de assimilação de nitrato por linhagens de *B. subtilis* (ROCHA *et al.*, 2009).

Tabela 4.5 Velocidades específicas de crescimento, período da fase exponencial e densidade celular máxima obtidas nos cultivos de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 30 °C e 180 rpm.

Fonte de Nitrogênio	μ (h ⁻¹)	Período fase exponencial (h)	X_{\max} (g/L)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,062	3 - 30	1,15 ± 0,1
NH ₄ NO ₃	0,064	3 - 24	1,39 ± 0,0
NaNO ₃	0,015	9 - 48	1,15 ± 0,2

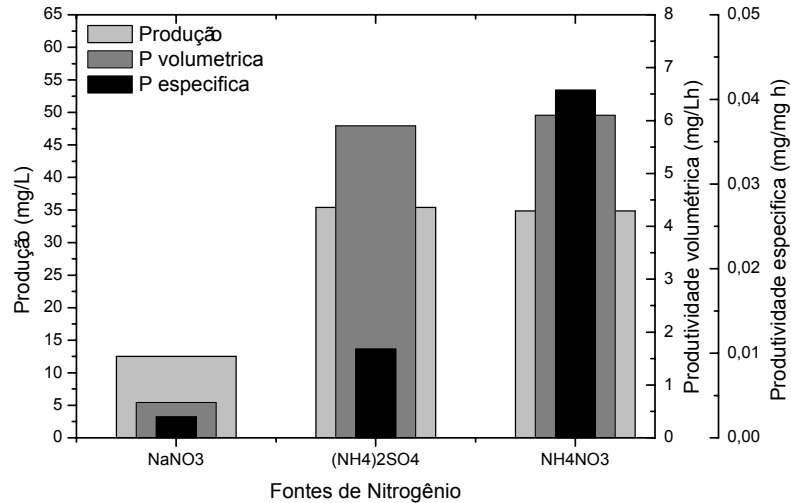
FIGURA 4.22 Determinação das velocidades específicas de crescimento celular durante a fase exponencial de crescimento para diferentes fontes de nitrogênio durante os cultivos em frascos agitados de *B. subtilis* LAMI009 a 30 °C e 180 rpm. (a) (NH₄)₂SO₄, (b) NH₄NO₃, (c) NaNO₃.



A cinética de produção de surfactina apresentou comportamento semelhante em todos os cultivos, atingindo um valor máximo nas primeiras horas e mantendo-se constante ao longo do cultivo (Figuras 4.19 a 4.21). Propõe-se que a exaustão de algum nutriente no meio de cultivo ocasionou a limitação da biossíntese de surfactina. A produção de surfactina requer a presença de peptídeos extracelulares cuja síntese é dependente das condições nutricionais (COSBY *et al.*, 1998). DAVIS *et al.* (2001) ao avaliarem a produção de surfactina por *B. subtilis* ATCC 21332 em biorreator com recuperação de espuma, atribuíram a redução da produção de surfactina em cultivos com maior agitação, à remoção desses peptídeos através da espuma.

A Figura 4.23 mostra a produtividade volumétrica, produção de surfactina e produtividade específica em função das fontes de nitrogênio. Os cultivos com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e NH_4NO_3 apresentaram produtividade e produção semelhantes (Figura 4.23). Entretanto, obteve-se maior produtividade específica com NH_4NO_3 , comparativamente às demais fontes de nitrogênio (6,1 mg/Lh). NaNO_3 não constituiu uma fonte de nitrogênio adequada para a produção de surfactina, obtendo-se produção cerca de 3 vezes menor comparativamente à obtida nos cultivos com as demais fontes de nitrogênio. Estes resultados mostraram que a fonte de nitrogênio exerceu grande influência sobre a produção de surfactina. A correlação entre metabolismo de nitrogênio e a biossíntese de surfactina foi avaliada por DAVIS *et al.* (1999). Os autores observaram esse efeito durante cultivos de *B. subtilis* ATCC 21332 com limitação de nitrato que forneceram concentração de surfactina 8 vezes maior relativamente aos cultivos com limitação de amônio.

FIGURA 4.23 Influência de fontes de nitrogênio sobre a produtividade volumétrica, produção de surfactina e produtividade específica a partir de cultivos em frascos agitados de *B. subtilis* LAMI009 a 180 rpm e 30 °C.



A redução da tensão superficial, além de indicar uma relação direta da produção de compostos tensoativos, também indica a eficiência do biossurfactante (NITSCHKE *et al.*, 2005). O comportamento da tensão superficial ao longo dos cultivos (Figura 4.24) mostrou que, para todas as fontes de nitrogênio, a tensão superficial atingiu valores mínimos nas primeiras horas do cultivo (Figura 4.24) correspondendo à maior concentração de surfactina no meio (Figuras 4.20 a 4.21). Após este período, a tensão superficial apresentou um discreto aumento em todos os cultivos, que pode ser atribuído à presença de outros compostos tensoativos, tais como proteínas, capazes de competir com a surfactina pela adsorção na superfície do líquido, alterando a tensão superficial (DAVIS *et al.*, 2001). A Tabela 4.6 mostra que a menor tensão superficial foi atingida nos cultivos com (NH₄)₂SO₄ e NH₄NO₃, relativamente ao NaNO₃. Este resultado pode estar relacionado à concentração de surfactina no meio de cultivo, bem como à relação estrutura/atividade do lipopeptídeo sintetizado (PEYPOUX *et al.*, 1999). A surfactina é constituída por isoformas que variam de acordo com o comprimento da cadeia carbônica (C₁₃ – C₁₅) e grau de ramificação (SHALIGRAM e SHINGAL, 2010). Além disso, uma única linhagem de *B. subtilis* pode produzir lipopeptídeos com diferentes núcleos peptídicos, tais como surfactina e iturina (LIU *et al.*, 2009). Essas variações

além de serem dependentes da linhagem utilizada, também são influenciadas por condições nutricionais (SOUSA *et al.*, 2012).

FIGURA 4.24 Efeito de fontes de nitrogênio sobre o comportamento da tensão superficial do meio de cultivo livre de células durante o cultivo em frascos agitados de *B. subtilis* LAMI009 a 180 rpm e 30 °C em meio mineral com glicerina como fonte de carbono e energia.

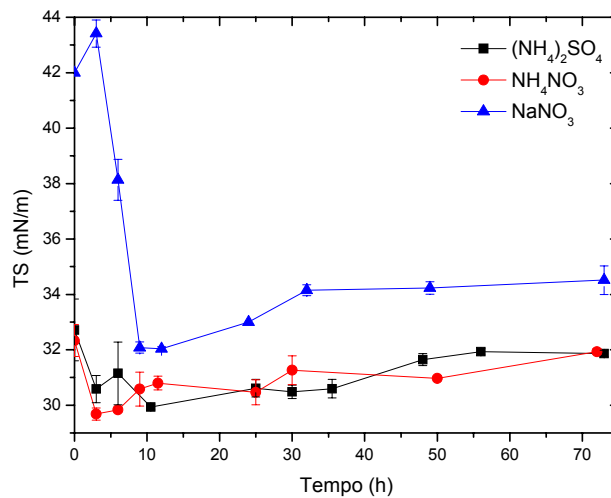
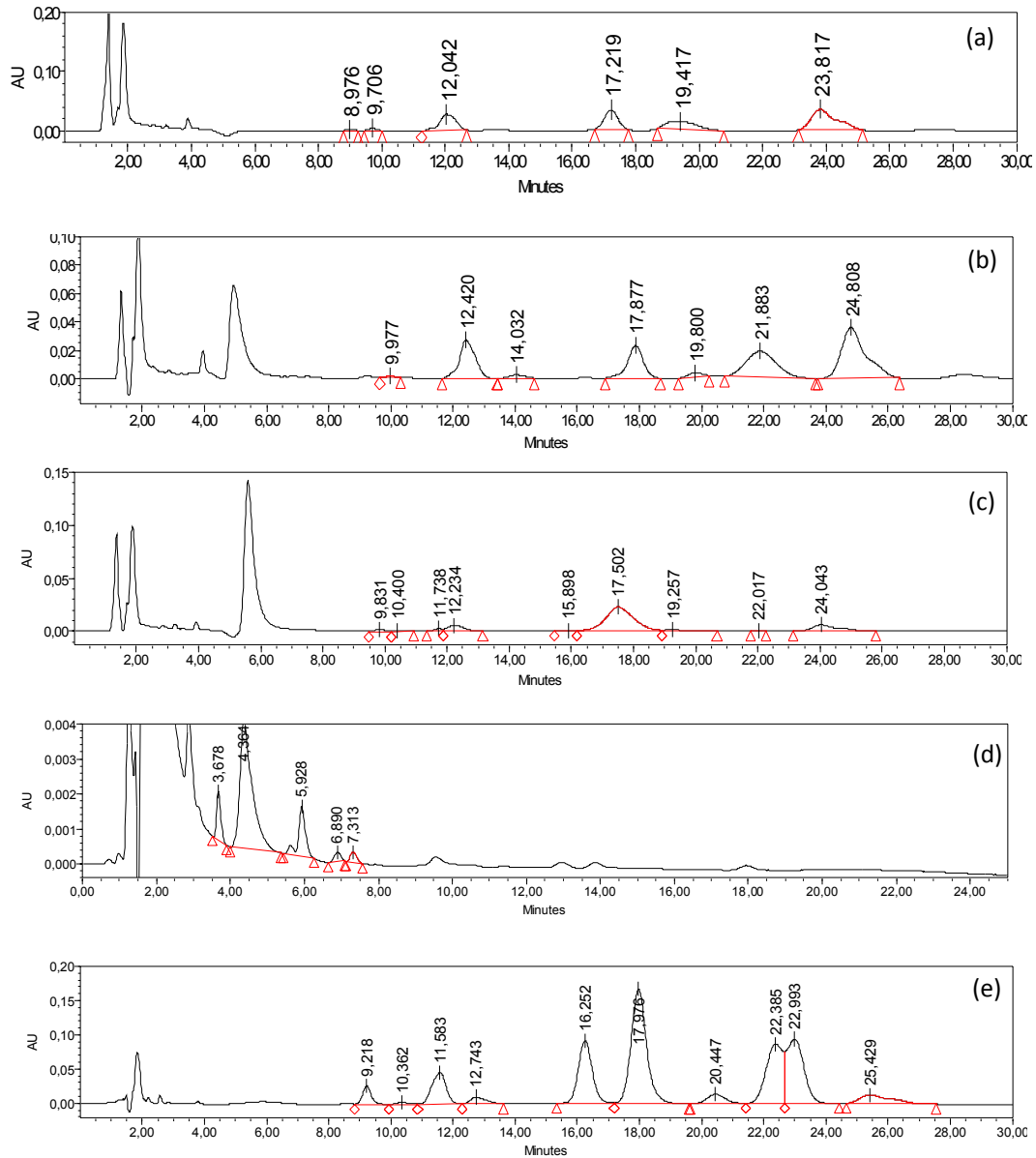


Tabela 4.6 Tensão superficial mínima e redução da tensão superficial do meio de cultivo livre de células obtidas a partir do cultivo em frascos agitados de *B. subtilis* LAMI009 em meio mineral com glicerina como fonte de carbono e energia.

Fonte de nitrogênio	Tensão Superficial Mínima (mN/m)
(NH ₄) ₂ SO ₄	29,68 ± 0,2
NH ₄ NO ₃	29,93 ± 0,1
NaNO ₃	32,03 ± 0,1

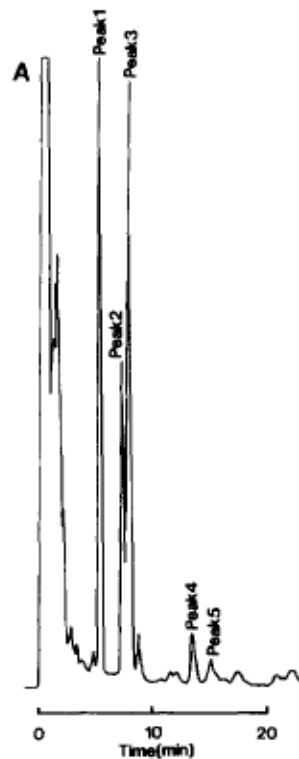
O perfil cromatográfico do lipopeptídeo sintetizado por *B. subtilis* LAMI009 (Figura 4.25) nos cultivos com as diferentes fontes de nitrogênio apresentaram picos característicos de surfactina, comparativamente ao cromatograma da surfactina padrão SIGMA. A surfactina padrão SIGMA apresentou isoformas que eluíram entre 9 e 25 minutos. Pode-se observar que a quantidade e proporção de isoformas variaram com a fonte de nitrogênio utilizada (Figura 4.25). A surfactina obtida a partir dos cultivos com as fontes de nitrogênio contendo nitrato apresentaram sete isoformas comparativamente à obtida com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, que apresentou seis. A análise cromatográfica mostrou também a presença de dois picos com tempos de retenção entre 4 e 6 minutos nos cultivos realizados com NH_4NO_3 e NaNO_3 , que estão assinalados nos respectivos cromatogramas (Figura 4.25). Esse pico pode ser associado à biossíntese de outro lipopeptídeo por *B. subtilis* LAMI009 induzida pela presença de nitrato no meio de cultivo. A influência da composição do meio de cultivo sobre a síntese e excreção de compostos iturínicos foi relatada na literatura (FEIGNIER, BESSON e MICHEL, 1995 e BESSON, CHEVANET e MICHEL, 1987). A fonte de nitrogênio e a presença de cátions divalentes apresentaram grande influência sobre a síntese e excreção de iturina pela linhagem *B. subtilis* avaliada por BESSON, CHEVANET e MICHEL (1987). Portanto, a ausência de picos relacionados à iturina nos cultivos com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pode, também, estar relacionada à não excreção deste antibiótico para o meio de cultivo.

