



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ARAUANA LIMA E SILVA

**UTILIZAÇÃO DE LINHAGEM BACTERIANA ISOLADA DE SOLO DE
CANAVIAL PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES**

JOÃO PESSOA – PB

2017

ARAUANA LIMA E SILVA

**UTILIZAÇÃO DE LINHAGEM BACTERIANA ISOLADA DE SOLO DE
CANAVIAL PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES**

Trabalho de conclusão de curso como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia na Universidade Federal da Paraíba.

Orientadora: Prof^a Dr^a Andréa Farias de Almeida.

JOAO PESSOA – PB

2017

Catálogo na publicação
Biblioteca Setorial do CCEN/UFPB
Josélia M.O. Silva – CRB-15/113

S586c Silva, Arauana Lima e.
Utilização de linhagem bacteriana isolada de solo de canavial
para produção de biossurfactantes / Arauana Lima e Silva. – João
Pessoa, 2017.
60 p. : il. color.

Monografia (Bacharelado em Biotecnologia) – Universidade
Federal da Paraíba.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Andréa de Almeida Farias.

1. Bases moleculares da vida. 2. Biossurfactantes. 3. Melaço de
Cana – Fermentação. 4. *Bacillus safensis*. I. Título.

UFPB/BS-CCEN

CDU 577.2(043.2)

ARAUANA LIMA E SILVA

**UTILIZAÇÃO DE LINHAGEM BACTERIANA ISOLADA DE SOLO DE
CANAVIAL PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: 31 de maio de 2017

BANCA EXAMINADORA:

Profª Drª Andréa Farias de Almeida
(Orientadora)

Profª Drª Adna Cristina Barbosa de Sousa
(Examinadora)

Profª Drª Sharline Florentino de Melo Santos
(Examinadora)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida e de minha família, sem Ele nada seria possível.

Aos meus pais, Elisângela Alves Lima e Roberto Carlos da Silva, por toda educação, carinho, amor e por se sacrificarem todos os dias por mim e pelas minhas irmãs.

As minhas irmãs, Anauara, Isabela e Isadora Lima, minhas eternas companheiras, meu refúgio no mundo.

À minha orientadora, professora Andréa de Almeida Farias, por me orientar com sabedoria, competência e paciência e pelo amor com que ela desempenha sua profissão.

Ao meu primeiro orientador em projetos, professor Lindomar José Pena, por quem tenho profunda admiração e com quem tive aprendizados que vão além do âmbito acadêmico.

A toda equipe do Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp), é muito bom trabalhar com vocês. Adrielly Andrade, Brena Ferreira, Brenda, Caroline Targino, César Dias, Débora Lacerda, Emanuele Cardoso, Ray Arruda, Severino Jefferson, Tarcísio Bonifácio e Ubiratan Ribeiro, obrigado por deixarem as horas exaustivas de trabalho mais alegres e descontraídas.

A minha veterana e amiga querida, com quem tiro todas minhas dúvidas, Adrielly Andrade.

A minha chefinha e amiga, presente que ganhei em 2016, melhores domingos fermentando, Emanuele Cardoso.

As minhas amigas de classe, Elizanete Maciel, Ludmilla Christine, Olivia Costa e Palloma Farias. Obrigada pela companhia durante esses 4 anos.

Incluo de forma especial, minha parceira de experimentos, que embora não seja do mesmo laboratório, esteve comigo durante toda a trajetória, Geisi Maria, obrigada por tudo.

As minhas amigas, com quem iniciei o curso, Anauara Lima, Adrielly Andrade, Jayane Miranda, Pâmela Gabriella, Vanessa Barbosa.

As minhas amigas, que mesmo com mais de 1600 km de distância se mantêm presente nos meus dias, Anny Karoline, Laís Caroline, Marina Romeiro e Rebeca Sampaio.

A Roberto César, pelo companheirismo, compreensão, carinho e por sempre me incentivar ao melhor.

A todos os meus professores da Biotecnologia, por transmitirem seus ensinamentos. Vocês foram essenciais para a minha formação.

Ao Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular, Laboratório de Petróleo e Laboratório de Bioengenharia, por disponibilizarem seus equipamentos para o desenvolvimento dessa pesquisa, em especial a técnica Teresa Cristina.

Aos membros da Banca Examinadora, Adna Cristina Barbosa de Sousa e Sharline Florentino de Melo Santos, por terem aceitado contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

Finalmente agradeço ao Centro de Biotecnologia (CBiotec), por ser um ambiente desafiador e a Universidade Federal da Paraíba (UFPB), por possibilitar minha formação profissional e pela infraestrutura para execução dos experimentos.

Concluo afirmando: Divido com vocês minha felicidade e os bônus deste trabalho que certamente não seriam o mesmo sem vocês.

RESUMO

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas sintetizadas por micro-organismos que agem nas interfaces água/óleo ou óleo/água reduzindo as tensões superficiais e interfaciais entre elas e assim tornando alguns compostos mais miscíveis. Em virtude dessa característica, várias são as aplicações industriais que envolvem seu uso na indústria de petróleo, farmacêutica, de cosméticos, na agricultura para a formulação de herbicidas e pesticidas, na produção de produtos de higiene pessoal, detergentes e etc. Este trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes, através da fermentação submersa, utilizando o melaço de cana, um subproduto da indústria açucareira, como substrato, a partir de uma linhagem isolada de solo de canavial (*Bacillus safensis*) no estado da Paraíba e demonstrar a potencialidade deste resíduo nos processos biotecnológicos. Foi realizada a caracterização físico-química do substrato (melaço de cana). Para avaliar a produção de biossurfactante, foi acompanhado o crescimento microbiano, consumo de substrato, porcentagem de emulsificação e tensão superficial, em experimentos utilizando glicose, sacarose e melaço de cana, separadamente. Para a melhor condição de melaço de cana avaliada o isolado 28, proporcionou uma concentração máxima de aproximadamente 3,9g/L de células em 24h utilizando 9g/L de substrato. Para a condição de 5% de melaço e 0,5% de extrato de levedura obteve-se 0,06115g de biossurfactante ao final da pré-purificação. O resíduo de melaço de cana apresentou resultados promissores e poderia ser explorado como substrato alternativo para a produção de biossurfactantes de baixo custo. A *B. safensis* demonstrou indícios de produção de biossurfactante com alta atividade emulsificante.

Palavras-chave: biossurfactantes, melaço de cana, fermentação, *Bacillus safensis*.

ABSTRACT

Biosurfactants are amphipathic molecules synthesized by microorganisms that act on water/oil or oil/water interfaces, reducing surface and interfacial tensions between them and thus making some compounds more miscible. Due to this characteristic, there are several industrial applications that involve its use, such as: petroleum, pharmaceutical, cosmetics, agriculture, for the formulation of herbicides and pesticides, in the production of personal hygiene products, detergents, etc. The objective of this work was to evaluate the biosurfactant production capacity through submerged fermentation using sugarcane molasses, a by - product of the sugar industry, as a substrate, from an isolated lineage of cane fields (*Bacillus safensis*) in the state of Paraíba and demonstrate the potential of this residue in biotechnological processes. The substrate (sugarcane molasses) physicochemical characterization of was performed. To evaluate the biosurfactant production, microbial growth, substrate consumption, percentage of emulsification, and surface tension were monitored in experiments using glucose, sucrose and molasses, separately. For the best condition of molasses evaluated the isolated 28 reached approximately an maximum concentration of 3.9g / L of cells in 24h using 9g of substrate. For the condition of 5% of molasses and 0.5% of yeast extract, was obtained 0.06115g of biosurfactant at the pre-purification end. Sugarcane molasses residue presented promising results and could be used as an alternative substrate for the production of low cost biosurfactants. A *B. safensis* showed evidence of biosurfactant production with high emulsifying activity.

Key words: biosurfactants, molasses, fermentation, *Bacillus safensis*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Estrutura Surfactina..... | 22 |
| Figura 2: Perfil cinético de <i>B. safensis</i> utilizando glicose como substrato..... | 37 |
| Figura 3: Perfil cinético da <i>B. safensis</i> utilizando sacarose como substrato..... | 38 |
| Figura 4: Perfil cinético de <i>B. safensis</i> utilizando melação 5%, sem suplementação..... | 40 |
| Figura 5: Perfil cinético da <i>B. safensis</i> utilizando melação 5%, extrato de levedura 0,5%..... | 41 |
| Figura 6: Perfil cinético de <i>B. safensis</i> utilizando melação 5% e extrato de levedura 1%..... | 41 |
| Figura 7: Perfil cinético da <i>B. safensis</i> utilizando melação 2% e extrato de levedura 0,5%..... | 43 |
| Figura 8: Perfil cinético da <i>B. safensis</i> utilizando melação 2% e extrato de levedura 0,5%..... | 43 |
| Figura 9: Perfil cinético da <i>B. safensis</i> utilizando melação 3% e extrato de levedura 1%..... | 44 |
| Figura 10: Perfil cinético da <i>B. safensis</i> utilizando melação 3% e extrato de levedura 0%..... | 45 |
| Figura 11: Perfil cinético da <i>B. safensis</i> utilizando melação 1% e extrato de levedura 1%..... | 45 |
| Figura 12: Perfil cinético da <i>B. safensis</i> utilizando melação 1% e extrato de levedura 0%..... | 46 |
| Figura 13: Cultivo em biorreator..... | 47 |
| Figura 14: Teste de emulsificação com melação 5% e extrato de levedura 0,5%..... | 48 |
| Figura 15: Perfil da porcentagem de emulsificação <i>B. safensis</i> em glicose..... | 49 |
| Figura 16: Perfil da porcentagem de emulsificação <i>B. safensis</i> em sacarose..... | 49 |
| Figura 17: Perfil da porcentagem de emulsificação <i>B. safensis</i> em melação 5%, extrato de levedura 0%..... | 50 |
| Figura 18: Perfil da porcentagem de emulsificação <i>B. safensis</i> em melação 5%, extrato de levedura 0,5%..... | 50 |
| Figura 19: Perfil da porcentagem de emulsificação <i>B. safensis</i> em melação 5%, extrato de levedura 1%..... | 50 |
| Figura 20: Perfil da porcentagem de emulsificação para óleo de motor <i>B. safensis</i> – planejamento experimental..... | 51 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Classificação dos biossurfactantes e micro-organismos produtores. | 17 |
| Tabela 2: Classificação taxonômica do <i>Bacillus</i> sp..... | 21 |
| Tabela 3: Composição físico-química do melaço de cana-de-açúcar bruto..... | 24 |
| Tabela 4: Principais aplicações biotecnológicas dos biossurfactantes..... | 27 |
| Tabela 5: Composição do meio Lúria-Bertani..... | 29 |
| Tabela 6: Meio mineral para perfil cinético glicose/ sacarose..... | 31 |
| Tabela 7: Meios utilizando melaço como fonte de carbono..... | 31 |
| Tabela 8: Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^2 | 32 |
| Tabela 9: Matriz do planejamento fatorial 2^2 com triplicata do ponto central..... | 32 |
| Tabela 10: Caracterização do melaço..... | 36 |
| Tabela 11: Parâmetros cinéticos isolado 28 com glicose..... | 38 |
| Tabela 12: Parâmetros cinéticos isolado 28 com sacarose..... | 39 |
| Tabela 13: Parâmetros cinéticos isolado 28 com melaço 5%..... | 40 |
| Tabela 14: Parâmetros cinéticos isolado 28 planejamento fatorial 2^2 com triplicata do ponto central incompleto..... | 43 |
| Tabela 15: Tensão superficial <i>B. safensis</i> , experimentos com melaço 5%..... | 52 |
| Tabela 16: Tensão superficial <i>B. safensis</i> , experimentos do planejamento experimental..... | 52 |
| Tabela 17: Pré-purificação do biossurfactante de <i>B. safensis</i> experimentos com melaço 5%..... | 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| DNS | Ácido dinitro-salicílico |
| nm | Nanômetro |
| rpm | Rotação por minuto |
| HCl | Ácido clorídrico |
| MnSO ₄ .H ₂ O | Sulfato de manganês hidratado |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | Sulfato de magnésio heptahidratado |
| KH ₂ PO ₄ | Fosfato de potássio monobásico |
| K ₂ HPO ₄ | Fosfato de potássio dibásico |
| (CMC) | Concentração micelar crítica |