FIGURA 4.25 Cromatogramas obtidos a partir do meio de cultivo livre de células após extração líquido-líquido de lipopeptídeos de acordo com a fonte de nitrogênio: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (a), NH_4NO_3 (b), NaNO_3 (c), iturina padrão Sigma (d) e surfactina padrão Sigma (e).



As Figuras 4.25(d) e 4.26 mostram os cromatogramas da iturina padrão Sigma e deste lipopeptídeo obtido a partir de *B. subtilis* RB14, respectivamente. Ambos os cromatogramas apresentam picos semelhantes aos identificados nos extratos obtidos a partir de *B. subtilis* LAMI009 com tempos de retenção entre 4 e 6 minutos. De acordo com este cromatograma, as isoformas mais abundantes deste lipopeptídeo apresentaram tempos de retenção entre 5 e 10 minutos, semelhante aos picos obtidos neste trabalho (Figuras 4.25b-c), podendo ser atribuídos à síntese de iturina por *B. subtilis* LAMI009.

FIGURA 4.26 Cromatograma dos extratos metanólicos da iturina obtida a partir de *B. subtilis* RB14 (HUANG, ANO, SHODA, 1993).



4.6.2. Avaliação de diferentes concentrações de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Avaliou-se o efeito do aumento da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nos cultivos de *B. subtilis* LAMI009 sobre as cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de substrato e de NH_4^+ , e comportamento do pH. As cinéticas estão apresentadas nas Figuras 4.27 e 4.28.

O crescimento celular foi pouco influenciado pela concentração de N-amônio, cujas densidades celulares máximas foram $1,35 \text{ g/L} \pm 0,1$, $1,4 \text{ g/L} \pm 0,2$ e $1,7 \text{ g/L} \pm 0,02$, quando utilizou-se $1,0 \text{ g/L}$, $2,0 \text{ g/L}$ e $3,7 \text{ g/L}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, respectivamente. Estes cultivos não foram limitados por N-amônio, obtendo-se uma concentração residual de NH_4^+ equivalente a $0,326 \text{ g/L} \pm 0,02$ e $0,733 \text{ g/L} \pm 0,12$, para os cultivos com $2,0 \text{ g/L}$ e $3,7 \text{ g/L}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, respectivamente (Figuras 4.27 e 4.28). O aumento da concentração de N-amônio não influenciou a produção de surfactina (Figuras 4.27 e 4.28), cujo perfil de produção foi semelhante quando utilizou-se $1,0 \text{ g/L}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 4.19).

FIGURA 4.27 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e de NH_4^+ , e comportamento do pH durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 180 rpm e 30°C com glicerina como fonte de carbono e energia e $2,0 \text{ g/L}$ de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

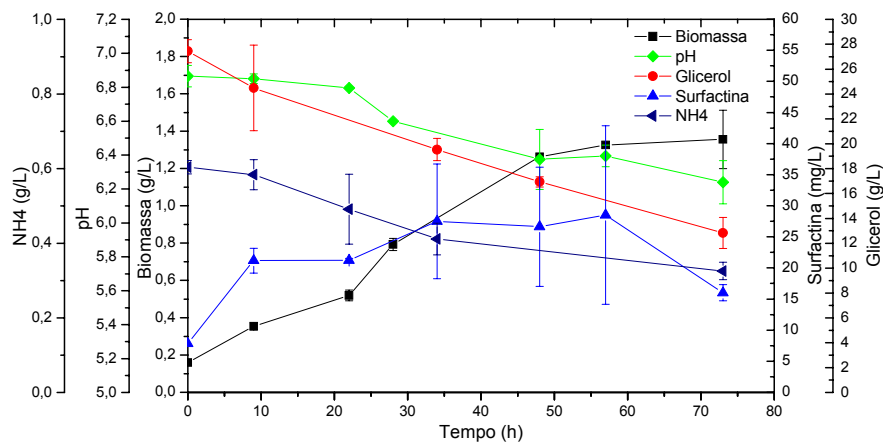
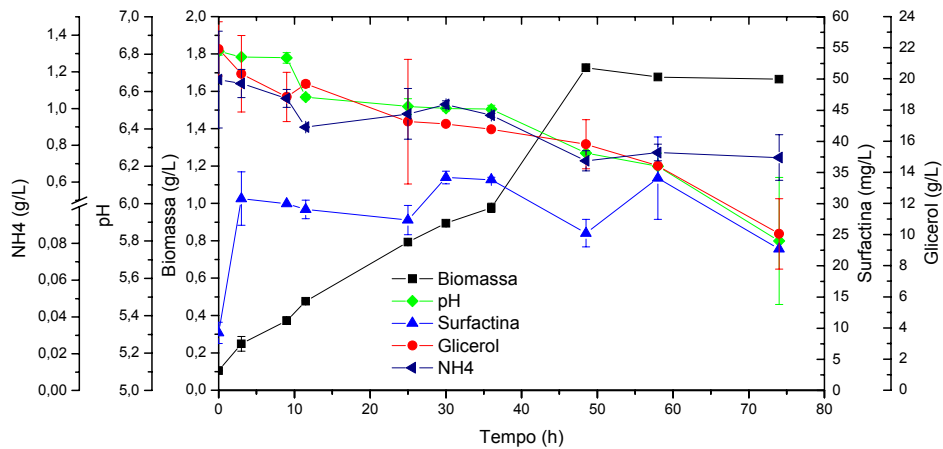


FIGURA 4.28 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e de NH_4^+ , e comportamento do pH durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 180 rpm e 30 °C com glicerina como fonte de carbono e energia e 3,7 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.



A acidificação do meio foi proporcional à concentração inicial de N-amônio (Tabela 4.7). A Tabela 4.7 apresenta o consumo de NH_4^+ e de glicerol e o pH final obtido em função da concentração inicial de nitrogênio. Observou-se que nos cultivos realizados com 2,0 g/L e 3,7 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ houve maior consumo de glicerol, aproximadamente o dobro daquele obtido no cultivo com 1,0 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Tabela 4.7), paralelamente à maior redução do pH do meio de cultivo. Portanto, a acidificação do meio pode estar relacionada ao maior consumo da fonte de carbono. *B. subtilis* pode crescer através de rota fermentativa, na ausência de um aceptor final de elétrons, como o nitrato, sob condições de anaerobiose (NAKANO *et al.*, 1997). Os ácidos orgânicos obtidos como produtos da fermentação acarretaram a redução do pH do meio que foi proporcional ao consumo de glicerol. Portanto, é provável que o glicerol tenha sido assimilado através de rota fermentativa por *B. subtilis* LAMI009.

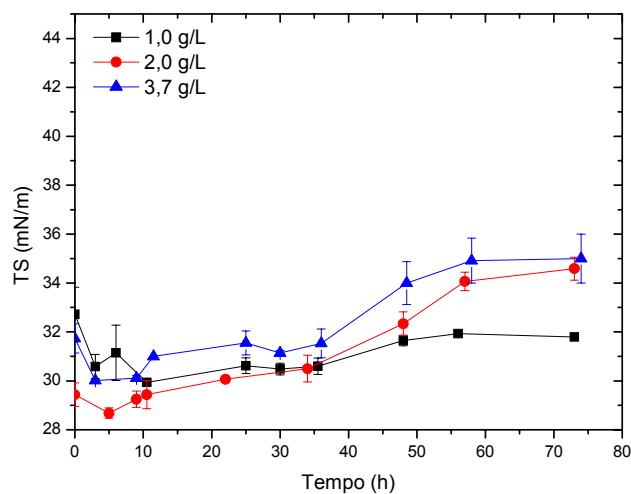
Tabela 4.7 Consumo de NH_4^+ e glicerol, e pH final obtidos nos cultivos de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados durante 72 horas a 30 °C e 180 rpm com diferentes concentrações de nitrogênio.

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	Consumo de NH_4^+ (%)	Consumo de glicerol (%)	pH final
1,0	100,0	25,0	6,55 ± 0,0
2,0	50,4	53,2	6,24 ± 0,1
3,7	36,7	54,2	5,80 ± 0,3

O comportamento da tensão superficial ao longo dos cultivos com variação da concentração de N-amônio apresentou um valor mínimo nos instantes iniciais dos cultivos, seguido de um aumento ao final das 72 horas (Figura 4.29). Este comportamento foi semelhante ao obtido com as demais fontes de nitrogênio (Figura 4.24), entretanto, a variação da concentração de nitrogênio acarretou em um aumento deste efeito. No cultivo com 2,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a tensão superficial variou de 28,7 mN/m ± 0,2 à 34,6 mN/m ± 0,5 e com 3,7 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ variou de 30,0 mN/m ± 0,0 à 35,0 mN/m ± 1,0, comparativamente ao cultivo realizado com 1,0 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, em que se obteve uma variação de 30,5 mN/m ± 0,24 à 31,9 mN/m ± 0,1. O aumento da tensão superficial ao longo dos cultivos foi acompanhada pelo aumento da viscosidade do meio para os cultivos com concentração de N-amônio superior à 1,0 g/L. O aumento da viscosidade pode ser atribuído à produção de algum tipo de polímero pela linhagem *B. subtilis* LAMI009 sob as condições de cultivo avaliadas. Linhagens de *Bacillus* sp., tais como *B. licheniformis*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, são reconhecidamente produtoras do ácido poliglutâmico, um polímero que apresenta diversas propriedades de interesse industrial (BAJAJ e SINGHAL, 2011). A produção deste polímero utilizando glicerol como fonte de carbono foi avaliada por XU *et al.* (2005). Os autores relataram que, ao cultivarem a linhagem *B. subtilis* NX-2 em meio suplementado com glicerol, a produção de ácido poliglutâmico foi semelhante à obtida com as demais fontes de carbono avaliadas.

O efeito do pH sobre a atividade superficial de lipopeptídeos tem sido relatada na literatura (FARIA *et al.*, 2011; ABDEL-MAWGOUD, ABOULWAFa e HASSOUNA, 2008; SHEN, *et al.*, 2011). Soluções de surfactina obtida a partir de cultivos com *B. subtilis* BS5 apresentaram tensão superficial mínima entre pH 5,0 e 7,0, mostrando que, neste intervalo o pH não teve efeito sobre a capacidade da surfactina de reduzir a tensão superficial de soluções aquosas (ABDEL-MAWGOUD, ABOULWAFa e HASSOUNA, 2008). KIM *et al.* (1997) observaram que a tensão superficial de soluções de biosurfactante produzido por *B. subtilis* C9 permaneceu estável na faixa de pH entre 5,0 e 9,5, ocorrendo aumento da tensão apenas em valores de pH que acarretaram a precipitação do biosurfactante.

FIGURA 4.29 Efeito da concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sobre o comportamento da tensão superficial do meio de cultivo livre de células durante o cultivo em frascos agitados de *B. subtilis* LAMI009 a 180 rpm e 30 °C em meio mineral com glicerina como fonte de carbono e energia.



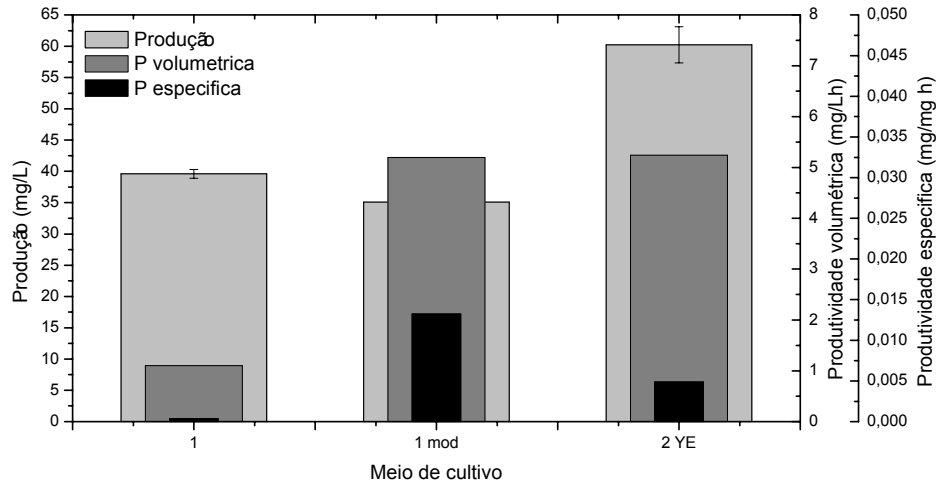
4.6.3. Efeito da Suplementação de Extrato de Levedura em Diferentes Meios de Cultivo

O extrato de levedura constituiu um suplemento necessário para o crescimento do *B. subtilis* LAMI009 em meio mineral contendo glicerina ou glicose como fontes de carbono (item 4.3 Figura 4.17). Para tanto, avaliou-se a suplementação de extrato de

levedura durante a produção de biossurfactantes através de dois meios de cultivo descritos na literatura (MORÁN *et al.*, 2000; SAR e ROSEMBERG, 1983) sobre o crescimento celular, produção de lipopeptídeos e consumo de glicerol durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados.

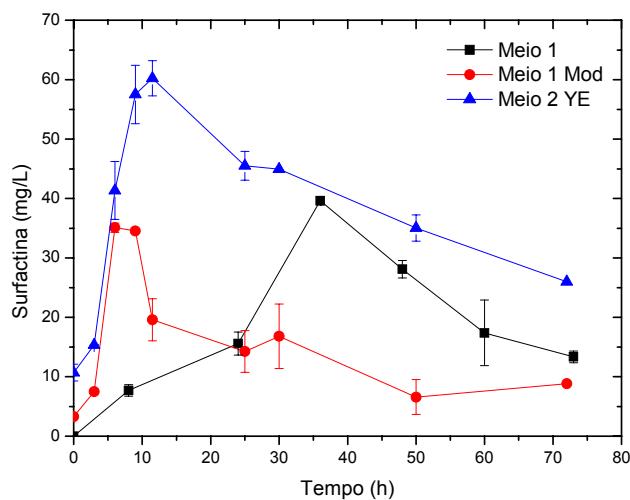
A Figura 4.30 mostra que se obteve maior produção e produtividade com o meio proposto por MORÁN *et al.* (2000) suplementado com 5,0 g/L de extrato de levedura, comparativamente aos demais meios avaliados. O perfil de produção de surfactina ao longo do tempo obtido a partir da linhagem *B. subtilis* LAMI009 está apresentado na Figura 4.31. Em todos os meios houve redução da concentração deste lipopeptídeo, após um dado período. O aumento da concentração do extrato de levedura realizada no meio proposto por SAR e ROSEMBERG (1983) (item 3.5.5), apesar de ter fornecido maiores valores de produtividade volumétrica e de produtividade específica, acarretou a redução da concentração de surfactina (Figura 4.31). Provavelmente, a presença de maior concentração de nitrogênio orgânico fornecido pelos constituintes aminoácidos e peptídeos presentes no extrato de levedura promoveu maior produção de surfactina (Figura 4.30), apesar de ter proporcionado produtividades semelhantes às fontes de nitrogênio inorgânicas (Figura 4.22). A partir de dados da literatura (REIS *et al.*, 2004; ROCHA, 2007; ABDEL-MAWGOUD, ABOULWAFI e HASSOUNA, 2008; LIU *et al.*, 2012), o efeito da suplementação de extrato de levedura sobre a produção de surfactina mostrou ser função intrínseca da linhagem. REIS *et al.* (2004) observaram que a suplementação não favoreceu a produção de biossurfactante por *B. subtilis* ATCC 6633, exercendo maior efeito sobre o crescimento celular. Resultado semelhante foi relatado por ABDEL-MAWGOUD, ABOULWAFI e HASSOUNA (2008) ao avaliarem diversas fontes de nitrogênio, dentre elas extrato de levedura, peptona e triptona, sobre a produção de surfactina por *B. subtilis* BS5, obtendo melhores resultados com NaNO₃. ROCHA (2007), entretanto, obteve maior redução da tensão superficial e, conseqüentemente, maior produção de biossurfactantes ao cultivar *B. subtilis* LAMI007 em meio de cultivo formulado com suco de caju e suplementado com 5,0 g/L de extrato de levedura. LIU *et al.* (2012) observaram que a presença dos aminoácidos durante o cultivo de *B. subtilis* TD7 influenciou o tipo e a proporção de isoformas de surfactina, porém não avaliaram seu efeito sobre a produtividade.

FIGURA 4.30 Influência de diferentes meios de cultivo e suplementação de extrato de levedura sobre a produtividade volumétrica, produção de surfactina e o fator de conversão biomassa em produto ($Y_{P/X}$) a partir de cultivos em frascos agitados de *B. subtilis* LAMI009 a 180 rpm e 30 °C.



Legenda: Meio 1 – meio proposto por SAR e ROSEMBERG (1983), Meio 1 Mod – meio proposto por SAR e ROSEMBERG com 0,8 g/L de extrato de levedura, Meio 2 YE – meio proposto por MORÁN (2000) suplementado com 5,0 g/L de extrato de levedura.

FIGURA 4.31 Influência do meio de cultivo sobre o comportamento da produção de surfactina durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados a 180 rpm e 30 °C.

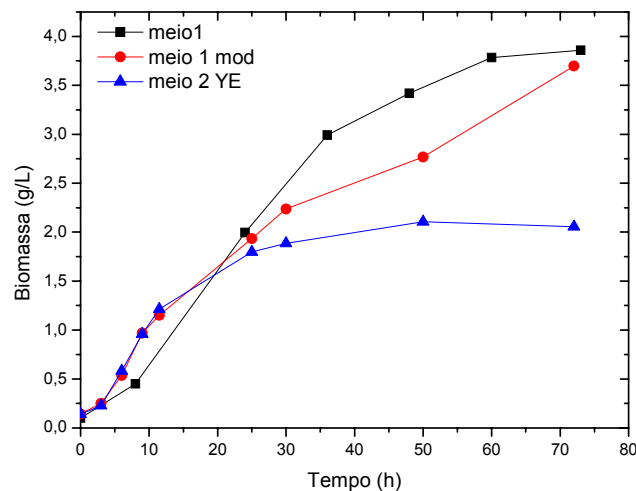


Legenda: Meio 1 – meio proposto por SAR e ROSEMBERG (1983), Meio 1 Mod – meio proposto por SAR e ROSEMBERG com 0,8 g/L de extrato de levedura, Meio 2 YE – meio proposto por MORÁN (2000) suplementado com 5,0 g/L de extrato de levedura.

O crescimento celular apresentou comportamento contrário ao verificado sobre a produção de surfactina. Houve maior crescimento celular com os meios de cultivo propostos por SAR e ROSEMBERG (1983) (meio 1 e 1 modificado), $3,86 \text{ g/L} \pm 1,4$ e $3,69 \text{ g/L} \pm 1,4$, respectivamente, em que a concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ foi maior ($4,0 \text{ g/L}$) do que no meio proposto por MORÁN *et al.* (2000), em que a densidade celular foi equivalente a $2,10 \text{ g/L} \pm 0,5$ (Figura 4.32). O acompanhamento de NH_4^+ ao longo dos cultivos com o meio 1 modificado e o meio 2 YE mostrou que houve consumo deste no primeiro meio, mas no segundo a concentração de NH_4^+ praticamente não variou (Figura 4.33), o que provavelmente ocorreu devido ao consumo preferencial de fontes de nitrogênio orgânicas, como aminoácidos, principalmente glutamina, por espécies de *B. subtilis*, oriundos do extrato de levedura (FISHER e SONENSHEIN, 1991).

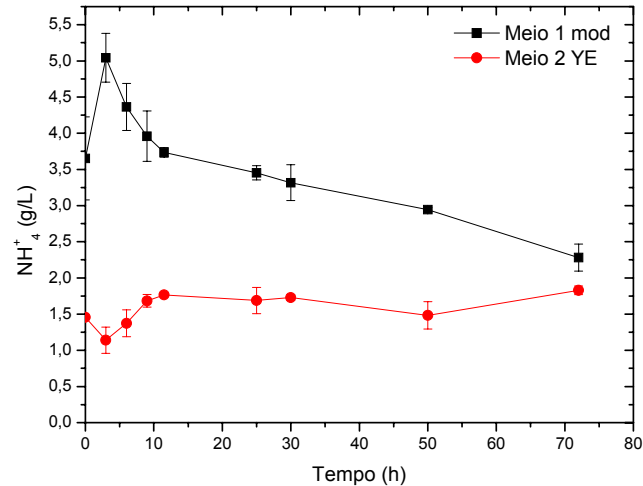
O consumo de glicerol foi proporcional ao crescimento celular, atingindo $60,8 \%$ para o meio 1 modificado e $45,1 \%$ para o meio 2 YE, indicando que este substrato foi utilizado, principalmente, como fonte de energia para o crescimento do microrganismo (SYLDATK e WAGNER, 1987).

FIGURA 4.32 Influência do meio de cultivo sobre o crescimento celular de *B. subtilis* LAMI009 ao longo de 72 horas de cultivo em frascos agitados a 180 rpm e $30 \text{ }^\circ\text{C}$.



Legenda: Meio 1 – meio proposto por SAR e ROSEMBERG (1983), Meio 1 Mod – meio proposto por SAR e ROSEMBERG com $0,8 \text{ g/L}$ de extrato de levedura, Meio 2 YE – meio proposto por MORÁN (2000) suplementado com $5,0 \text{ g/L}$ de extrato de levedura.

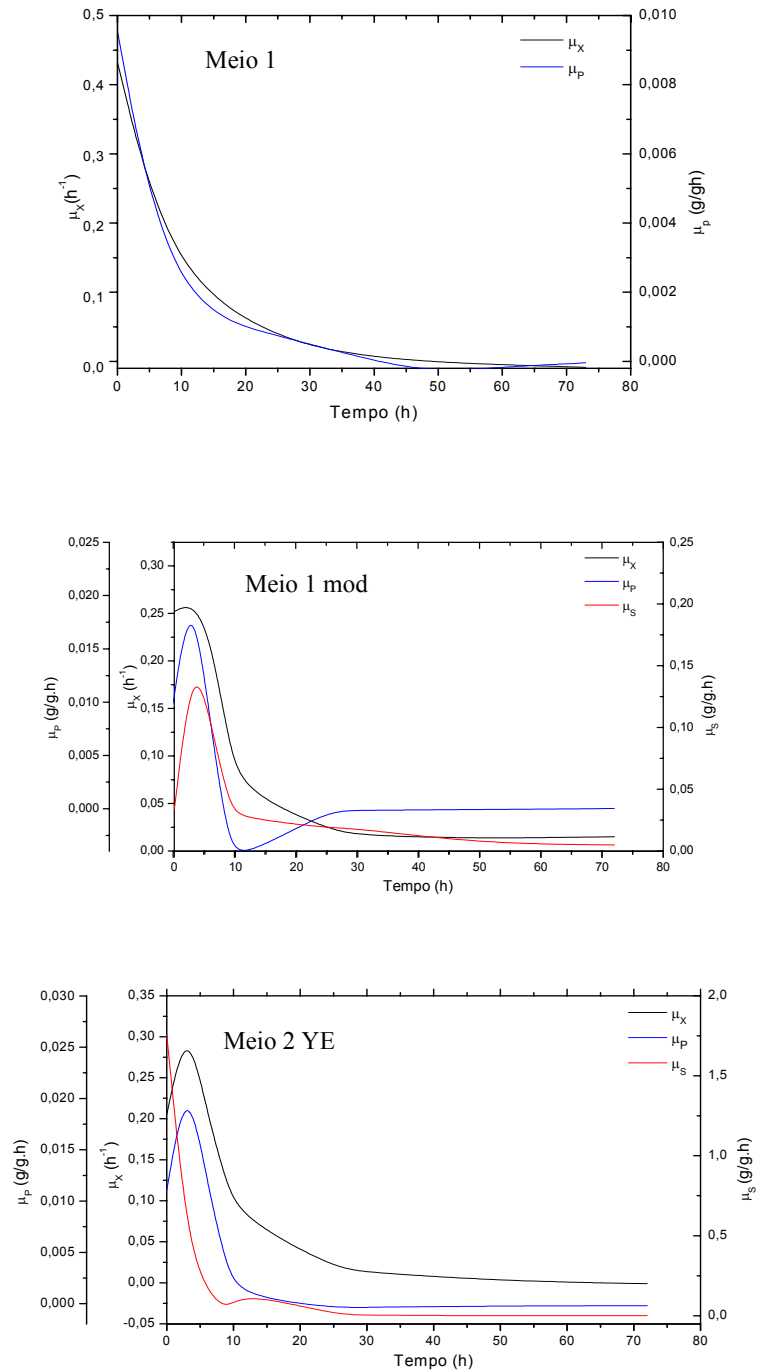
FIGURA 4.33 Comportamento do consumo de NH_4^+ ao longo do cultivo de *B. subtilis* LAMI009 a 180 rpm e 30 °C em frascos agitados e em diferentes meios de cultivo.



Legenda: Meio 1 – meio proposto por SAR e ROSEMBERG (1983), Meio 1 Mod – meio proposto por SAR e ROSEMBERG com 0,8 g/L de extrato de levedura, Meio 2 YE – meio proposto por MORÁN (2000) suplementado com 5,0 g/L de extrato de levedura.