OBS: as abreviaturas e os símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções que seguem o Sistema Internacional de Unidades (S.I.)

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 14 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 16 |
| 2.1 Surfactantes..... | 16 |
| 2.2 Biossurfactantes..... | 16 |
| 2.2.1 <i>Classificação dos biossurfactantes</i> | 17 |
| 2.2.2 <i>Propriedades e vantagens dos biossurfactantes</i> | 18 |
| 2.2.3 <i>Produção dos biossurfactantes</i> | 19 |
| 2.3 Micro-organismos produtores de biossurfactantes..... | 20 |
| 2.3.1 <i>Biossurfactantes a partir do gênero Bacillus sp.</i> | 20 |
| 2.3.1.1 Surfactina | 22 |
| 2.4 Fermentação submersa (FS) | 22 |
| 2.4.1 <i>Substrato</i> | 23 |
| 2.4.1.1 Melaço..... | 24 |
| 2.5 Parâmetros cinéticos para o processo | 25 |
| 2.6 Aplicações dos biossurfactantes | 26 |
| 3 OBJETIVO GERAL..... | 28 |
| 3.1 Objetivos específicos | 28 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |
| 4.1 Micro-organismo | 29 |
| 4.2 Substrato | 29 |
| 4.2.1 <i>Caracterização físico-química do substrato</i> | 29 |
| 4.2.1.1 Teor de açúcares redutores totais (ART) | 30 |
| 4.2.1.2 pH | 30 |
| 4.2.2 <i>Meios utilizados nos processos fermentativos e condições de produção do biossurfactante</i> | 31 |
| 4.3 Inóculo | 33 |
| 4.4 Análises dos processos fermentativos | 33 |
| 4.4.1 <i>Quantificação celular</i> | 33 |
| 4.4.2 <i>Quantificação do substrato</i> | 34 |
| 4.4.3 <i>Análise dos parâmetros cinéticos</i> | 34 |
| 4.5 Quantificação do bioproduto | 34 |
| 4.5.1 <i>Teste de emulsificação</i> | 34 |

| | |
|---|----|
| 4.5.2 Tensão superficial | 35 |
| 4.5.3 Pré-purificação do biossurfactante | 35 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 5.1 Caracterização físico-química do substrato | 36 |
| 5.2 Análises dos processos fermentativos | 36 |
| 5.2.1 Cinética de crescimento e consumo de substrato dos experimentos com glicose e sacarose..... | 37 |
| 5.2.2 Cinética de crescimento e consumo de substrato dos experimentos com melação 5%..... | 39 |
| 5.2.3 Cinética de crescimento e consumo de substrato dos experimentos do planejamento experimental..... | 42 |
| 5.3 Produção do biossurfactante | 46 |
| 5.3.1 Índice de emulsificação | 47 |
| 5.3.2 Tensão superficial | 51 |
| 5.3.3 Pré-purificação do biossurfactante | 53 |
| 6 CONCLUSÕES | 54 |
| 7 REFERÊNCIAS | 55 |
| APÊNDICES..... | 60 |
| APÊNDICE A Linearização [X] do cultivo com glicose..... | 60 |
| APÊNDICE B Linearização [X] do cultivo com sacarose..... | 60 |
| APÊNDICE C Linearização [X] do cultivo com melação 5% e 0% de extrato de levedura..... | 60 |
| APÊNDICE D Linearização [X] do cultivo com melação 5% e 0,5% de extrato de levedura..... | 60 |
| APÊNDICE E Linearização [X] do cultivo com melação 5% e 1% de extrato de levedura..... | 61 |
| APÊNDICE F Linearização [X] do planejamento experimental – condição 1..... | 61 |
| APÊNDICE G Linearização [X] do planejamento experimental – condição 2..... | 61 |
| APÊNDICE H Linearização [X] do planejamento experimental – condição 3..... | 61 |
| APÊNDICE I Linearização [X] do planejamento experimental – condição 4..... | 62 |
| APÊNDICE J Linearização [X] do planejamento experimental – condição 5..... | 62 |
| APÊNDICE K Linearização [X] do planejamento experimental – condição 6..... | 62 |

1 INTRODUÇÃO

Biossurfactantes são moléculas anfipáticas sintetizadas por micro-organismos que agem nas interfaces água/óleo ou óleo/água reduzindo as tensões superficiais e interfaciais entre elas e assim tornando alguns compostos mais miscíveis (BANAT et al., 2010). Devido essa propriedade, várias são as aplicações industriais que envolvem o uso de biossurfactantes, como indústria de petróleo, farmacêutica, de cosméticos, na agricultura para a formulação de herbicidas e pesticidas, na produção de produtos de higiene pessoal, detergentes, processamento de alimentos (textura), tratamento e processamento de metais, vestuário, processamento de polpas de papel, entre outras.

Embora essas biomoléculas apresentem inúmeras vantagens sobre os surfactantes sintéticos os custos para sua produção ainda constituem um entrave para sua utilização em ampla escala. O desenvolvimento de processos que reduzam custos de matérias primas permitiria o sucesso da produção de biossurfactantes uma vez que estes são responsáveis por cerca de 30% de todo custo de produção (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002). Os biossurfactantes podem ser sintetizados a partir de resíduos agroindustriais, em geral substratos que contenham altos níveis de carboidratos ou de lipídeos, suprem a necessidade de fonte de carbono para a produção de biossurfactantes (NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004).

Sendo o Brasil um país essencialmente agrícola tem enorme interesse quando se trata à destinação dos resíduos gerados nesta atividade. A geração de resíduos e subprodutos é inerente a qualquer setor produtivo, contudo, o aumento da conscientização ecológica deixa claro que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental.

Os setores agroindustriais e de alimentos produzem grandes quantidades de resíduos, tanto líquidos como sólidos. Esses resíduos podem apresentar elevados problemas quanto à disposição final e serem potenciais

poluentes, além de representarem, muitas vezes, perdas de biomassa e de nutrientes de alto valor. Entretanto, existem inúmeras possibilidades do uso destes subprodutos ou resíduos inerentes a estas atividades em processos fermentativos, utilizados como fonte nutricional para micro-organismos capazes de modificarem estes compostos orgânicos e sintetizarem bioprodutos de interesse comercial.

Neste contexto, a escolha do substrato utilizado nesse trabalho foi pautada na característica da linhagem isolada de solo de canavial e na produção agrícola da Paraíba (PB), sua agricultura baseia-se principalmente no plantio de cana-de-açúcar. Portanto, o trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes através da fermentação submersa utilizando o melaço de cana, um subproduto da indústria açucareira, como substrato, a partir de uma linhagem de *Bacillus safensis* (isolado 28).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Surfactantes

Os surfactantes são compostos anfipáticos constituídos por uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. Organizam-se preferencialmente entre as interfaces líquidas com diferentes graus de polaridade, tais como interfaces óleo/água ou ar/água. A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto que a unidade polar pode ser iônica (catiônica ou aniônica), não iônica ou anfotérica (MAO et al., 2015).

Os surfactantes possuem a capacidade de aumentar a solubilidade das moléculas hidrofóbicas em meio aquoso, e assim reduzir as tensões interfaciais na interface óleo/água (BANAT et al., 2010). Por possuírem alta atividade tensoativa essas moléculas apresentam importantes propriedades, como detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (KOSARIC, 1992).

Surfactantes podem ser sintéticos ou naturais e estão disponíveis em varias formas sendo geralmente classificados de acordo sua carga iônica como: aniônicos, catiônicos e anfotéricos (SCHMITT, 2001). Surfactantes sintéticos são comumente produzidos a partir de métodos químicos orgânicos, dependendo do tipo e da estrutura da molécula desejada (DESAI; DESAI, 1993).

A maioria dos surfactantes produzidos atualmente é derivada do petróleo. Porém, esses surfactantes sintéticos são tóxicos e não biodegradáveis, fatores que justificam a busca por alternativas menos nocivas ao ambiente, como os surfactantes obtidos através do metabolismo de micro-organismos, conhecidos como biossurfactantes ou biotensoativos. (VIJAYAKUMAR; SARAVANAN, 2015).

2.2 Biossurfactantes

Os biossurfactantes constituem um grupo bastante diverso de compostos tensoativos sintetizados por micro-organismos (NITSCHKE et al., 2005). São metabólitos que possuem a típica estrutura anfifílica dos surfactantes sintéticos em que a porção hidrofóbica é constituída ou de ácidos

graxos de cadeias longas, ou de hidroxiácidos, ou ainda, alfa-alkil-beta-hidroxi ácidos graxos e a porção hidrofílica pode ser constituída, ou de carboidratos, ou de aminoácidos, ou de peptídeo cíclico, ou de fosfato, ou de ácido carboxílico, ou de um álcool (DESAI; DESAI, 1993).