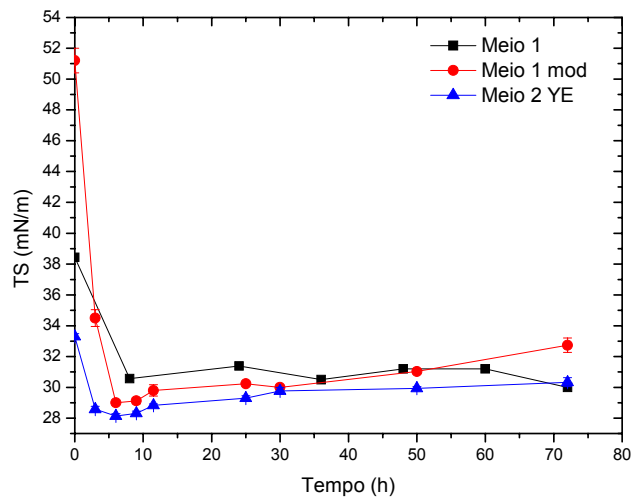
A análise das velocidades específicas de crescimento celular e de formação do produto mostrou que a surfactina foi sintetizada como um metabólito primário por *B. subtilis* LAMI009, para todos os meios de cultivo utilizados (Figura 4.34). Este resultado está de acordo com SOUSA *et al.* (2012) que indicou a síntese de surfactina associada ao crescimento ao cultivar a mesma linhagem em meio contendo glicerina como fonte de carbono e energia.

FIGURA 4.34 Comportamento das velocidades específicas de crescimento celular e de produção de surfactina ao longo do cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados a 180 rpm e 30 °C em função de diferentes meios de cultivo.



A tensão superficial mostrou comportamento semelhante ao obtido nos cultivos com as fontes de nitrogênio inorgânicas (Figura 4.35). A concentração de extrato de levedura influenciou a tensão superficial do meio livre de células, como mostrado na Tabela 4.8, cujo aumento acarretou em menor tensão em ambos os meios avaliados. A tensão superficial inferior a 29,0 mN/m com o meio proposto por MORÁN suplementado com extrato de levedura indicou que o biossurfactante sintetizado por *B. subtilis* LAMI009 é bastante efetivo nas condições avaliadas (NITSCHKE *et al.*, 2005).

FIGURA 4.35 Comportamento da tensão superficial do meio livre de células durante o cultivo em frascos agitados de *B. subtilis* LAMI009 a 180 rpm e 30 °C em meios de cultivo suplementados com extrato de levedura.



Legenda: Meio 1 – meio proposto por SAR e ROSEMBERG (1983), Meio 1 Mod – meio proposto por SAR e ROSEMBERG com 0,8 g/L de extrato de levedura, Meio 2 YE – meio proposto por MORÁN (2000) suplementado com 5,0 g/L de extrato de levedura.

Tabela 4.8 Tensão superficial mínima e redução da tensão superficial do meio de cultivo livre de células obtidas a partir do cultivo em frascos agitados de *B. subtilis* LAMI009 em meios de cultivo suplementados com extrato de levedura.

Meio de cultivo	Extrato de levedura (g/L)	Tensão Superficial Mínima (mN/m)
Meio SAR e ROSEMBERG	0,4	30,5 ± 0,1
Meio SAR e ROSEMBERG modificado	0,8	29,0 ± 0,0
Meio proposto por MORÁN	0,0	29,7 ± 0,2
Meio proposto por MORÁN	5,0	28,1 ± 0,2

De acordo com os resultados de produção, produtividade e atividade tensoativa (tensão superficial) obtidos com o meio proposto por MORÁN suplementado com extrato de levedura observou-se que este apresentou os melhores resultados frente aos demais meios avaliados (Figura 4.30 e Tabela 4.8). Assim, este meio de cultivo foi selecionado para os demais experimentos.

4.7. Pesquisa de Genes *sfp*, *lpa14* e *ituD*

De acordo com análise do perfil cromatográfico do biossurfactante bruto produzido por *B. subtilis* LAMI009, foi realizada uma pesquisa de genes específicos relacionados à biossíntese de lipopeptídeos. A pesquisa de genes mostrou que a cepa *B. subtilis* LAMI009 foi negativa para o gene *sfp*, responsável pela produção de surfactina, e positiva para os genes *lpa14* (BARRETO, 2011) e *ituD* (dados não mostrados). A presença destes genes (*lpa14* e *ituD*) indicou o potencial desta linhagem em co-produzir os lipopeptídeos iturina e surfactina (HUANG, ANO e SHODA, 1993; FEIGNIER, BESSON e MICHEL, 1995; HSIEH *et al.*, 2008). Entretanto, a avaliação da expressão destes genes através do perfil cromatográfico do biossurfactante bruto mostrou que as

condições nutricionais influenciaram a biossíntese e/ou excreção de iturina, sendo dependente da fonte de nitrogênio utilizada (Figura 4.26).

4.8. Efeito do Inóculo sobre os Cultivos de *B. subtilis* LAMI009

O tamanho do inóculo e seu estado fisiológico influenciam diretamente o comprimento da fase lag e, portanto, o crescimento celular e a produtividade de metabólitos de interesse industrial, principalmente, quando se trata de bactérias esporulantes como *B. subtilis* (SEN e SWAMINATHAN, 2004). Desta forma, avaliou-se o tamanho do inóculo sobre as cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e comportamento do pH (Figuras 4.36 a 4.38).

FIGURA 4.36 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e comportamento do pH (A) e comportamento das velocidades específicas (B) durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados a 180 rpm e 30 °C em meio proposto por MORÁN (2000) suplementado com extrato de levedura e 0,5 % de inóculo.

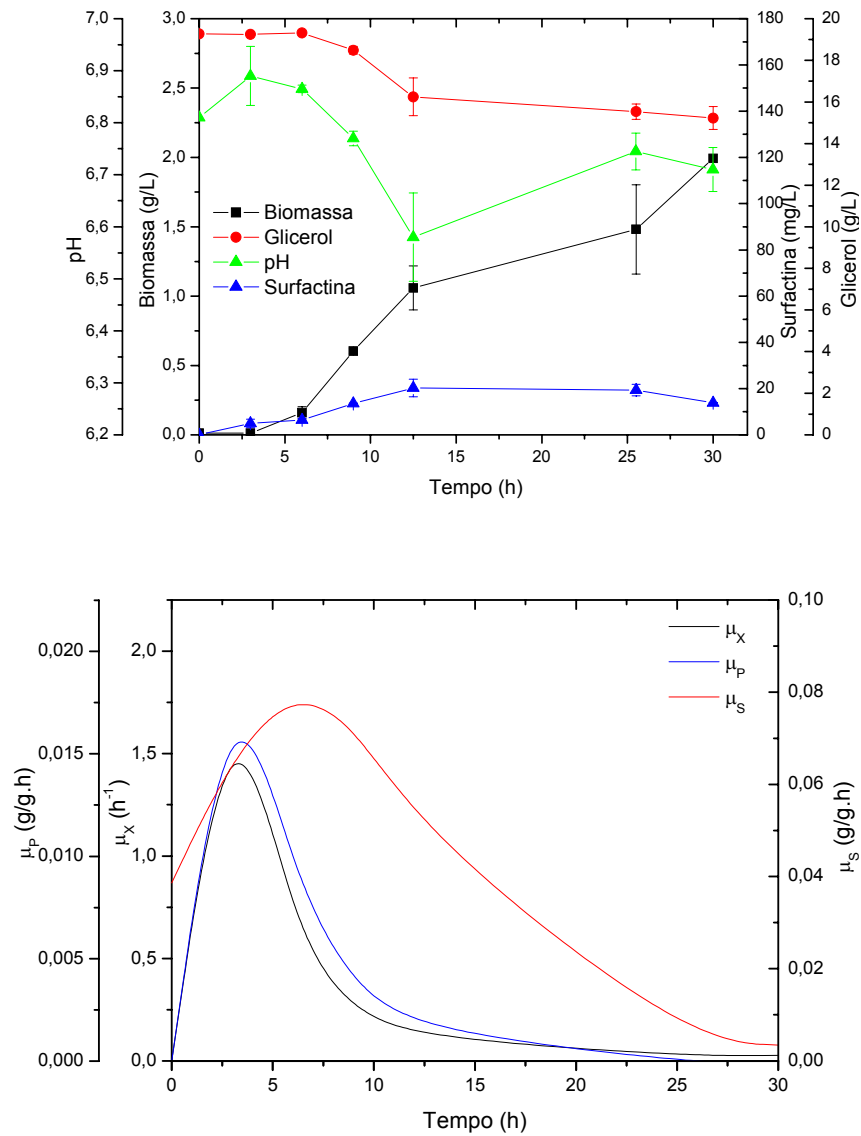


FIGURA 4.37 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e comportamento do pH (A) e comportamento das velocidades específicas (B) durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados a 180 rpm e 30 °C em meio proposto por MORÁN (2000) suplementado com extrato de levedura e 2,0 % de inóculo.

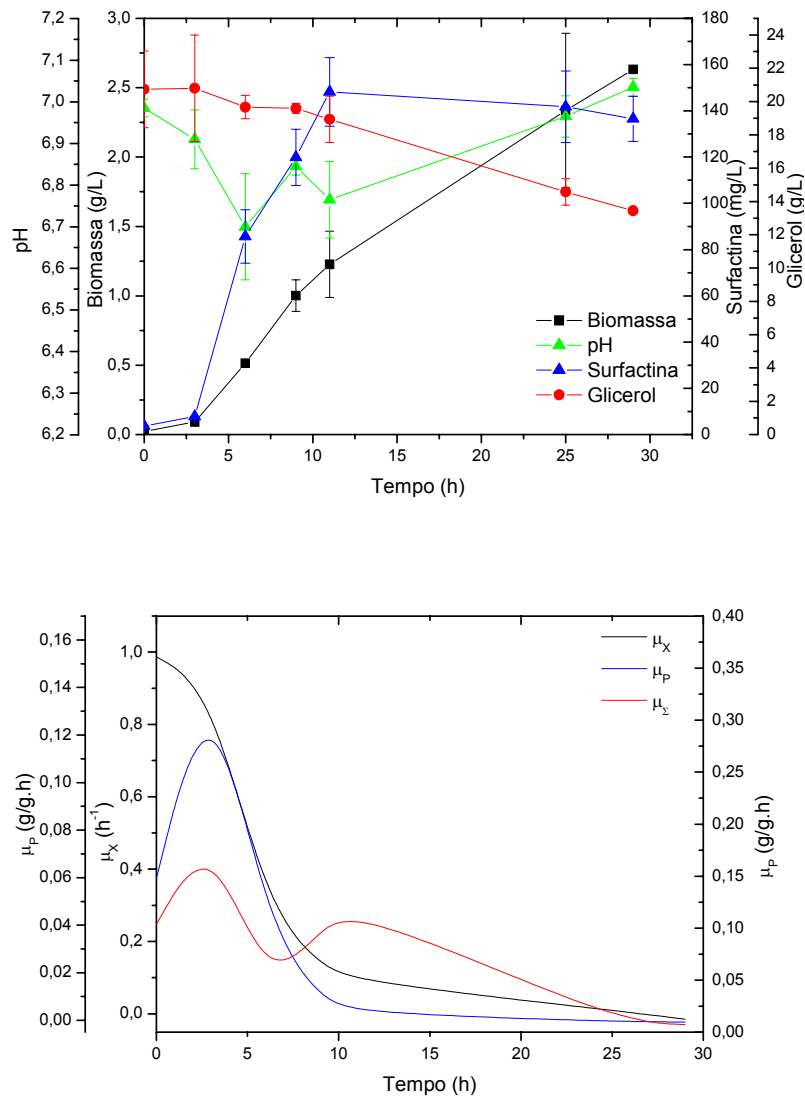
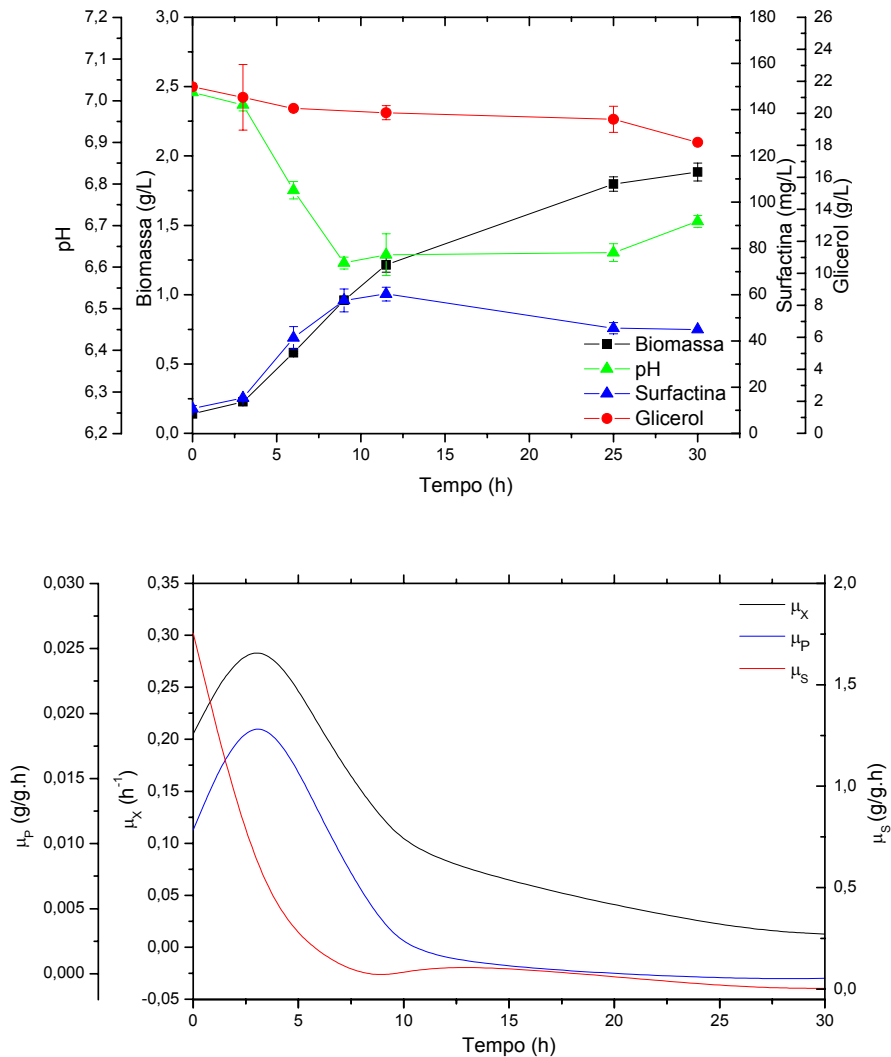


FIGURA 4.38 Cinéticas de crescimento celular, produção de surfactina, consumo de glicerol e comportamento do pH (A) e comportamento das velocidades específicas (B) durante o cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados a 180 rpm e 30 °C em meio proposto por MORÁN (2000) suplementado com extrato de levedura e 10,0 % de inóculo.



Observou-se que houve grande efeito sobre a produção de surfactina. A Tabela 4.9 mostra o efeito do tamanho do inóculo sobre os parâmetros de fermentação obtidos durante os cultivos. A utilização de 2 % de inóculo apresentou maior eficiência, de acordo com os parâmetros avaliados (Tabela 4.9), bem como mostrou o potencial da

linhagem em produzir este lipopeptídeo. Em todos os cultivos a síntese de surfactina ocorreu no início da fase exponencial de crescimento (Figuras 4.36(a) a 4.38(a)), mostrando um comportamento predominantemente de metabólito primário. A análise das velocidades específicas confirma este comportamento (Figuras 4.36b a 4.38b).

Tabela 4.9 Parâmetros de fermentação em função do tamanho do inóculo a partir de cultivos em frascos agitados de *B. subtilis* LAMI009 a 180 rpm e 30 °C.

Tamanho do Inóculo (%)	Produção (mg/L)	Produtividade volumétrica (mg/Lh)	Produtividade específica (mg/mg h)
0,5	20,3 ± 3,8	1,62	0,00155
2,0	148, 2 ± 14,8	14,22	0,01452
10,0	60,2 ± 2,9	5,20	0,00636

O consumo de glicerol foi proporcional ao tamanho do inóculo variando de 18,0 % a 37,7 %. A densidade celular não apresentou variação significativa (Tabela 4.10). Obteve-se $Y_{P/X}$ calculado equivalente à 0,130 g/g para o cultivo com 2 % de inóculo (Tabela 4.10). Este valor foi superior ao relatado por DAVIS *et al.* (1999), que obteve $Y_{P/X}$ igual a 0,075 g/g durante o cultivo em biorreator de *B. subtilis* ATCC 21332 sob condições limitantes de oxigênio dissolvido e limitado por nitrato.

Tabela 4.10 Densidade celular, consumo de substrato e fator de conversão biomassa produto em função do tamanho do inóculo a partir de cultivos em frascos agitados de *B. subtilis* LAMI009 a 180 rpm e 30 °C.

Tamanho do Inóculo (%)	Biomassa (g/L)	Consumo de glicerol (%)	$Y_{P/X}$ (g/g)
0,5	2,0 ± 0,2	21,2	0,022
2,0	2,4 ± 0,1	37,7	0,130
10,0	2,1 ± 0,5	18,0	0,057

O comportamento da tensão superficial do meio de cultivo livre de células ao longo dos cultivos de *B. subtilis* LAMI009 em função do inóculo está apresentado na Figura 4.39. Observou-se que a redução da tensão foi proporcional à produção de surfactina ao longo do tempo. No cultivo com 0,5 % de inóculo houve uma queda gradativa da tensão superficial, atingindo um mínimo com 12 horas de cultivo, instante no qual se obteve maior concentração de surfactina. A Tabela 4.11 apresenta os valores mínimos de tensão superficial e a concentração de surfactina correspondente. Esta correlação forneceu um indicativo da concentração micelar crítica (CMC), um parâmetro que indica a eficiência do surfactante (ROSEN, 2004). Observou-se que, no cultivo com 0,5 % de inóculo, a tensão superficial atingiu um mínimo com concentração de surfactina igual a 20,0 mg/L, aproximadamente (Tabela 4.11), mantendo-se constante até o final do cultivo. Portanto, pode-se inferir que a concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante produzido por *B. subtilis* LAMI009 no meio de cultivo livre de células apresentou valor próximo à 20 mg/L. Os valores de CMC para surfactina relatados na literatura podem variar de 10 mg/L a 100 mg/L (FOX e BALA, 2000; YEH *et al.*, 2005). SEN e SWAMINATHAN (2005) relataram CMC equivalente à 17 mg/L de surfactina purificada obtida a partir de *B. subtilis* DSM 3256. BARROS *et al.* (2008) obtiveram CMC igual a 11 mg/L a partir de cultivos de *B. subtilis* LB5a utilizando o efluente do processo de produção de farinha de mandioca como substrato. SOUSA *et al.* (2009) obtiveram CMC equivalente à 20,7 mg/L ao cultivar *B. subtilis* LAMI005 em meio de cultivo com glicerina como fonte de carbono. Portanto, o biossurfactante produzido pela linhagem utilizada neste trabalho e com glicerina como fonte de carbono e energia foi equivalente em eficiência aos biossurfactantes relatados na literatura.

FIGURA 4.39 Influência do tamanho do inóculo sobre o comportamento da tensão superficial do meio livre de células durante o cultivo em frascos agitados de *B. subtilis* LAMI009 a 180 rpm e 30 °C.

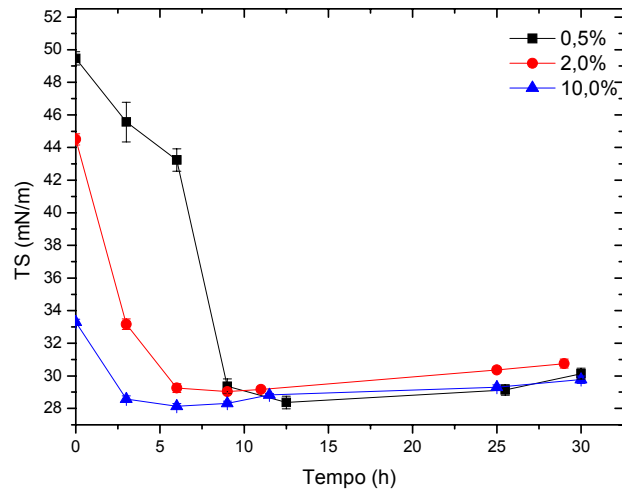


Tabela 4.11 Tensão superficial mínima do meio de cultivo livre de células e concentração de surfactina obtidas a partir do cultivo em frascos agitados de *B. subtilis* LAMI009 em meios de cultivo suplementados com extrato de levedura.

Tamanho do Inóculo (%)	Tensão Superficial Mínima (mN/m)	Surfactina (mg/L)
0,5	28,4 ± 0,4	20,25 ± 3,8
2,0	29,0 ± 0,1	131,67 ± 11,6
10,0	28,1 ± 0,2	41,35 ± 4,9

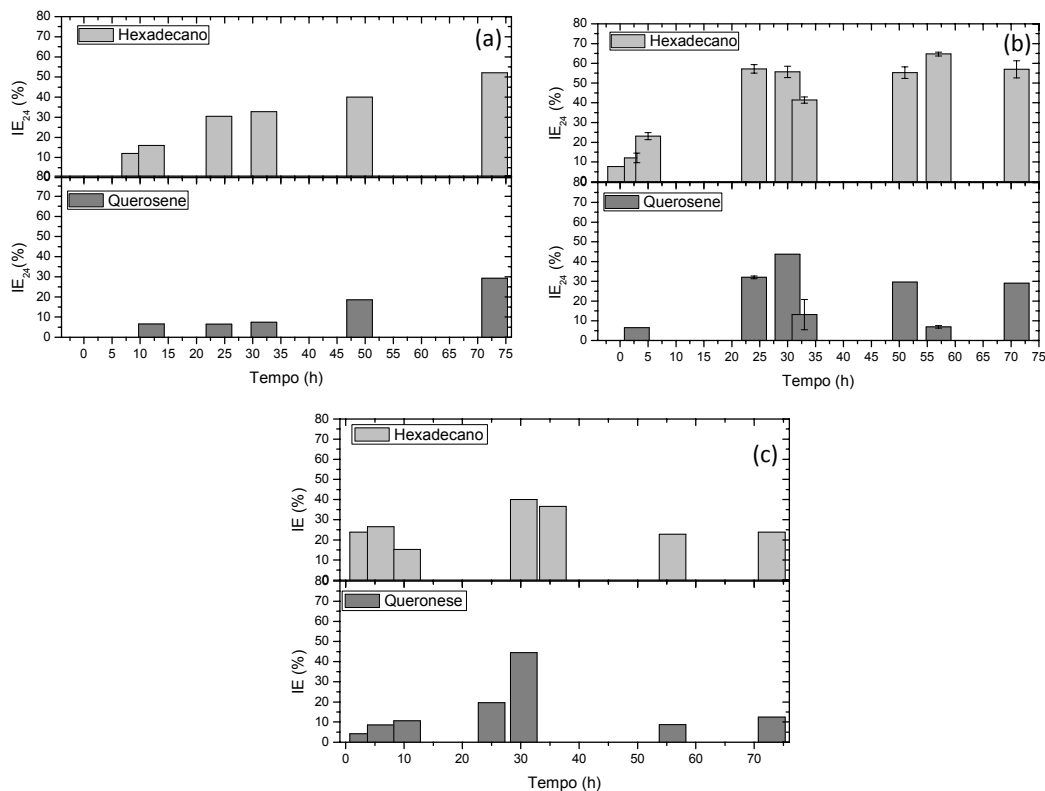
4.9. Avaliação da Capacidade Emulsificante e Estabilidade de Emulsões em Solução Aquosa do Biossurfactante Bruto

A capacidade de emulsificar hidrocarbonetos indica o potencial que biossurfactantes apresentam para uso em biorremediação de áreas contaminadas através do aumento da biodisponibilidade de contaminantes (FRANCY *et al.*, 1991; RON e ROSENBERG, 2001). Além disso, o uso de bioemulsificantes capazes de estabilizar emulsões implica em sua utilização para formulação de emulsões voltadas para a indústria do petróleo (VAN DYKE *et al.*, 1991).

Desta forma, avaliou-se a capacidade de emulsificar hidrocarbonetos do meio de cultivo livre de células ao longo dos cultivos de *B. subtilis* LAMI009. A Figura 4.40 mostra a capacidade emulsificante durante os cultivos em função das diferentes fontes de nitrogênio. O índice de emulsificação (IE_{24}) ao longo do cultivo realizado com $NaNO_3$ mostrou-se estável e crescente, obtendo-se $52,9 \% \pm 3,0$ e $29,3 \% \pm 1,0$ com N-hexadecano e querosene, respectivamente. O IE_{24} obtido a partir dos cultivos com NH_4NO_3 foram $58,3 \% \pm 4,5$ com N-hexadecano, obtendo-se maior emulsificação a partir de 25 horas de cultivo. Entretanto, o IE_{24} com querosene apresentou maior valor, equivalente a $43,8 \% \pm 1,6$, com 30 horas de cultivo. Nos cultivos com $(NH_4)_2SO_4$ obteve-se os maiores valores de IE_{24} , equivalentes a $40,0 \% \pm 3,4$ e $44,5 \% \pm 5,1$ com N-hexadecano e querosene, respectivamente, com 30 horas de cultivo observando-se uma redução da capacidade emulsificante e, conseqüentemente, maior instabilidade das emulsões após este período para ambos os óleos. Portanto, observou-se que a capacidade emulsificante foi influenciada pela fonte de nitrogênio e pelo tempo de cultivo. Este comportamento pode ser atribuído à biossíntese de diferentes isoformas de surfactina e à presença de outro lipopeptídeo, provavelmente, a iturina, nos cultivos com $NaNO_3$ e NH_4NO_3 , que apresentaram os melhores resultados. Estudo realizado sobre misturas de surfactina e iturina mostraram que estes lipopeptídeos são capazes de formar micelas mistas quando a solução contém uma baixa proporção de surfactina (RAZAFINDRALAMBO *et al.*, 1997), acarretando aumento da estabilidade de emulsões. REIS, SÉRVULO e FRANÇA (2004) obtiveram IE_{24} equivalente a $57,4 \%$ com querosene e sobrenadante livre de células obtido a partir do cultivo de *B. subtilis* ATCC 6633 em meio mineral suplementado com caldo de cana-de-açúcar. As capacidades emulsificantes da solução de biossurfactante purificado obtido a partir do

cultivo de *B. subtilis* LSFM-05 com glicerina como fonte de carbono foram equivalentes a 59,1 % e 55,0 % com querosene e hexadecano, respectivamente (FARIA, *et al.*, 2011). O sobrenadante livre de células obtido a partir do cultivo de *Bacillus licheniformis* P40 atingiu $IE_{24} = 35,0$ % com querosene, quando cultivado em caldo TSB (Caldo soja tripticase). Assim, observou-se que as capacidades emulsificantes obtidas neste trabalho foram equivalentes à relatada na literatura com diferentes espécies de *Bacillus*.