Esses compostos ativos são produzidos por micro-organismos para aumentar a biodisponibilidade de substratos hidrofóbicos imiscíveis, permitindo uma melhor sobrevivência em condições de baixa umidade. Assim como os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes possuem capacidade de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, etc (VAN HAMME et al., 2006).

2.2.1 Classificação dos biossurfactantes

Os biossurfactantes sintetizados pelos micro-organismos são variados. Os de baixo peso molecular são ácidos graxos, glicolípideos, lipopeptídeos cíclicos e acíclicos e os de alto peso molecular constituem os polissacarídeos anfipáticos, proteínas, lipopolissacarídeos, lipoproteínas ou misturas complexas desses biopolímeros (ROSENBERG; RON, 1999).

Biossurfactantes são produtos extracelular e geralmente são classificados de acordo sua origem microbiana e composição química (BANAT et al., 2010) como mostra a Tabela 1:

Tabela 1: Classificação dos biossurfactantes e micro-organismos produtores.

| Tipo de biossurfactante | Micro-organismos |
|--|---|
| Glicolípídios - ramnolípídios - soforolípídios - trehalolípídios | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium</i> sp. |
| Lipopeptídios e lipoproteínas - peptídeo-lípido - viscosina - serrawetina - surfactina - subtilisina - gramicidina - polimixina | <i>Bacillus licheniformis</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus polymyxa</i> |

| | |
|---|--|
| Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios - ácidos graxos - lipídios neutros - fosfolipídios | <i>Corynebacterium lepus</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i> |
| Surfactantes poliméricos - emulsan - biodispersan - liposan - carboidrato-lipídio-proteína - manana-lipídio-proteína | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Candida lipolytica</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Candida tropicalis</i> |
| Surfactantes particulados - vesículas - células | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> Várias bactérias |

Fonte: Adaptado apud NITSCHKE; PASTORE, 2002.

2.2.2 Propriedades e vantagens dos biossurfactantes

Apesar da diversidade de composição química algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes e muitas dessas características também representam vantagens sobre os surfactantes convencionais, como:

- a) Atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações do bioproduto (COOPER; PADDOCK, 1984). A concentração micelar crítica (CMC) dos biossurfactantes (medida de sua eficiência) varia entre 1-2000mg/L enquanto que a tensão interfacial óleo/água e superficial fica em torno de 1 e 30mN/m respectivamente (BOGNOLO, 1999).
- b) Tolerância a pH, temperatura, força iônica: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas. Os biossurfactantes suportam concentrações de 10% de NaCl enquanto que uma concentração salina de 2-3% é suficiente para inativar surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999).

- c) Biodegradabilidade: diferente dos surfactantes químicos os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequado para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos (MULLIGAN; GIBBS, 1993).
- d) Baixa toxicidade: os biossurfactantes tem recebido atenção também devido a crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997). Sua baixa toxicidade também permite seu uso em cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos (CAMPOS et al., 2013).
- e) Podem ser sintetizados a partir de substratos renováveis enquanto os surfactantes sintéticos são na sua maioria derivados do petróleo, o que aumenta o custo final do produto (MAKKAR et al., 2011).
- f) Possuem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular (CAMPOS et al., 2013).

2.2.3 Produção dos biossurfactantes

Os biossurfactantes podem ser obtidos por processos fermentativos simples e sua produção requer geralmente a presença de fonte de carbono do tipo hidrofílico e oleoso/hidrocarboneto miscível no meio de cultura (NITSCHKE; FERRAZ; PASTORE, 2004). Os biossurfactantes apresentam alto custo de produção, consequência do valor do substrato e dos métodos de purificação utilizados no processo industrial.

A estratégia de substituição de substratos convencionais por substratos oriundos de fontes renováveis, mais baratos e tão ricos em nutrientes quanto os substratos convencionais, é essencial para viabilizar a ampliação da sua produção em escala industrial. Segundo Makkar et al. (2011), a redução dos custos do processo e os menores danos ambientais causados podem tornar a produção mais atrativa quando se utilizam resíduos como substratos.

A produção de biossurfactantes em biorreatores ainda é mais cara que a produção de seus sintéticos equivalentes, portanto, o grande desafio de sua produção em larga escala é direcionar estratégias de cultivo, processamento,

recuperação e purificação a baixo custo (HUDAK; CASSIDY, 2004). A concentração do biossurfactante no meio de cultura, quando produzido em biorreatores, e suas fases de recuperação é que irão determinar a viabilidade da produção em grande escala. Geralmente a baixa concentração e sua estrutura química limitam a extração, principalmente quando se utiliza substratos complexos no processo de produção (KIM et al.,1997).

Ultrafiltração, ultracentrifugação, precipitação com ácido ou sal, extração por solventes e adsorção em cromatografia são alguns dos diferentes métodos utilizados nos processos de purificação. Os solventes podem ser usados em sua forma pura ou combinados nos processos de extração. As misturas mais efetivas são aquelas que utilizam clorofórmio e metanol por facilitarem o ajuste da polaridade da molécula que se pretende extrair. Contudo, o uso destas substâncias em grande escala requer grandes volumes de solvente o que torna o processo caro e gera resíduos clorados que são tóxicos e prejudiciais para a saúde humana e para o ambiente (KIM et al., 1997).

2.3 Micro-organismos produtores de biossurfactantes

Há uma grande quantidade de micro-organismos capazes de produzir biossurfactantes. Micro-organismos isolados de locais onde ocorreram alguma contaminação ou expostos a algum resíduo imiscível geralmente possuem essa habilidade como resposta às condições ambientais (SAMPAIO, 1995).

A literatura descreve o gênero *Bacillus* sp. como bom produtor de biossurfactante, esse gênero não é patogênico, fator que representa uma vantagem em relação a alguns biossurfactantes que devido à natureza patogênica dos micro-organismos produtores não podem ser usados na indústria farmacêutica e alimentícia (SHEPHERD, 1995).

2.3.1 Biossurfactantes a partir do gênero *Bacillus* sp.

As espécies do gênero *Bacillus* são bastonetes, com extremidades retas ou arredondadas, de tamanhos variados, esporulados, Gram positivos ou Gram variáveis. Geralmente são saprófitos e não patogênicos aos animais. Seu *habitat* principal é o solo. Esse gênero de bactéria possui resistência a altas

temperaturas e crescimento rápido (DE MARCO, 2012). A classificação taxonômica do *Bacillus* sp está representada na Tabela 2.

Tabela 2: Classificação taxonômica do *Bacillus* sp.

| Classificação Taxonômica | |
|--------------------------|----------------------|
| Reino | <i>Bacteria</i> |
| Sub – reino | <i>Posibacteria</i> |
| Filo | <i>Firmecutes</i> |
| Classe | <i>Bacilli</i> |
| Ordem | <i>Bacillales</i> |
| Família | <i>Bacillaceae</i> |
| Gênero | <i>Bacillus</i> |
| Espécie | <i>Baccillus</i> sp. |

Fonte: *Integrated Taxonomic Information System, 2012.*

Bacillus licheniformis JF-2 produz biossurfactante em condições de anaerobiose quando crescimento ocorre em meio mineral com glicose e suplementação de extrato de levedura e NaNO_3 tendo a tensão superficial do meio reduzida de 70/74 mN/m para cerca de 28 mN/m devido à produção de um biossurfactante aniônico (JAVAHERI et al, 1985).

Makkar; Cameotra (1997) descreveram a produção de biossurfactante por duas estirpes de *B. subtilis* (MTCC 2423 e MTCC1427) em resíduo agroindustrial de melão em condições termofílicas, a tensão superficial do meio reduziu para cerca 29 e 31 dinas/cm pelas duas estirpes, respectivamente.

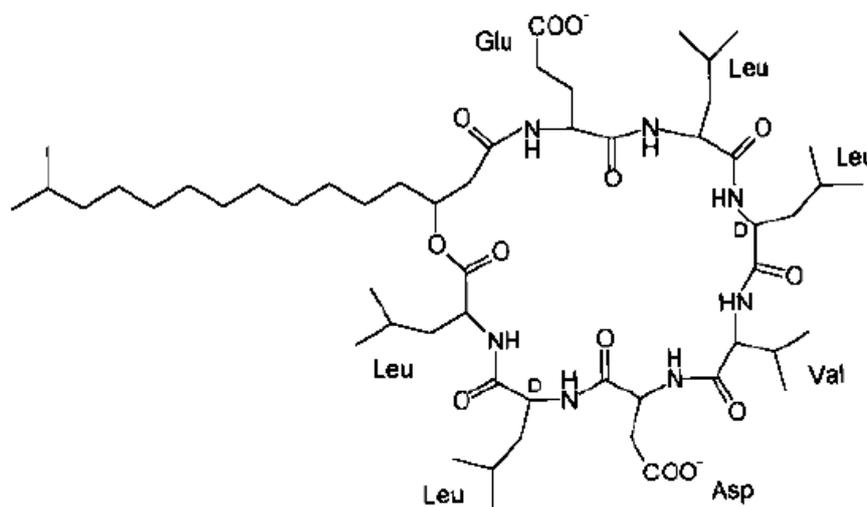
Oliveira; Garcia-Cruz (2013) relataram produção de biossurfactante por *B. pumilus* utilizando diferentes concentrações de vinhaça e óleo de fritura como fontes alternativas de carbono, a tensão superficial foi reduzida até 45mN/m e a produção máxima de biossurfactante bruto foi de 27,7 e 5,7 g/L para a vinhaça e óleo de fritura, respectivamente, em concentração de 5%.

Segundo Sousa et al. (2014), *B. subtilis* LAMI005 produz um tensoativo que constitui um lipopeptido cíclico comparável à surfactina comercialmente disponível.

2.3.1.1 Surfactina

A bactéria do solo *B. subtilis* produz uma abundância de substâncias com funções diversas (ZUBER; NAKANO; MARAHIEL, 1993). Uma delas a surfactina (Figura 1) é um antibiótico lipopeptídeo cíclico com um peso molecular de 1,036. Contém uma mistura de vários beta-hidroxi-ácidos graxos com cadeias de 13 a 15 átomos de carbono como sua porção lipídica. Seu principal componente é o ácido 3-hidroxi-13-metilmirítico, que forma um lactona com um heptapéptido aniônico (VOLLENBROICH et al., 1997).