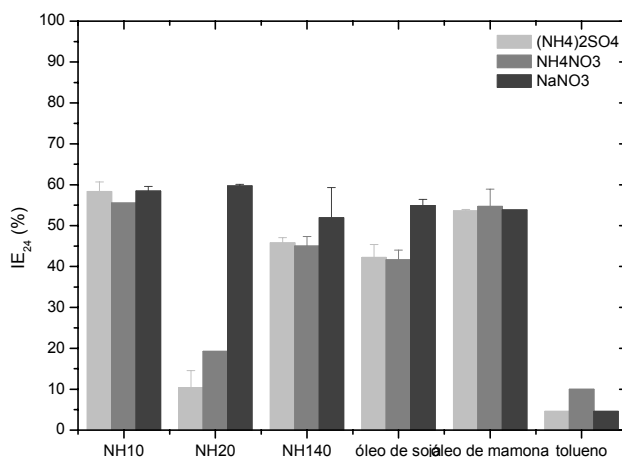
FIGURA 4.40 Capacidade emulsificante (IE_{24}) do meio de cultivo livre de células ao longo dos cultivos de *B. subtilis* LAMI009 com diferentes fontes de nitrogênio: (a) $NaNO_3$, (b) NH_4NO_3 , (c) $(NH_4)_2SO_4$.



A fim de avaliar o espectro da capacidade emulsificante dos lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis* LAMI009 no meio de cultivo livre de células, foram testados óleos de origem mineral naftênica (NH10, NH20 e NH140) e aromática (tolueno) e óleos de origem vegetal (soja e mamona), cujos resultados estão apresentados na Figura 4.41. Os resultados mostraram que o sobrenadante livre de células obtido a partir do

cultivo com NaNO_3 foi capaz de emulsificar, com $\text{IE}_{24} \geq 55,0\%$, todos os óleos avaliados, com exceção do tolueno, que não apresentou emulsão estável com nenhum dos sobrenadantes. O meio de cultivo livre de células obtido com NH_4NO_3 apresentou capacidade de emulsificação dos óleos avaliados semelhante ao obtido com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Figura 4.41).

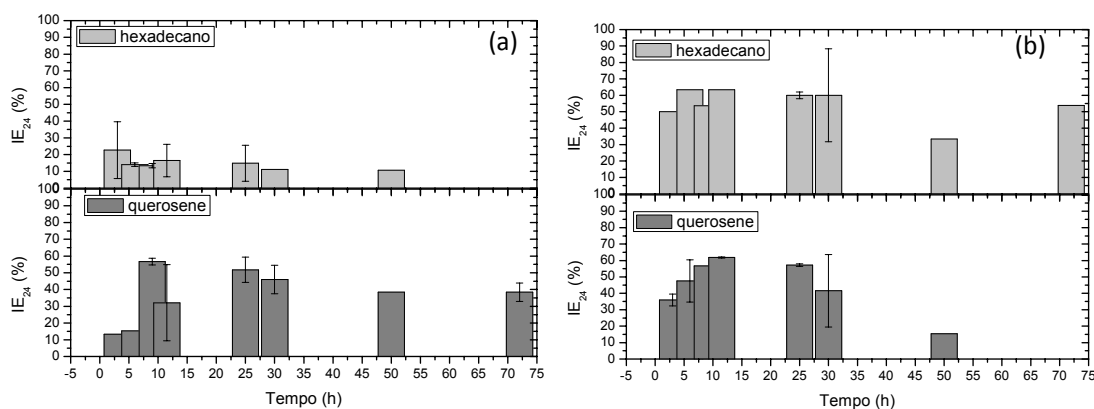
FIGURA 4.41 Capacidade emulsificante (IE_{24}) do meio de cultivo livre de células após 48 horas de cultivo de *B. subtilis* LAMI009 com diferentes fontes de nitrogênio.



A Figura 4.42 mostra o comportamento da capacidade emulsificante dos sobrenadantes livres de células obtidos a partir de cultivos com os meios suplementados com extrato de levedura. No meio de cultivo proposto por MORÁN *et al.* (2000), a suplementação com extrato de levedura acarretou um aumento da capacidade emulsificante de 40,0 % para 63,3 % \pm 0,0 e de 44,5 % para 61,8 % \pm 0,4 com N-hexadecano e querosene, respectivamente, comparativamente ao meio não suplementado (Figuras 4.42(a) e 4.42(b)). A obtenção de emulsões mais estáveis pode estar relacionada ao aumento da concentração de surfactina no meio de cultivo devido à suplementação com extrato de levedura (Figura 4.42). A Figura 4.42 mostra que o comportamento da capacidade emulsificante em função do tempo de cultivo apresentou maiores valores de IE_{24} no início do cultivo coincidindo com as maiores concentrações de surfactina (Figura 4.31). Observou-se, a partir da Figura 4.42(a), que o sobrenadante livre de células obtido a partir do cultivo de *B. subtilis* LAMI009 apresentou capacidade emulsificante com N-hexadecano inferior à obtida com o meio proposto por MORÁN *et*

al. (2000) (Figura 4.42(b)). Entretanto, houve uma pequena diferença no IE_{24} quando querosene foi utilizado, cujos valores foram equivalentes a $56,7 \% \pm 2,0$ e $61,8 \% \pm 0,4$, com os meios propostos por SAR e ROSEMBERG (1983) e MORÁN *et al.* (2000) suplementado com extrato de levedura, respectivamente (Figura 4.42).

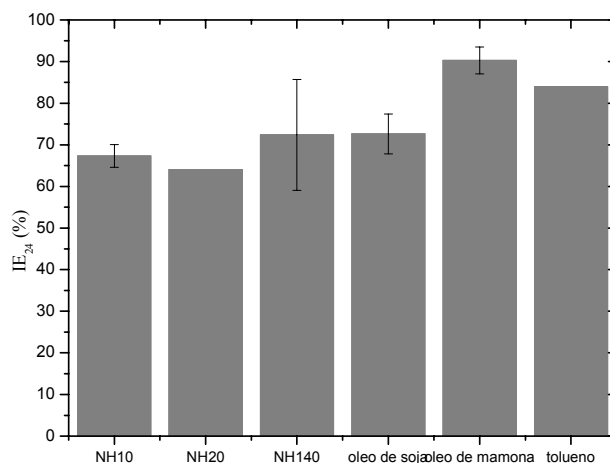
FIGURA 4.42 Capacidade emulsificante (IE_{24}) do meio de cultivo livre de células ao longo do cultivo de *B. subtilis* LAMI009 em frascos agitados a 180 rpm e 30 °C em (a) meio proposto por SAR e ROSEMBERG (1983) modificado e em (b) meio proposto por MORÁN (2000) suplementado com 5,0 g/L de extrato de levedura.



A capacidade emulsificante da solução aquosa de biossurfactante bruto, contendo 0,3 g/L de surfactina, obtida por precipitação ácida, foi avaliada com diferentes óleos (Figura 4.43). Observou-se que houve aumento da capacidade emulsificante para todos os óleos, comparativamente às obtidas com o meio de cultivo livre de células (Figura 4.41). A solução aquosa do biossurfactante bruto apresentou $IE_{24} \geq 75,0 \%$ com a maior parte dos óleos avaliados (Figura 4.43), inclusive com o tolueno, que não tinha apresentado emulsão estável com o sobrenadante livre de células (Figura 4.41). A redução de possíveis interferentes do meio de cultivo, o pH da solução formulada e a concentração de surfactina são fatores que podem ter influenciado a obtenção de emulsões mais estáveis. O meio de cultivo apresenta uma composição diversificada em termos de metabólitos sintetizados pelo próprio microrganismo, como peptídeos, ácidos orgânicos, proteínas e surfactina, e pela presença de diferentes sais oriundos do meio de cultivo que contribuem para a sua força iônica (CHEN e JUANG, 2008). Assim, esta composição resulta em uma interferência sobre a estabilidade de emulsões formadas

pelo meio de cultivo livre de células. Os resultados de capacidade emulsificante do biossurfactante bruto produzido por *B. subtilis* LAMI009 foram melhores do que valores relatados na literatura. FARIA *et al.* (2011) obtiveram $IE_{24} = 49,6 \% \pm 1,4$ com tolueno e solução de 1,0 g/L de surfactina purificada obtida a partir de *B. subtilis* LSFM-05 cultivado em meio suplementado com glicerina, comparativamente ao obtido neste trabalho que foi equivalente a 84,0 %. A capacidade emulsificante do biossurfactante semipurificado, obtido a partir de *B. subtilis* LB5a cultivado em meio formulado com manipueira, foi equivalente a 70,0 % com óleo de soja (BARROS, QUADROS e PASTORE, 2008), inferior ao obtido pela solução de surfactina bruta de *B. subtilis* LAMI009 (Figura 4.43).

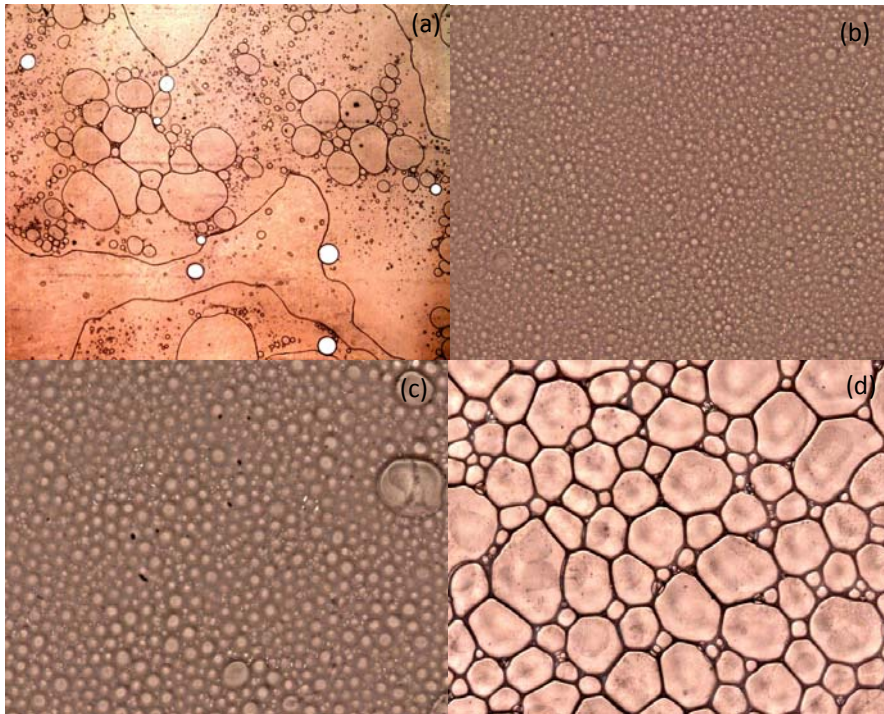
FIGURA 4.43 Capacidade emulsificante da solução aquosa de biossurfactante bruto com diferentes tipos de óleo.



A estabilidade das emulsões foi avaliada através de micrografias das emulsões formadas com o sobrenadante livre de células e a solução aquosa de biossurfactante bruto com os óleos naftênicos NH10, NH20 e NH140. A distribuição do tamanho de gotas constitui um fator que influencia a velocidade de coalescência das gotas de uma emulsão promovendo a coalescência e acarretando a quebra da emulsão; portanto, quanto menor a distribuição de tamanhos das gotas mais estável é a emulsão (ROSEN, 2004). A distribuição do tamanho médio das gotas das emulsões obtidas com a solução aquosa do biossurfactante bruto (Figura 4.44b-d) apresentou maior uniformidade e/ou menor tamanho, comparativamente à emulsão obtida com o meio de cultivo livre de

células (Figura 4.44a). Logo, a etapa de precipitação ácida à qual o biossurfactante foi submetido promoveu, não apenas aumento da capacidade emulsificante, como a obtenção de emulsões mais estáveis.

FIGURA 4.44 Micrografias (65X, microscópio óptico) de emulsões obtidas com meio de cultivo livre de células e NH10 (a) e solução aquosa de biossurfactante bruto (pH 9,0) com NH10 (b), NH20 (c) e NH140 (d).



5. Conclusões

A produção de ramnolipídeos por *P. aeruginosa* MSIC02 foi bastante sensível à concentração de nitrogênio e de glicerol empregadas no meio de cultivo, obtendo-se concentração máxima de ramnolipídeos, expressa em termos de ramnose, de 2300 mg/L com 24,0 g/L glicerol e 4,0 g/L de NaNO₃, obtendo-se razão C/N = 12, em cultivo em frascos agitados.

O modelo logístico foi capaz de representar a cinética de crescimento celular para todos os ensaios realizados.

A avaliação dos modelos para produção de biossurfactantes mostrou que o modelo proposto por Mercier *et al.* (1992) foi representativo da biossíntese deste bioproduto. Entretanto, o modelo de Luedeking-Piret não apresentou parâmetros significativos para os ensaios realizados.

O reciclo de células, realizados nos ensaios em biorreator com *P. aeruginosa* MSCI02, mostrou-se necessário para a manutenção do crescimento celular durante todo o cultivo. A baixa concentração de ramnolipídeo no caldo fermentativo indicou que este, possivelmente, foi concentrado na espuma juntamente com as células. O biossurfactante apresentou boas propriedades emulsificantes, tanto com óleos de origem vegetal, como os de origem mineral, obtendo-se capacidade emulsificante superior a 60% com a maior parte dos óleos avaliados.

Os ensaios realizados com a bactéria *B. subtilis* LAMI009 mostraram que o microrganismo necessitou de uma longa fase de adaptação para os meios de cultivo contendo glicerol ou glicose como fonte de carbono, sem a suplementação de extrato de levedura. Para tanto, desenvolveu-se um protocolo de adaptação/ativação do microrganismo em meio contendo glicerina, como fonte de carbono e energia. Os resultados mostraram que a cepa necessitou do extrato de levedura para crescimento em meio mineral. A avaliação da adaptação/ativação em um ensaio fermentativo comparado ao inóculo obtido em meio PGE mostrou que o protocolo de ativação eliminou a fase lag durante a fermentação.

A síntese de lipopeptídeos foi influenciada pela fonte de nitrogênio, obtendo-se, a partir dos extratos metanólicos dos lipopeptídeos, dois picos com tempo de retenção entre 4 e 6 minutos, equivalentes a presença de outro lipopeptídeo, provavelmente a iturina, além da surfactina.

A linhagem *B. subtilis* LAMI009 apresentou em seu genoma os genes *lp14* e *ituD*, responsáveis pela produção de surfactina e iturina.

A redução do inóculo de 10 % para 2 % nos cultivos em meio proposto por MORÁN *et al.* (2000) suplementado com 5 g/L de extrato de levedura forneceu produtividade volumétrica máxima de 14,22 mg/Lh, produção de 148,2 mg/L e $Y_{P/X}$ de 0,130 g/g com 12 horas de cultivo. O meio de cultivo livre de células apresentou boa atividade tensoativa, atingindo tensão superficial mínima de 29,0 mN/m.

A capacidade emulsificante dos lipopeptídeos sintetizados por *B. subtilis* LAMI009 foi influenciada pela fonte de nitrogênio, onde os sobrenadantes livres de células obtidos a partir dos cultivos com NH_4NO_3 e NaNO_3 promoveram emulsificação de 65 % com N-hexadecano e 45 % com querosene, respectivamente.

A solução aquosa do biossurfactante obtido por precipitação ácida (biossurfactante bruto) apresentou excelente capacidade emulsificante. Obteve-se índice de emulsificação (IE_{24}) maior que 65 % para os óleos testados, destacando-se o óleo de mamona, com IE_{24} de 90 %, e o tolueno cujo valor de IE_{24} foi de 84 %.

As emulsões obtidas com a solução aquosa do biossurfactante bruto e com óleos naftênicos foram mais estáveis comparativamente à emulsão obtida com o meio de cultivo livre de células.

6. Trabalhos Futuros

De acordo com o desenvolvimento do trabalho, seguem abaixo algumas sugestões para trabalhos futuros:

- ✓ Caracterização estrutural dos biossurfactantes produzidos por *B. subtilis* LAMI009;
- ✓ Estudos em biorreator de bancada no modo batelada alimentada avaliando a influência da aeração superficial em meio de cultivo com NH_4NO_3 como fonte de nitrogênio;
- ✓ Modelagem cinética dos cultivos de *B. subtilis* LAMI009 realizados em frascos agitados;
- ✓ Avaliar a capacidade emulsificante do biossurfactante bruto e o efeito da concentração de surfactante, força iônica, pH e temperatura;
- ✓ Pesquisar a produção intracelular de iturina a partir da linhagem *B. subtilis* LAMI009.

7. Referências Bibliográficas

ABDEL-MAWGOUD, A. M., ABOULWABA, M. M., HASSOUNA, N. A. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, n. 3, p. 305 – 325, 2008.

ADINARAYANA, K., ELLAIAH, P. Response surface optimization of the critical médium componentes for the production of alkaline protease by a newly isolated *Bacillus* sp. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 5, n. 3, p. 272 – 278, 2002.

AMARAL, P. F. F., FERREIRA, T. F., FONTES, G. C., COELHO, M. A. Z. Glycerol valorization: New biotechnological routes, **Food and Bioproducts Processing**, v. 87, p. 179 – 186, 2009.

ANNUAR, M.S.M., TAN, I.K.P., IBRAHIM, S., RAMACHANDRAN, K.B., A kinetic model for growth and biosynthesis of medium-chain-length poly-(3-hydroxyalkanoates) in *Pseudomonas putida*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 25, p.217, 2008.

ANP, 2012. Agência Nacional de Petróleo. <www.anp.gov.br/?dw=8739>. Acesso em 10 de setembro de 2011.

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

ASHBY, R.D., NUÑEZ, A., SOLAIMAN, D.K.Y., FOGLIA, T.A. Sophorolipid biosynthesis from a biodiesel co-product stream, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 8, n. 9, p. 625 – 630, 2005.

BAJAJ, I., SINGHAL, R. Poly (glutamic acid)--an emerging biopolymer of commercial interest, **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 5551 – 5561, 2011.

BAJAL, I. B., SINGHAL, R. S. Flocculation Properties of Poly(γ -Glutamic Acid) Produced from *Bacillus subtilis* Isolate, **Food Bioprocess Technology**, v.4, p. 745 – 752, 2011.

BALLANEC, B., BOUGHETTOUCHA, A., AMRANE, A. Unstructured model for batch cultures without pH control of *Lactobacillus helveticus* – Inhibitory effect of the undissociated lactic acid. **Biochemical Engineering Journal**. v. 35. p. 289. 2007.

BARRETO, R. V. G., Prospecção ambiental de microrganismos e genes envolvidos com a produção de biossurfactantes, 2011, Universidade Federal do Ceará.

- BARROS, F. F. C., QUADROS, C. P., PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 979 – 985, 2008.
- BENINCASA, M., CONTIERO, J., MANRESA, M.A., MORAES, I.O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source, **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.
- BESSON, F., CHEVANET, C., MICHEL, G. Influence of the culture medium on the production of iturin A by *Bacillus subtilis*, **Journal of General Microbiology**, v. 133, p. 767-772, 1987.
- CABOCHE, S., LECLÈRE, V., PUPIN, M., KUCHEROV, G., JACQUES, P. Diversity of Monomers in Nonribosomal Peptides: towards the Prediction of Origin and Biological Activity, **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 19, p. 5143 – 5150, 2010.
- CHAYABUTRA, C., WU, J., JU, L., Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* under Denitrification: Effects of Limiting Nutrients and Carbon Substrates, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 72, n. 1, p. 25 – 33, 2001.
- CHEN, F. Metabolism of *Pseudomonas aeruginosa* under simultaneous aerobic respiration and denitrification. 2005. 132 f. Universidade de Akron.
- CHEN, H., JUANG, R. Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction, **Biochemical Engineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 39 – 46, 2008.
- CHEN, S., LU, W., WEI, Y., CHEN, W., CHANG, J. Improved production of biosurfactant with newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* S2. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 661- 666, 2007.
- COOPER, D. G., GOLDENBERG, B .G. Surface-active agents from two *Bacillus* species, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224 – 229, 1987.
- COOPER, D.G., MACDONALD, C. R, DUFF, S. F. B., KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied Environmental Microbiology** v. 42. p. 408. 1981.
- COSBY, W. M., VOLLENBROICH, D., LEE, O. H., ZUBER, P. Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0k oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control, **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 6, p. 1438 – 1445, 1998.
- DAVIS, D.A., LYNCH, H.C., VARLEY, J. The application of foaming for the recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28. p. 346. 2001.

- DAVIS, D.A., LYNCH, H.C., VARLEY, J. The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 322 – 329, 1999.
- 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.
- FARIA, A. F., TEODORO-MARTINEZ, D. S., BARBOSA, G. N.O., VAZ, B. G., SILVA, I. S., GARCIA, J. S., TÓTOLA, M. R., EBERLIN, M. N., GROSSMAN, M., ALVES, O. L., DURRANT, L. R. Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry, **Process Biochemistry**, v. 46, n. 10, p. 1951 – 1957, 2011.
- FEIGNIER, C., BESSON, F., MICHEL, G. Studies on lipopeptide biosynthesis by *Bacillus subtilis*: Isolation and characterization of iturin⁻, surfactin⁺ mutants. **FEMS Microbiology Letters**, v. 127, p. 11 – 15, 1995.
- FIECHTER, A. Biosurfactants: moving towards industrial application, **TIBTECH**, v. 10, p. 208 – 217, 1992.
- FISHER, S. H., SONENSHEIN, A. L., Control of Carbon and Nitrogen Metabolism in *Bacillus Subtilis*, **Microbiology**, v. 45, p. 107 – 135, 1991.
- FISHER, S.H. Regulation of nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*: vive la différence! **Molecular Microbiology**, v. 32. p. 223. 1999.
- 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.
- FRANCY, D. S.; THOMAS, J. M.; RAYMOND, R. L.; WARD, C. H., Emulsification of hydrocarbons by subsurface bacteria. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, p. 237-246, 1991.
- GONÇALVES, V.L.C., PINTO, B.P., MUSGUEIRA, L.C., SILVA, J.C.; MOTA, C.J.A., Biogasolina: Produção de éteres e ésteres da glicerina, **Biodiesel, inclusão social**, p. 14 – 19, 2006.
- GUERRA-SANTOS, L., KÄPPELI, 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.
- HEYD, M., FRANZREB, M., HAUSMANN, R., SYLDATK, C., BERENSMEIER, S. Integral continuous microbial rhamnolipid production. **Journal of Biotechnology**, v. 131S. p. S77. 2007.
- HIRAOKA, H., ASAKA, O., ANO, T., SHODA, M., Characterization of *Bacillus subtilis* RB 14, coproducer of peptide antibiotics iturin a and surfactin, **Journal of General Applied Microbiology**, v. 38, p. 635 – 640, 1992.

HOLMBERG, K., JONSSON, B., KRONBERG, B., LINDMAN, B. Surfactants and Polymers in Aqueous Solution, Ed. John Wiley & Sons, 2003.

HSIEH, F. C.; LI, M. C.; LIN, T. C.; KAO, S. S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. **Current Microbiology**, v. 49, p.186-191, 2004.

HSIEH, F., LIN, T., MENG, M., KAO, S. Comparing methods for identifying *Bacillus* strains capable of producing the antifungal lipopeptide iturin A, **Current Microbiology**, v. 56, p. 1 – 5, 2008.

HUANG, C. C., ANO, T., SHODA M. Nucleotide sequence and characteristics of the gene, *lpa-14*, responsible for biosynthesis of the lipopeptide antibiotics iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis* RB14, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 76, n. 6, p. 445 – 450, 1993.

ITOKAWA, H., MIYASHITA, T., MORITA, H., TAKEYA, K., HIRANO, T., HOMMA, M., OKA, K. Structural and conformational studies of [Ile⁷] and [Leu⁷] surfactins from *Bacillus subtilis natto*, **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 3, p. 604 – 607, 1994.

IWASE, N., RAHMAN, M. S., ANO, T. Production of iturin A homologues under different culture conditions, **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. S28 – S32, 2009.

JARVIS, F. G., JOHNSON, M. J., A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa*, **American Chemical Society**, v. 71, p. 4124 – 4126, 1949.

KAKINUMA A, HORI M, ISONO M, TAMURA G, ARIMA K. Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. **Agricultural and Biological Chemistry** v. 33. p. 971. 1969a.

KAMEDA Y, MATSUI K, HISATO K, YAMADA T, SAGAI H. Antitumor activity of *Bacillus natto*. III. Isolation and characterization of a cytolytic substance on Ehrlich ascites carcinoma cells in the culture medium of *Bacillus natto* KMD 1126. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 20. p. 1551. 1972.

KIM, H., YOON, B., LEE, C., SUH, H., OH, H., KATSURAGI, T., TANI, Y. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 84, n. 1, p. 41 – 46, 1997.

KOSARIC, N., Biosurfactants in industry, **Pure & Applied Chemistry**, v. 64, n.11, p. 1731-1737, 1992.

LEAL, M. A. A.; GUERRA, J. G. M.; PEIXOTO, R. T. G.; ALMEIDA, D.L. Utilização de compostos orgânicos como substratos na produção de mudas de hortaliças. **Horticultura Brasileira**. v. 25, p. 392-395, 2007.