Figura 1: Estrutura Surfactina



Fonte: VOLLENBROICH et al., 1997.

A surfactina possui uma estrutura anfifílica associada com uma alta atividade surfactante. Possui também atividade bactericida, fungicida, antiviral, agente antitumoral, atua como inibidor da formação de coágulos fibrinosos, antimicoplasmático, veículo para a administração de drogas via pulmonar e é capaz de inibir a formação de biofilmes de outras bactérias, incluindo *Salmonella*. Devido a sua baixa toxicidade pode ser também aplicada em alimentos e cosméticos (BARROS et al., 2007).

2.4 Fermentação submersa (FS)

Processo fermentativo pode ser definido como um conjunto de etapas, onde o meio de cultura esterilizado é preparado com o objetivo de fornecer ao micro-organismo os nutrientes necessários para seu desenvolvimento. O

processo de fermentação é controlado (pH, temperatura, agitação, concentração de nutrientes, entre outros limitantes) de modo a manter favorável esse crescimento e formação do produto desejado. Por último, completado o processo, o caldo fermentado passa pelos tratamentos finais, visando a separação dos produtos e subprodutos (BORZANI et al., 2008).

No processo fermentativo submerso o meio de cultura se encontra líquido e os nutrientes necessários para o desenvolvimento do microrganismo estão dissolvidos. Este processo apresenta facilidade de cultivo em grande escala, garantindo homogeneidade do meio e facilidade do controle de parâmetros do processo (COUTO; SANROMÁN, 2006).

Porém, a desvantagem do processo é o alto custo de energia e a possibilidade de contaminação (JAIN; MORLOK; HENSON, 2013). De uma forma geral, a fermentação submersa é conduzida de forma descontínua, mas a produtividade pode ser aumentada, em alguns casos, pela condução por batelada alimentada (KIM; HOU, 2006).

2.4.1 Substrato

A escolha do substrato é uma das principais etapas de um processo fermentativo, é devido a sua conversão que se obtém o produto de interesse. O substrato é considerado a principal fonte de carbono para o desenvolvimento do micro-organismo existindo inúmeros substratos que podem ser utilizados, sejam eles de origem orgânica ou sintética. Atualmente, o maior interesse é por substratos de origem renovável, ou seja, resíduos ou subprodutos de outros processos industriais não tóxicos e que apresentem baixo custo (VANZIN, 2008).

Entre os subprodutos mais abundantes, podem ser citados: o soro de queijo ou de leite (PARASKEVOPOULOU et al., 2003) e material celulósico de origem vegetal (DIAZ et al., 2003). Também merecem realce o melaço e a vinhaça de cana-de-açúcar, que podem ser empregados para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos de interesse industrial por muitos micro-organismos como leveduras, algas, fungos e bactérias (ALTAF et al., 2006).

2.4.1.1 Melaço

Segundo a ANVISA (1978), melaço é um líquido que se obtém como resíduo da fabricação do açúcar cristalizado, do melado ou da refinação do açúcar bruto, suas características organolépticas são: aspecto líquido viscoso, denso e xaroposo, cor que varia entre amarelo, amarelo castanho e âmbar castanho, sabor adocicado e cheiro característico. A composição físico-química do melaço está apresentada na Tabela 3.

Tabela 3: Composição físico-química do melaço de cana-de-açúcar bruto.

| Composição | Concentração | (g%) |
|-------------------------------------|--------------|------|
| Nitrogênio | 0,58 | p/v |
| Fósforo | 0,015 | p/v |
| Potássio | 1,63 | p/v |
| Umidade | 9,10 | p/p |
| Cinzas | 9,98 | p/p |
| Glicídios redutores em glicose | 14,72 | p/p |
| Glicídios não redutores em sacarose | 33,78 | p/p |

Fonte: FELTRIN, 2000.

O melaço é um subproduto do processamento da cana-de-açúcar e da beterraba. Este substrato é de baixo custo e tem peso seco (75%), matéria orgânica não-açúcar (9% -12%), proteína (2,5%), e potássio (1,5% -5,0%), bem como magnésio, cálcio e fósforo («1%). Inositol, biotina, tiamina e ácido pantatênico (1% -3%) dão ao melaço sua consistência espessa e de cor castanha.

O alto teor de açúcar (48% -56%) faz o melaço adequado para a produção de biossurfactantes por diferentes micro-organismos. Muitos laboratórios têm usado o melaço para a produção de diferentes metabolitos microbianos. *B. subtilis* num meio mínimo suplementado com melaço como fonte de carbono produz um biossurfactante (MAKKAR; CAMEOTRA, 1997). Joshi et al. (2007) relatam uso de melaço, bem como outras fontes de carbono para produzir biossurfactantes a partir de estirpes de *Bacillus*.

O melaço é frequentemente utilizado como substrato para a produção de etanol (JIMENEZ et al., 2004), devido à presença de grande quantidade de

açúcares fermentescíveis em sua composição, constituindo uma boa fonte de carbono para o metabolismo microbiano (WALISZEWSKI et al., 1997).

2.5 Parâmetros cinéticos para o processo

Devido ao fato que a concentração microbiana X aumenta durante um cultivo fermentativo, é possível quantificar a velocidade específica de crescimento (μ_x) (Equação 1) (SCHMIDELL et al., 2001).

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad \text{Eq. (1)}$$

E durante a fase exponencial de crescimento microbiano, esta velocidade específica é máxima e constante (μ_{\max}). O μ_{\max} pode ser estimado pela linearização dos valores de concentração celular durante a fase exponencial, além disso, pode-se estimar também o tempo de geração da linhagem durante o cultivo que é dado pela Equação 2.

$$t_g = \frac{LN2}{\mu} \quad \text{Eq. (2)}$$

Outra definição de velocidade que visa a avaliação do desempenho de um processo fermentativo, é a produtividade em células, expressa na Equação 3, mostrando que a produtividade representa a velocidade média de crescimento referente ao tempo final de fermentação, t_f .

$$P_x = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad \text{Eq. (3)}$$

Em que: X_m – Concentração máxima de células [$\text{g.L}^{-1}\text{s}$]; X_0 – Concentração inicial de células [g.L^{-1}]; t_f – Tempo final de fermentação [h].

Além disso, é possível quantificar no cultivo os fatores de conversão. O fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), descrito por (SCHMIDELL et al., 2001) está expresso na Equação 4.

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad \text{Eq. (4)}$$

Em que: X é a concentração final de células, X_0 a concentração inicial, S_0 a concentração inicial de substrato e S a concentração final de substrato no final do processo fermentativo. Com o uso desta equação, é possível conhecer quanto de substrato é consumido para alcançar uma concentração celular pontual.

2.6 Aplicações dos biossurfactantes

Os biossurfactantes têm uma gama de aplicações biotecnológicas no petróleo, alimentos, bebidas, cosméticos, detergentes, têxteis, tintas, mineração, celulose, farmacêutica e nanotecnologia (RODRIGUES et al., 2006), as principais aplicações estão listadas na Tabela 4. Espera-se que os biossurfactantes se tornem conhecidos como materiais multifuncionais do século XXI, já que têm aplicações em diferentes processos industriais, bem como potenciais novos usos futuros (MARCHANT; BANAT, 2012), principalmente devido a suas diversas estruturas.

O principal mercado dos biossurfactantes tem sido as indústrias relacionadas com o petróleo para permitir a exploração eficaz do óleo pesado, oferecendo vantagens sobre surfactantes químicos em processos envolvendo extração, transporte, armazenamento e refino. Os biossurfactantes também têm sido usados com sucesso na limpeza de lodos de petróleo em tanques de armazenamento, recuperação de óleos e para facilitar o melhor transporte de petróleo bruto pesado através de oleodutos (ASSADI; TABATABAEE, 2010).

Tabela 4: Principais aplicações biotecnológicas dos biossurfactantes.

| Indústria | Aplicação | Papel dos biossurfactantes |
|------------------|--|--|
| Meio Ambiente | Biorremediação; Operações de limpeza de derramamento de óleo; Descontaminação de solos. | Emulsificação, solubilização e dispersão de óleos, diminuição da tensão interfacial, umedecimento, espalhamento, detergentência, formação de espuma e limpeza do solo. |
| Petróleo | Recuperação de óleo aprimorada; Des-emulsificação. | Emulsificação, solubilização e dispersão de óleos, diminuição da tensão interfacial, de-emulsificação de emulsões de óleo, redução da viscosidade, espalhamento, detergentência, formação de espuma. |
| Mineração | Mineração; Operações de limpeza de metais pesados; Descontaminação de solos; Flutuação. | Umidificação e de formação de espuma, remoção de metais (íons) a partir de soluções aquosas, do solo e de sedimentos, sequestrantes de metais pesados, espalhamento. |
| Alimentícia | Emulsificação e de-emulsificação; Ingrediente funcional; | Solubilização de óleos aromatizados, controlo de consistência, agente de emulsificação, espalhamento, detergentência, formação de espuma e espessante. |
| Agricultura | Biocontrole; Fertilizantes; | Umidificação, dispersão, suspensão de pesticidas em pó e fertilizantes, emulsificação de soluções de pesticidas, facilitação de mecanismos de biocontrole de patógenos, aumento da biodisponibilidade de nutrientes para micro-organismos benéficos associados a vegetais. |
| Limpeza | Detergentes; | Detergentes e desinfetantes de lavanderias. |
| Farmacêutica | Microbiologia; Farmacêutica e terapêutica; | Agentes antiadesivos, antifúngicos, antibacterianos e antivirais, vacinas, moléculas imunomoduladoras. |

Fonte: Adaptado apud SANTOS et al., 2016.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de produção de biossurfactantes através da fermentação submersa utilizando o melaço de cana, um subproduto da indústria açucareira, como substrato, a partir de uma linhagem de *Bacillus safensis* (isolado 28).

3.1 Objetivos específicos

- Realizar caracterização físico-química do melaço;
- Avaliar o crescimento celular e consumo de substrato em meios com glicose, sacarose e melaço;
- Avaliar a porcentagem de emulsificação de biossurfactantes produzidos em meios com glicose, sacarose e melaço;
- Avaliar a influência da suplementação de nitrogênio no crescimento celular e na produção de biossurfactantes;
- Avaliar a capacidade do biossurfactante produzido na redução de tensão superficial do caldo fermentado bruto para os diferentes meios;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Micro-organismo

O micro-organismo utilizado foi o de *Bacillus safensis* (isolado 28), isolada do solo de canavial, cedido pelo Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A cultura de *Bacillus* foi mantida em meio sólido ágar Lúria-Bertani (Tabela 5) em tubos inclinados com 3 mL de meio (pH 6,8). A renovação das células foi feita periodicamente (aproximadamente 30 dias) e realizada por repique em tubos incubados a 37°C, durante 24 horas e em seguida, armazenados a 4°C para sua conservação.