LIMA, C.J.B., RIBEIRO, E.J., SÉRVULO, E.F.C., RESENDE, M.M., CARDOSO, V.L. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* grown in residual soybean oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 152. p. 156. 2009.

LIMA, T. M., PROCÓPIO, L. C., BRANDÃO, F. D., CARVALHO, A.M., TÓTOLA, M. R., BORGES, A. C. Biodegradability of bacterial surfactants, **Biodegradation**, v. 22, n. 3, p. 585 – 592, 2011.

LIU, J. L., YANG, J., YANG, S., YE, R., MU, B. Effects of Different Amino Acids in Culture Media on Surfactin Variants Produced by *Bacillus subtilis* TD7 , **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 8, p. 2091 – 2100, 2012.

LIU, X., REN, B., GAO, H., LIU, M., DAI, H., SONG, F., YU, Z., WANG, S., HU, J., KOKARE, C. R., ZHANG, L. Optimization for the Production of Surfactin with a New Synergistic Antifungal Activity, **PLoS ONE**, v. 7, n.5, 2012.

LUEDEKING, R., PIRET, E.L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**. v. 1. p. 393. 1959.

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

MAKKAR, R.S. and CAMEOTRA, S.S Structural characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45 °C, **Journal of Surfactants and Detergents**, v.2, n. 3, p. 367 – 372, 1999b.

MAKKAR, R.S., CAMEOTRA, S.S., Synthesis of enhanced biosurfactant by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 at 45°C by foam fractionation, **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 4, p. 355, 2001.

MANRESA, M. A., BASTIDA, J., MERCADÉ, M.E., ROBERT, M., ANDRÉS C. de, ESPUNY, M. J., GUINEA, J. Kinetics Studies on Surfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, p. 133-136, 1991.

MARQUARDT, D. An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. **SIAM Journal on Applied Mathematics**, v. 11, p. 431, 1963.

MERCIER, P., YERUSHALMI, L., ROULEAU, D., DOCHAIN, D., Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus*. **Journal of Chemical and Technology** . v. 55. p. 111. 1992.

MORÁN, A. C., OLIVEIRA, N., COMMENDATORE, M., ESTEVES, J. L., SINERIZ, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a Biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9, **Biodegradation**, v. 11, n. 1, p. 65 – 71, 2000.

- MOTA, C. J. A., PESTANA, C. F. M. Co-produtos da Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 5, p. 416-425, 2011.
- MULLIGAN CN, GIBBS BF. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 47, n. 1, p. 23–29, 1990.
- MULLIGAN, C. N., GIBBS, B. F., Correlation of Nitrogen Metabolism with Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology** v. 55, n. 11, p. 3016-3019, 1989.
- NAKANO, M. M., HULLET, F. M. Adaptation of *Bacillus subtilis* to oxygen limitation, **FEMS Microbiology Letters**, v. 157, n. 1, p. 1 – 7, 1997.
- NAKANO, M. M., MARAHIEL, M. A., ZUBER, P. Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*, **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 12, p. 5662 – 5668, 1988.
- NITSCHKE, M., SIDDHARTHA, G. V. A. O., CONTIERO, J. Rhamnolipids Surfactants: An Update on the General Aspects of these Remarkable Biomolecules, **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593-1600, 2005.
- NITSCHKE, M., PASTORE, G.M., BISSURFACTANTES: PROPRIEDADES E APLICAÇÕES, **Química Nova**, v. 25, p. 772, 2002.
- NOAH, K.S., FOX, S.L., BRUHN, D.F., THOMPSON, D.N., BALA, G.A. Development of continuous surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in an airlift reactor. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 98. p. 803. 2002.
- PAPANIKOLAOU, S.; MUNIGLIA, L.; CHEVALOT, I.; AGGELIS, G.; MARC, I. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol, **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 737 – 744, 2002.
- PEYPOUX, F. Structure of iturine A, a peptidolipid antibiotic from *Bacillus subtilis*, **Biochemistry**, v. 17, p. 3992 – 3996, 1978.
- PEYPOUX, F., BONMATIN, J. M., WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 5, p. 553 – 563, 1999.
- PEYPOUX, F., BONMATIN, J., LABBE, H., DAS, B. C., PTAK, M., MICHEL, G. Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the (Val7)surfactin, **European Journal of Biochemistry**, v. 202, p. 101 – 106, 1991.
- PEYPOUX, F., BONMATIN, J., LABBE, H., GRANGEMARD, I., DAS, B. C., PTAK, M., WALLACH, J., MICHEL, G. [Ala4]Surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies, **European Journal of Biochemistry** v. 224, p. 89 – 96, 1994.

PHAM, T. H., WEBB, J. S., REHM, B. H. A. The role of polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Pseudomonas aeruginosa* in rhamnolipid and alginate production as well as stress tolerance and biofilm formation. **Microbiology**, v. 150, p. 3405-3413, 2004.

PINZON-GAMEZ, N. Rhamnolipid biosurfactant production from glycerol: New methods of analysis and improved denitrifying fermentation. 2009. 184 f. Dissertação. Universidade de Akron.

PUEYO, M. T., BLOCH, C. J., CARMONA-RIBEIRO, A. M., di MASCIO, P. Lipopeptides produced by a soil *Bacillus megaterium* strain, **Microbial Ecology**, v. 57, n. 2, p. 367 – 378, 2009.

RAMANA, K. V., KARANTH, N. G., Production of Biosurfactants by the Resting Cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFRT – 6, **Biotechnology Letters**, v. 11, n. 6, p. 437 – 442, 1989.

RAZAFINDRALAMBO, H., POPINEAU, Y., DELEU, M., HBID, C., JACQUES, P., THONART, P., PAQUOT, M. Surface-Active Properties of Surfactin/Iturin A Mixtures Produced by *Bacillus subtilis*, **Surface Chemistry and Colloids**, v. 13, n. 23, p. 6023 – 6031, 1997.

REIS, F. A. S. L., SÉRVULO, E. F. C., DE FRANÇA, F. P., Lipopeptide surfactant production by *Bacillus subtilis* grown on low-cost raw materials, **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 115, n. 1-3, p. 899 – 912, 2004.

RIVALDI, J. D., SARROUB, B.F., FIORLIO, R., da SILVA, S.S., Estratégias biotecnológicas para o aproveitamento do glicerol gerado da produção de biodiesel, **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, nº 37, p. 44 – 51, 2007

ROCHA, M. V. P., BARRETO, R. V. G., MELO, V. M. M., GONÇALVES, L. R. B. Evaluation of Cashew Apple Juice for Surfactin Production by *Bacillus subtilis* LAMI008, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 155, n. 1-3, p. 63 – 75, 2009.

ROCHA, M. V. R., OLIVEIRA, A. H. S., SOUZA, M. C. M., GONÇALVES, L. R. B., Natural Cashew apple juice as fermentation medium for biosurfactant production by *Acinetobacter calcoaceticus*. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p.1295-1299, 2006.

ROCHA, M.V.P., SOUZA, M.C.M., BENEDICTO, S.C.L., BEZERRA, M.S., MACEDO, G.R., PINTO, G.A.S., Gonçalves, L.R.B., Production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* grown on cashew apple juice **Applied Biochemistry Biotechnology**, v. 137, p. 185, 2007.

RODRIGUES, L.R., TEIXEIRA, J.A., OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. **Biochemical Engineering Journal**. v. 32. p.135. 2006.

- ROMERO, D., DE VICENTE, A., RAKOTOALY, R., H., DUFOUR, S. E., VEENING, ARREBOLA, E., J., CAZORLA, F. M., KUIPERS, O. P., PAQUOT, M., PÉREZ-GARCÍA, A. The iturin and fengycin families of lipopeptides are key factors in antagonism of *Bacillus subtilis* toward *Podosphaera fusca*, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 20, n. 4, p. 430 – 440, 2007.
- ROSEN, M. J. **Surfactants and Interfacial Phenomena**. 3^a Edição. New York: Wiley-Interscience, 2004. 444p.
- ROSENBERG, E., RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants, **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 52, n. 2, p. 154 – 162, 1999.
- SANDRIN, C., PEYPOUX, F., MICHEL, G. Coproduction of surfactin and iturin A lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*, **Biotechnology Applied and Biochemistry**, v. 12, p. 370 – 375, 1990.
- SANSINENEA, E., ORTIZ, A., Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp., **Biotechnology Letters**, v. 33, p. 1523 – 1538, 2011.
- SANTA ANNA, L.M., SEBASTIAN, G.V., MENEZES, E.P., ALVES, T.L.M., SANTOS, A.S. PEREIRA Jr., N., FREIRE, D.M.G. Production of Biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 Isolated in Oil Environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n.2, p. 159-166, 2002.
- SANTOS, A. S. **Produção de Ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa***. 2003. 110 f. Tese (Doutorado em Ciência Bioquímica) Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.
- SAR, N., ROSEMBERG, E. Emulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* strains, **Current Microbiology**, v. 9, p. 309, 1983.
- SEN, R., Response Surface Optimization of the Critical Media Components for the Production of Surfactin, **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 68, n. 3, p. 263 – 270, 1997.
- SEN, R., SWAMINATHAN, T. Response surface modeling and optimization to elucidate the effects of inoculum age & size on surfactin production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 141–148, 2004.
- SERRANO, M., S. HOVEL, C. P. MORAN, JR., A. O. HENRIQUES, AND U. VOLKER. Forespore-specific transcription of the *lonB* gene during sporulation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 2995-3003, 2001.
- SHALIGRAM, N. S., SINGHAL, R. S. Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications, **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 2, p. 119 – 134, 2010.

SHEN, H., LIN, T., THOMAS, R. K., TAYLOR, D. J. F., PENFOLD, J. Surfactin Structures at Interfaces and in Solution: The Effect of pH and Cations, **The Journal of Physical and Chemistry B**, v. 115, n. 15, p. 4427 – 4435, 2011.

SILVA, S.N.R.L., FARIAS, C.B.B., RUFINO, R.D., LUNA, J.M., SARUBBO, L.A., Glycerol as substrate for the production of biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa* UCP0992, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 79, p. 174, 2010.

SINGH, A., HAMME, J. D., WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects, **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 1, p. 99 – 121, 2007.

SOUSA, J. R. Produção de Biossurfactantes a partir do Glicerol obtido do Processo de Produção de Biodiesel por *Pseudomonas aeruginosa* LAMI. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

SOUSA, M., MELO, V. M. M., SANT'ANA, H. B., GONÇALVES, L. R. G. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source, **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 6, p. 897 – 906, 2011.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions, **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 845 – 857, 2005.

SYLDATK, C., LANG, S., MATULOVIC, U., WAGNER, F. Production of four interfacial active rhamnolipids from n-alkanes or glycerol by resting cells of *Pseudomonas* species DSM 2874, **Z. Naturforsch**, v. 40c, p. 61-67, 1985.

TIEHM, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 258–263. 1994.

TSUGE, K., INOUE, S., ANO, T., ITAYA, M., SHODA, M. Horizontal Transfer of iturin A Operon, *itu*, to *Bacillus subtilis* 168 and Conversion into an Iturin A Producer, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 11, 2005.

TSUKAGOSHI N, TAMURA G, ARIMA K. A novel protoplast- bursting factor (surfactin) obtained from *Bacillus subtilis* IAM 1213. I. The effects of surfactin on *Bacillus megaterium* KM. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 196. p. 204. 1970.

VAN DYKE, M.I., LEE, H., TREVORS, J.T. (1991). Application of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, v. 9, p. 241 252, 1991.

VOLPON, L., BESSON, F., LANCELIN, J., NMR structure of antibiotics plipastatins A and B from *Bacillus subtilis* inhibitors of phospholipase A2, **FEBS Letters**, v. 485, p. 76 – 80, 2000.

WEI, Y., CHOU, C., CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* originating from petrochemical wastewater, **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146-154, 2005.

WEI, Y., CHOU, C., CHANG, J. Rhamnolipid production by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* originating from petrochemical wastewater, **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, p. 146, 2005.

WEI, Y., CHU, I., Mn²⁺ + improves surfactin production by *Bacillus subtilis*, **Biotechnology Letters**, v. 24, n. 6, p. 479 -482, 2002.

WEI, Y., WANG, L., CHANG, J., KUNG, S. Identification of induced acidification in iron-enriched cultures of *Bacillus subtilis* during biosurfactant fermentation, **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 96, n. 2, p. 174 – 178, 2003.

WESTERS, L., WESTERS H., QUAX, W. J. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1694, p. 299 – 310, 2004.

WU, J., YEH, K., LU, W., LIN, C., CHANG, J., Rhamnolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* EM1 isolated from oil-contaminated site, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1157, 2008

XU, H.; JIANG, M.; LI, H.; LU, D.; QUYANG, P. Efficient production of poly-(γ -glutamic acid) by newly isolated *Bacillus subtilis* NX-2. **Process Biochemistry**, v.40, n. 519–523, 2005.

YEH, M., WEI, Y., CHANG, J. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**. v. 41. p. 1799. 2006.