Tabela 5: Composição do meio Lúria-Bertani.

| Composição | g/L |
|---------------------|-----|
| Triptona | 10 |
| Extrato de levedura | 5 |
| Ágar | 5 |

Fonte: Cold Spring Harbor Protocols CSH protocols, 2017.

4.2 Substrato

No processo fermentativo de seleção da linhagem, a glicose e sacarose foram utilizadas como fonte de carbono. Já no processo fermentativo para produção do biossurfactante, foi utilizado o melaço da cana-de-açúcar, fornecido pela usina Japungu do município de Santa Rita, Estado do Paraíba.

O melaço foi armazenado em garrafas plásticas e guardado em refrigerador a uma temperatura de -10°C. Sua diluição e suplementação foi realizada no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp) da UFPB.

4.2.1 Caracterização físico-química do substrato

A caracterização físico-química do melaço (1%, 2%, 3% e 5%) foi realizada quanto ao teor dos açúcares redutores totais (ART) e pH.

4.2.1.1 Teor de açúcares redutores totais (ART)

Para determinação dos açúcares redutores totais utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) descrito por Santos (2007) e que está de acordo com o protocolo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Agroindústria Tropical. Essa metodologia foi, originalmente, proposta por Miller (1959) e baseia-se na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. O reagente DNS possui uma cor amarelada, após o aquecimento, torna-se avermelhado de acordo com a concentração de açúcares redutores presente na solução, o que permite sua leitura em espectrofotômetro a 540nm. A curva padrão foi obtida realizando o teste DNS, utilizando diferentes diluições da solução de glicose 0g/L até 1g/L. Com os valores de absorvância obtidos, foi construída a curva de absorvância versus concentração.

Para determinar a concentração dos açúcares redutores totais foi preciso hidrolisar a amostra, uma vez que o melaço é rico em sacarose. O procedimento ocorreu com a introdução de 1 mL de cada amostra, 0,5 mL de ácido clorídrico e 6 mL de água em um balão volumétrico de 50 mL. O balão foi levado ao banho termostatizado (Banho maria SL 150 - SOLAB) por 10 minutos sobre a temperatura de 70 °C, em seguida foram adicionados 2 mL de NAOH (4N) e água destilada até completar o volume do balão.

O próximo passo consistiu em adicionar em tubos de ensaio 0,5 mL da amostra hidrolisada e 0,5 mL do composto DNS. A amostra foi levada ao banho termostatizado a 100 °C por 10 minutos. Após aquecimento, os tubos foram incubados em banho de gelo por 5 minutos. Por último, adicionou-se 4 mL de água destilada a amostra. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm. O branco é composto de 0,5 mL de água destilada ao invés da amostra. Cada amostra foi analisada em triplicata e a diluição foi considerada para fins de processo.

3.2.1.2 pH

O pH do melaço foi aferido com auxílio de um potenciômetro digital (AKSO – AK 90) previamente calibrado com soluções padrões.

4.2.2 Meios utilizados nos processos fermentativos e condições de produção do biossurfactante

Inicialmente, foram feitos experimentos com glicose e sacarose (Tabela 6), para o conhecimento do comportamento do isolado. Nestes experimentos foi acompanhado o crescimento microbiano, consumo de substrato, porcentagem de emulsificação, e tensão superficial e estes parâmetros foram caracterizados como padrão.

Tabela 6: Meio mineral para perfil cinético glicose/ sacarose.

| Composição | g/L |
|---|-------|
| Glicose/ Sacarose | 20 |
| KH ₂ PO ₄ | 4 |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 0,2 |
| K ₂ HPO ₄ | 7 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1 |
| Extrato de levedura | 1 |
| FeSO ₄ 7H ₂ O | 0,015 |

Fonte: Autor, 2017.

Para verificar a potencialidade do melaço como fonte de carbono para processos fermentativos com fins de produção de biossurfactante foram realizados experimentos com melaço á 5% (Tabela 7). Concomitantemente, foi avaliada a influência da suplementação de nitrogênio, tendo como fonte extrato de levedura, no crescimento microbiano e na produção do biossurfactante. Foi acompanhado também o consumo de substrato, a porcentagem de emulsificação e tensão superficial.

Tabela 7: Meios utilizando melaço como fonte de carbono.

| Composição | Meio 1 | Meio 2 | Meio 3 |
|----------------|--------|--------|--------|
| Melaço (%) | 5 | 5 | 5 |
| Nitrogênio (%) | 0 | 0,5 | 1 |

Fonte: Autor, 2017.

Um planejamento experimental 2², com triplicata do ponto central foi utilizado para avaliar a influência dos fatores: concentração de nitrogênio e concentração de melaço. Uma menor concentração de melaço foi utilizada uma

vez que resultados dos experimentos anteriores apontavam para ao final do processo fermentativo ainda haver substrato disponível. A Tabela 8 apresenta os fatores com os níveis estudados e a Tabela 9 apresenta a matriz do planejamento usado na realização dos ensaios.

Tabela 8: Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^2 .

| Fatores | Níveis | | |
|--------------------|--------|-----|----|
| | -1 | 0 | +1 |
| 1 - Melaço (%) | 1 | 2 | 3 |
| 2 - Nitrogênio (%) | 0 | 0,5 | 1 |

Fonte: Autor, 2017.

Tabela 9: Matriz do planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central.

| Ensaio | 1 | 2 |
|--------|---|---|
| 1 | + | - |
| 2 | - | + |
| 3 | + | + |
| 4 | - | - |
| 5 | 0 | 0 |
| 6 | 0 | 0 |
| 7 | 0 | 0 |

Fonte: Autor, 2017.

O terceiro experimento da triplicata do ponto central não foi avaliado devido à perda dessa condição durante o desenvolvimento dos experimentos, portanto, a análise estatística será realizada após a repetição dessa condição.

Os experimentos iniciais com glicose e sacarose foram realizados em incubadora rotativa refrigerada (Nova Instruments) com aeração de 80% em frascos erlenmeyers de 250mL e volume de meio de 50mL, incubados a 200 rpm e 37°C durante 94h. Amostras foram retiradas de 4 em 4h nas primeiras 12h e de 12 em 12h nas próximas 60h para avaliação das variáveis do processo. O pH inicial de todos os frascos foi de 6,8.

Os experimentos com melaço 5% foram conduzidos em biorreator com volume final de 2200mL, sendo o inoculo 10% do volume de meio do biorreator, volume de ar de 2L/min e o meio era mantido a agitação constante de 200 rpm,

37°C e pH mantido 6,8 durante todo processo, as amostras também eram retiradas de 4 em 4h nas primeiras 12h e de 12 em 12h nas próximas 60h para avaliação das variáveis do processo.

Os experimentos do planejamento experimental foram realizados em incubadora rotativa refrigerada (Nova Instruments) com aeração de 40% em frascos erlenmeyers de 250mL e volume de meio de 155mL incubados a 200 rpm, 37°C durante 60h. Amostras foram retiradas de 4 em 4h nas primeiras 12h e de 12 em 12h nas próximas 60h para avaliação das variáveis do processo. O pH inicial de todos os frascos foi de 6,8. Nesse caso a retirada de amostras foi realizada em câmara de fluxo vertical.

4.3 Inóculo

A reativação celular foi realizada em frascos erlenmeyers de 250mL contendo 50mL de meio de crescimento, mesmo meio utilizado em cada experimento. A transferência do micro-organismo para o meio de crescimento foi realizada em câmara de fluxo vertical com auxílio de uma alça de platina para a retirada de colônias de bactérias crescidas dos tubos inclinados para os frascos contendo o meio de cultivo. Os frascos inoculados foram incubados em mesa agitadora (200rpm e 37°C). O crescimento do micro-organismo foi acompanhado por densidade óptica (D.O. 600nm), ao alcançar a absorbância entre 0,6 e 0,8, foi transferido um volume de 10% (v/v) para o frasco de cultivo ou biorreator (Tec Bio V - Tecnal).

4.4 Análises dos processos fermentativos

Em momentos oportunos, os processos fermentativos foram analisados quanto à concentração de biomassa, consumo do substrato e produção do biossurfactante, para posterior determinação dos parâmetros cinéticos.

4.4.1 Quantificação celular

O crescimento microbiano foi acompanhado através do método turbidimétrico (600nm) e gravimétrico por peso seco. O peso seco consistia em adicionar 2mL de caldo fermentado a um microtubo de massa conhecida, centrifugar (10000 rpm por 10 minutos) e ao final da centrifugação, o

sobrenadante foi descartado. O *pellet* sedimentado foi pesado e levado a estufa (OLIDEF-CZ) a 80 °C por 24h. Em seguida, o *pellet* livre de umidade foi pesado. O procedimento foi realizado em triplicata. O peso seco foi determinado de acordo com a Equação 5.

$$\text{Peso seco (g/mL)} = \frac{(\text{massa do microtubo} + \text{pellet livre de umidade}) - \text{massa do microtubo}}{\text{volume da amostra}}$$

Eq. (5)

4.4.2 Quantificação do substrato

Para determinação do consumo do substrato foi realizada a análise do caldo fermentado isento de células e essa quantificação utilizou a metodologia já descrita na sessão 3.2.1.1.

4.4.3 Análise dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos analisados foram a velocidade específica máxima de crescimento (μ_x), produtividade em células (P_x) e o fator de conversão de substratos em células ($Y_{X/S}$).

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_x) foi estimada pelo método de detecção da fase de crescimento exponencial. Este método implica na linearização da fase exponencial de crescimento, onde a reta ajustada pela linearização que fornece o coeficiente angular equivalente a velocidade específica máxima de crescimento das células no processo fermentativo.

A produtividade em células e o fator de conversão de substrato em células foram determinados pelas equações já descritas anteriormente com base em SCHMIDELL et al., (2001).

4.5 Quantificação do bioproduto

4.5.1 Teste de emulsificação

O índice de emulsificação foi determinado segundo Cooper e Goldberg (1987). A análise consistiu em misturar 4mL do sobrenadante da cultura de micro-organismos de cada amostra a 6mL de óleo vegetal, óleo de motor e querosene separadamente em tubos de ensaio de 15mL que posteriormente

foram agitados vigorosamente em vortex (modelo KMC- 1300V Vortex Mixer VIXAR) por 1min e deixados a 30°C por 24h.

O índice de emulsificação (Equação 6) foi então determinado através da divisão da altura da emulsão pela altura total da coluna e multiplicado por 100.

$$\text{Índice de emulsificação (\%)} = \frac{\text{altura da emulsão (cm)}}{\text{altura total da coluna (cm)}} \times 100 \quad \text{Eq. (6)}$$

4.5.2 Tensão superficial

A medida da tensão superficial é uma ferramenta comum e um método indireto para monitorar a produção de biossurfactantes. À medida que o micro-organismo se desenvolve ele sintetiza o biossurfactante e este é encontrado no caldo fermentado reduzindo tensão superficial (BEZERRA, 2016).

A leitura da tensão superficial foi feita em tensiômetro (Sensadyne – modelo QC6000) que tem como parâmetro dispersão de bolhas. As análises foram feitas com o sobrenadante obtido após a centrifugação do caldo fermentado de cada amostra, a uma temperatura de 25°C. A cada início de análise a tensão superficial da água destilada, cujo valor é de aproximadamente 72 mN/m, foi verificada, garantindo a calibração do tensiômetro.

4.5.3 Pré-purificação do biossurfactante

O caldo fermentado e espuma dos experimentos conduzidos em biorreator com concentração de 5% de melaço foram centrifugados a 4500 rpm durante 20 minutos para retirar as células e submetidos ao processo de extração. O pH foi ajustado para 2 com solução de HCl 6,0 mol/L e precipitado com 2 volumes de metanol, para recuperação do biossurfactante segundo a metodologia sugerida por Sobrinho (2007).

Após repouso durante 24 horas a 0°C, as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 30 minutos, lavadas com metanol gelado por duas vezes e secas em estufa a 37°C por 48 horas, mantidas em dessecador até peso constante, sendo o rendimento em produto isolado, calculado em mg/L.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química do substrato

A caracterização do melaço utilizado como substrato no processo de produção de biossurfactante, está apresentada na Tabela 10.

Tabela 10: Caracterização do melaço.

| Melaço (%) | ART ([gli]g/L) | pH |
|------------|----------------|------|
| 5 | 39,80 | 6,33 |
| 3 | 30,63 | 6,39 |
| 2 | 20,50 | 6,44 |
| 1 | 12,00 | 6,49 |

Fonte: Autor, 2017.

O melaço diluído foi caracterizado pelo teor de açúcares redutores igual a 39,80; 30,63; 20,50 e 12 mg de ART/mL de amostra para as concentrações de 5%, 3%, 2% e 1% (v/v) de melaço, respectivamente. Demonstrou ter uma acidez próxima da neutralidade, sendo necessário ainda sim corrigir o pH para o mais próximo da neutralidade (6,8+/- 0,1) durante o preparo do meio para cultivo.

5.2 Análises dos processos fermentativos

Foram realizados 11 experimentos em diferentes condições, em 1 deles a fonte de carbono foi a glicose, em 1 outro a fonte de carbono foi a sacarose e nos outros 9 a fonte de carbono foi o melaço. Nesses últimos a concentração de melaço e de nitrogênio foram as variantes.

Em todos os cultivos as características do meio de fermentação sofreram alterações visuais. O meio, antes de ser inoculado, apresentava uma coloração marrom translúcida, devido ao processo de esterilização, mas no decorrer do processo fermentativo, o cultivo foi adquirindo turbidez, consequência do crescimento celular. O aroma também foi alterado para o cheiro característico do processo fermentativo.

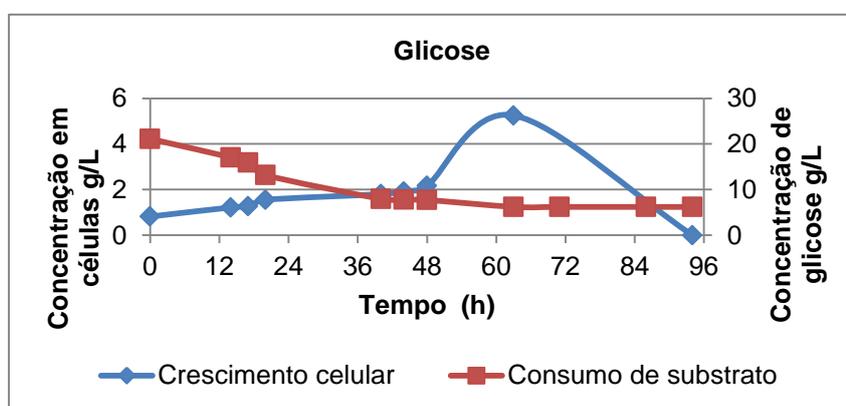
Os processos fermentativos foram analisados quanto à concentração de células, consumo do substrato e produção do biossurfactante. Para todos os cultivos foi plotado um gráfico da concentração celular e consumo de substrato em função do tempo, descrevendo a cinética do isolado nas condições de processo, os parâmetros cinéticos também foram determinados para todos os ensaios e constam nos apêndices os intervalos utilizados para linearizar a concentração de x e calcular assim o valor de μ_x máx para cada condição.

5.2.1 Cinética de crescimento e consumo de substrato dos experimentos com glicose e sacarose

Os processos fermentativos utilizando glicose e sacarose como fonte de substrato foram realizados com a finalidade de conhecer o comportamento do *B. safensis* em cultivo submerso, uma vez que fora isolada do solo canavieiro e não existem registros sobre o seu crescimento.

A Figura 2 ilustra o perfil de crescimento celular e consumo de substrato observado no cultivo com glicose. Como é visto, a *B. safensis* apresentou uma duplicação de concentração nas primeiras 48h de cultivo, passando de 0,8g/L em 0h para 1,92g/L. Logo em seguida, após as 48h, houve um crescimento mais acentuado do micro-organismo no meio proposto, atingindo o máximo de concentração celular, 5,25g/L, em 63 horas de cultivo. Observou-se ainda, que um rápido consumo de glicose durante as primeiras 48h, passando de 21,11g/L para 7,71g/L e atingindo em 96 horas a concentração final de substrato de 6,18g/L. Diante dos resultados obtidos nesse experimento, os parâmetros cinéticos foram determinados, sendo apresentados na Tabela 11.

Figura 2: Perfil cinético de *B. safensis* utilizando glicose como substrato.



Fonte: Autor, 2017.

Tabela 11: Parâmetros cinéticos *B. safensis* com glicose.

| Parâmetros | Valores | Unidades |
|-------------|---------|--------------------|
| μ_x máx | 0,0547 | h^{-1} |
| P_x | 0,0706 | $g.L^{-1} .h^{-1}$ |
| $Y_{x/s}$ | 0,2969 | $gx.gs^{-1}$ |
| t_g | 14,17 | H |

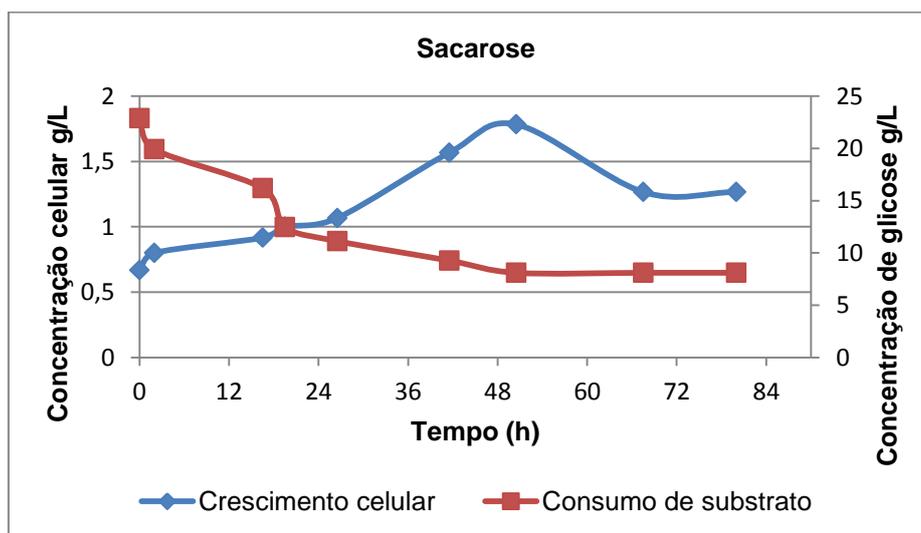
Fonte: Autor, 2017.

Os parâmetros cinéticos para o cultivo com glicose (Tabela 11) foram: velocidade específica de crescimento, $\mu_x = 0,0547h^{-1}$, produtividade em células, $P_x = 0,0703 g.L^{-1} .h^{-1}$, fator de conversão de substrato em células, $Y_{x/s} = 0,2969 g_x.g_s^{-1}$ e tempo de geração, $t_g = 14,17h$.

Suwansukho et al. (2008) descreveram a produção de biossurfactante por *B. subtilis* MUV4 em glicose e obteve uma velocidade de crescimento específico ($\mu_{x\text{máx}}$) de $0,14 h^{-1}$, o que demonstra um valor compatível alcançado nesse trabalho de $0,0547h^{-1}$.

A Figura 3 ilustra o perfil de crescimento celular e consumo de substrato observado no cultivo com sacarose para a mesma composição de meio durante 80h de cultivo.

Figura 3: Perfil cinético da *B. safensis* utilizando sacarose como substrato.



Fonte: Autor, 2017.

Observa-se, uma fase de crescimento de 0 a 51h de cultivo. Nessa fase a concentração de células passou de $0,7g/L$ para $1,78g/L$. Comparando com o

cultivo com glicose como substrato, nota-se que a glicose proporcionou maior desenvolvimento da linhagem, considerando que atingiu uma concentração de 5,25 g/L em 63 h de cultivo, enquanto para o cultivo com sacarose foi de 1,784g/L em 51h. Com relação ao consumo de substrato, partiu de uma concentração inicial de 22,89g/L para 8,1 g/L em 51 horas de cultivo. Para essas observações do cultivo, foram determinados parâmetros cinéticos.

Os parâmetros cinéticos encontrados para sacarose (Tabela 12) foram $\mu_x = 0,0176 \text{ h}^{-1}$ com um tempo de geração, $t_g = 34,65\text{h}$ e $Y_{X/S} = 0,0755 \text{ g}_x \cdot \text{g}_s^{-1}$. A velocidade de produção de células em cada hora de cultivo foi de $P_x = 0,0223 \text{ g/L.h}$.

Tabela 12: Parâmetros cinéticos *B. safensis* com sacarose.

| Parâmetros | Valores | Unidades |
|---------------------|---------|------------------------------------|
| $\mu_x \text{ máx}$ | 0,0176 | h ⁻¹ |
| P_x | 0,0223 | g.L ⁻¹ .h ⁻¹ |
| $Y_{X/S}$ | 0,0755 | gx.gs ⁻¹ |
| t_g | 34,65 | H |

Fonte: Autor, 2017.

5.2.2 Cinética de crescimento e consumo de substrato dos experimentos com melaço 5%

Os experimentos para verificar a potencialidade do melaço como fonte de carbono para fins de produção de biossurfactante e a influência da suplementação de nitrogênio nesses processos ocorreram em biorreator nas mesmas condições já citadas anteriormente e apresentaram os parâmetros cinéticos descritos na Tabela 13. Para os cultivos sem suplementação de extrato de levedura o μ_x foi de $0,0141 \text{ h}^{-1}$, com um tempo de geração de 49,15h, $Y_{X/S}$ de $0,00917 \text{ gx.gs}^{-1}$ e a velocidade de produção de células a cada hora de cultivo, P_x de $0,0917 \text{ g/L.h}$.

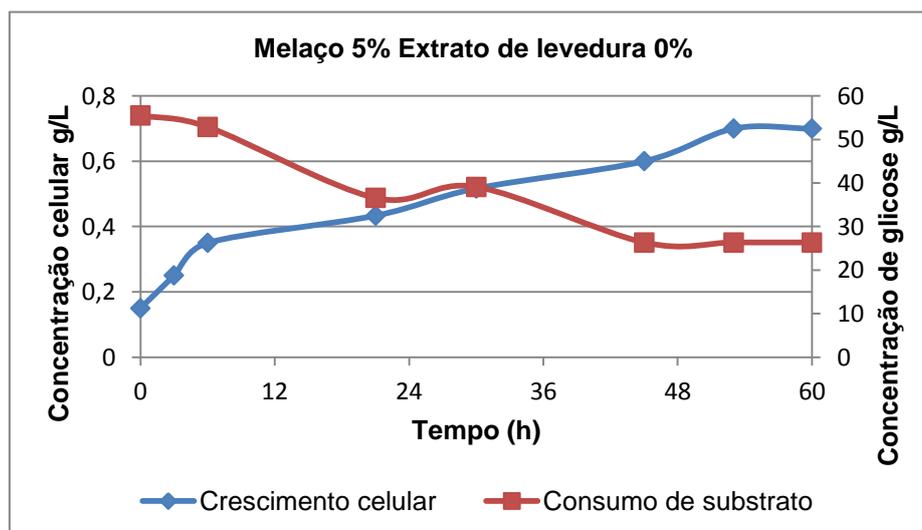
Tabela 13: Parâmetros cinéticos *B. safensis* com melão 5%.

| Melão 5% | Parâmetros | μ_x máx (h ⁻¹) | P_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) | $Y_{x/s}$ (gx.gs ⁻¹) | t_g (h) |
|--------------------------|------------|-----------------------------------|--|-------------------------------------|--------------|
| Extrato de levedura 0% | | 0,0141 | 0,00917 | 0,019 | 49,15 |
| Extrato de levedura 0,5% | | 0,022 | 0,0252 | 0,04 | 31,5 |
| Extrato de levedura 1% | | 0,038 | 0,0902 | 0,076 | 18,24 |

Fonte: Autor, 2017.

A Figura 4 demonstra o perfil de crescimento celular e consumo de substrato do cultivo com melão a 5% sem suplementação de nitrogênio. Nesse ensaio a linhagem 28 apresentou baixo crescimento se comparado aos cultivos anteriores, com concentração máxima de 0,7g/L, embora o crescimento tenha se mantido até as 53h de cultivo. No início do cultivo haviam 55g/L de glicose e em 45h esse valor foi reduzido para 26,35g/L.

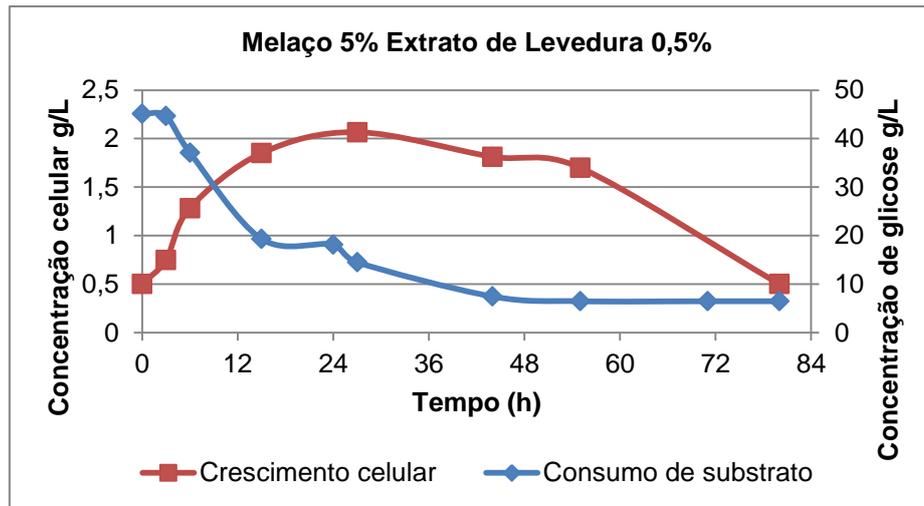
Figura 4: Perfil cinético de *B. safensis* utilizando melão 5%, sem suplementação.



Fonte: Autor, 2017.

Na Figura 5, cultivo com suplementação de 0,5% de melão, é possível observar uma fase exponencial acentuada e característica com crescimento até às 27h de cultivo, a concentração celular atinge 2,07g/L. Nesse período houve elevado consumo de substrato, mais de 50% do substrato e dos 45g/L iniciais somente 6,46g estavam disponíveis ao final do processo fermentativo.

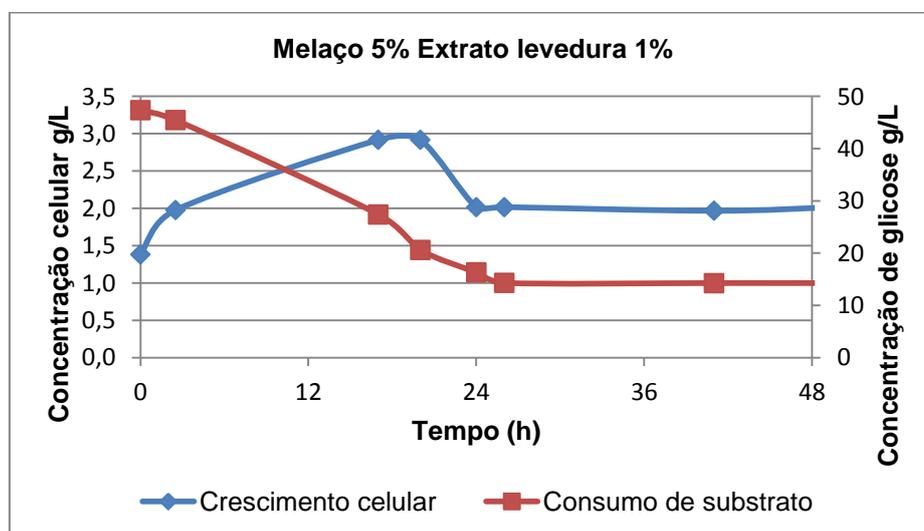
Figura 5: Perfil cinético da *B. safensis* utilizando melaço 5%, extrato de levedura 0,5%.



Fonte: Autor, 2017.

Os experimentos com melaço 5% e suplementação de nitrogênio de 0,5% apresentaram o μ_x de $0,022 \text{ h}^{-1}$, com um tempo de geração de 31,5h, $Y_{X/S}$ de $0,04 \text{ gx.gs}^{-1}$ e a velocidade de produção de células a cada hora de cultivo, P_x de $0,252 \text{ g/L.h}$.

Figura 6: Perfil cinético de *B. safensis* utilizando melaço 5% e extrato de levedura 1%.



Fonte: Autor, 2017.

A Figura 6 mostra o perfil cinético para a linhagem 28 no cultivo em biorreator com melaço 5% e suplementação de extrato de levedura 1%(v/v). A concentração máxima de células alcançou valores de $2,92 \text{ g/L}$ em 17h de cultivo, de $1,38 \text{ g/L}$ até alcançar essa concentração foram aproximadamente

20g de substrato. O consumo de substrato chegou em 16,30g das 47,36 iniciais em 24h e caiu para 14,25g em 41h de cultivo.

Os parâmetros cinéticos com melaço 5% com suplementação de nitrogênio de 1% foram de $\mu_x = 0,038h^{-1}$, com um tempo de geração de 18,24 h, YX/S de 0,076 gx.gs⁻¹ e a velocidade de produção de células a cada hora de cultivo, P_x de 0,0902 g/L.h.

No que tange a suplementação com nitrogênio, os cultivos nos meios contendo suplementação de extrato de levedura como fonte de nitrogênio apresentaram maior incremento na biomassa celular. Resultados semelhantes foram observados em estudos com *B. subtilis* R14 realizados por Oliveira (2006).

5.2.3 Cinética de crescimento e consumo de substrato dos experimentos do planejamento experimental

Os experimentos do planejamento experimental foram realizados avaliando a influência dos fatores: concentração de nitrogênio e concentração de melaço no crescimento microbiano e na produção do biosurfactante. As condições 5 e 6 são as duas repetições do ponto central e apresentam 2% de melaço e 0,5% de extrato de levedura. Os dados por estarem apenas em duplicata não puderam ser submetidos a análise estatística.

O perfil cinético observado está demonstrado a seguir nas Figura 5 e Figura 6. Em ambos gráficos, pode ser observado um crescimento moderado de 0 a 10h de cultivo seguido da fase exponencial que se estende até 32h de fermentação. O valor máximo de concentração celular obtido foi de 3,35g/L para condição 5 e 3,4g/L para condição 6. O consumo de substrato é mais acentuado até às 24h de processo e em 32h se mantém constante em aproximadamente 10% do valor inicial.

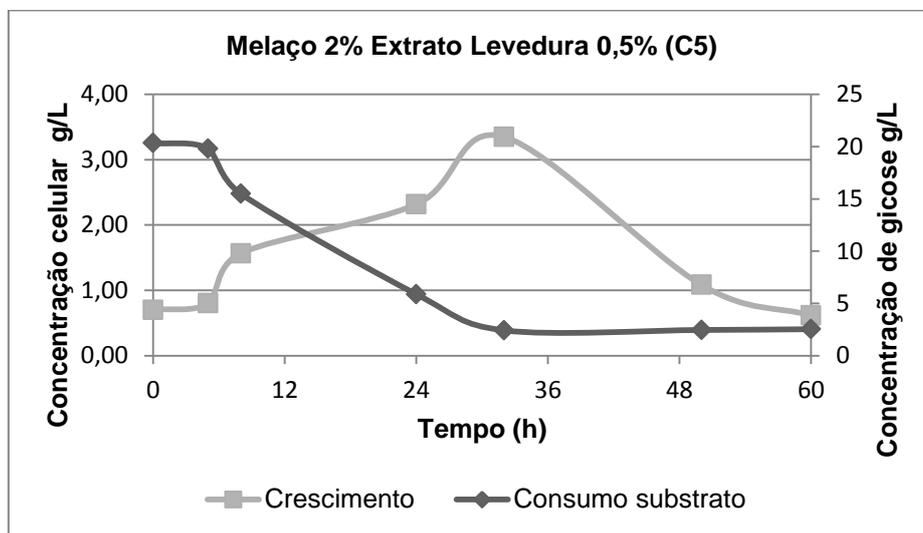
Os parâmetros cinéticos para as condições 5 e 6 foram μ_x de 0,031/ 0,0281 h⁻¹, com um t_g de 22,65/ 23h, YX/S de 0,148 /0,149 gx.gs⁻¹ e P_x de 0,04417/ 0,4417 g/L.h. respectivamente como constam na Tabela 14.

Tabela 14: Parâmetros cinéticos *B. safensis* planejamento fatorial 2^2 com triplicata no ponto central incompleto.

| Condições | μ_x máx (h ⁻¹) | Px (g.L ⁻¹ .h ⁻¹) | YX/S (gx.gs ⁻¹) | t _g (h) |
|-----------|-----------------------------------|---|--------------------------------|-----------------------|
| 1 | 0,0349 | 0,0167 | 0,1694 | 19,86 |
| 2 | 0,0759 | 0,0595 | 0,4181 | 9,13 |
| 3 | 0,0428 | 0,0508 | 0,1754 | 16,19 |
| 4 | 0,0663 | 0,0411 | 0,2228 | 10,45 |
| 5 | 0,0306 | 0,0441 | 0,1487 | 22,65 |
| 6 | 0,0280 | 0,0442 | 0,1498 | 23,10 |

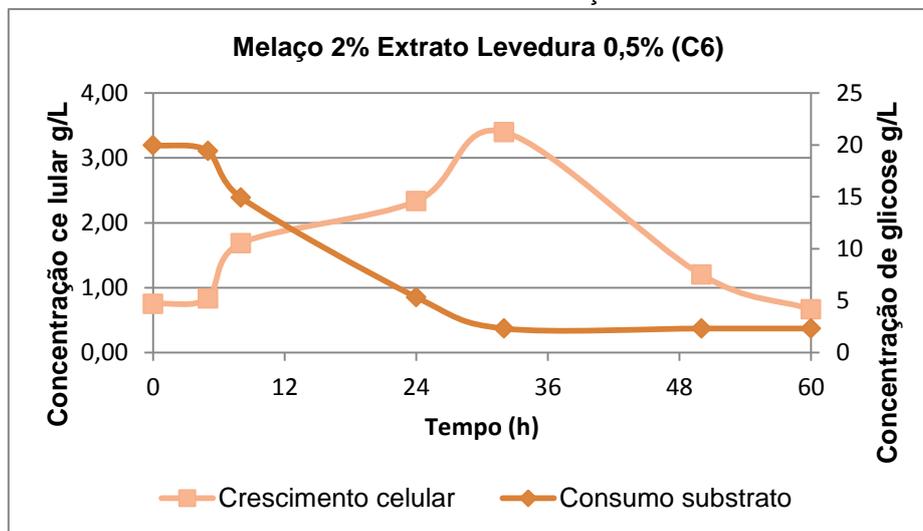
Fonte: Autor, 2017.

Figura 7: Perfil cinético da *B. safensis* utilizando melão 2% e extrato de levedura 0,5%.



Fonte: Autor, 2017.

Figura 8: Perfil cinético da *B. safensis* utilizando melão 2% e extrato de levedura 0,5%.

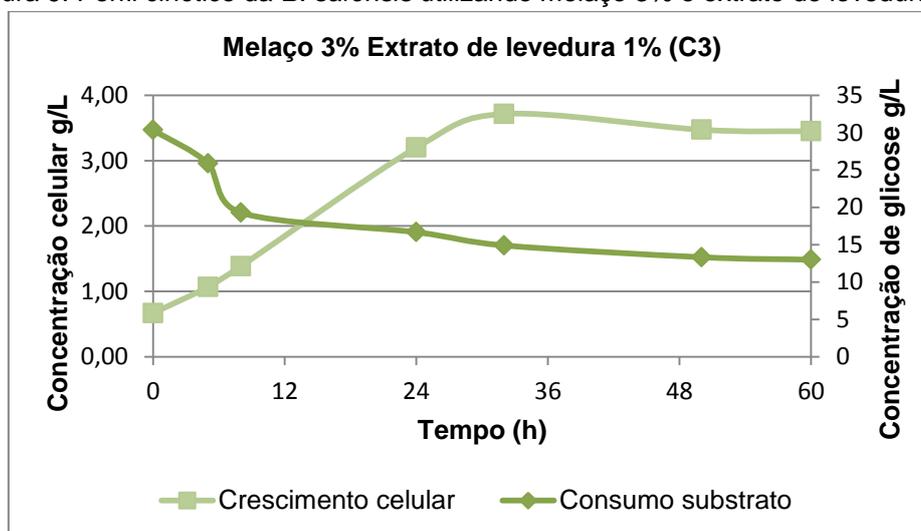


Fonte: Autor, 2017.

Para avaliar a influência da concentração de nitrogênio foram comparados os cultivos 1 e 3 (perfil de crescimento celular e consumo de substrato de acordo Figura 9 e 10) uma vez que diferem apenas na concentração de nitrogênio de seus respectivos.

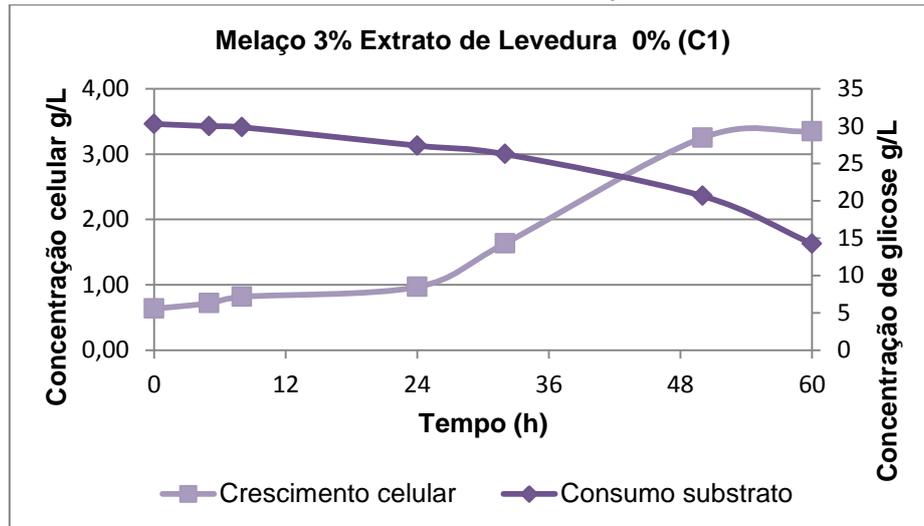
A Figura 9 (condição 3) ilustra um crescimento celular pronunciado até às 32h de fermentação, a concentração celular máxima é de 3,71g/L e atinge fase estacionária às 36h de cultivo que se estende até às 60h. Diferentemente na Figura 10 (condição 1) é observado um crescimento muito baixo nas primeiras 24h quando então a linhagem entra em fase exponencial e o perfil da curva sugere uma fase estacionária a partir das 48h. Nesse ensaio a concentração máxima de células é de 3,25g/L. Quanto ao consumo de substrato ao final da fermentação a condição 3 apresenta 12,99g/L e a condição 1 apresenta 14,26 g/L.

Figura 9: Perfil cinético da *B. safensis* utilizando melão 3% e extrato de levedura 1%.



Fonte: Autor, 2017.

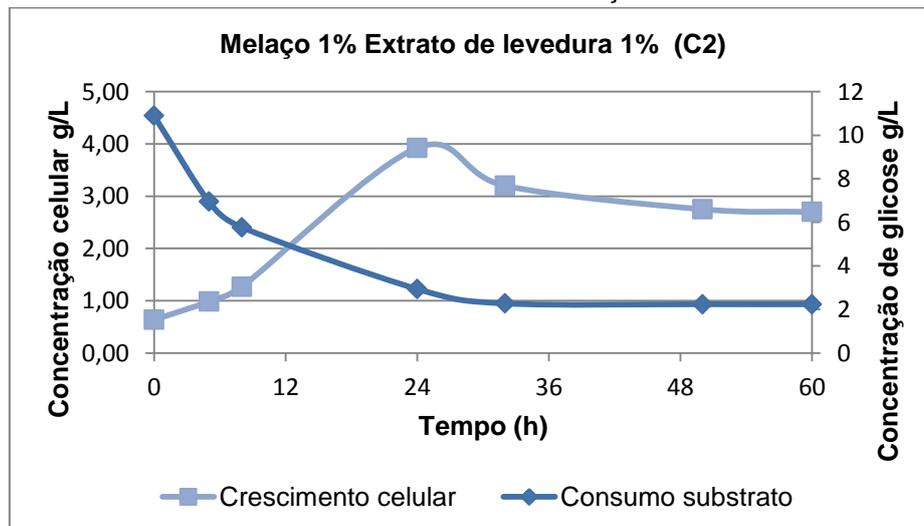
Figura 10: Perfil cinético da *B. safensis* utilizando melão 3% e extrato de levedura 0%.



Fonte: Autor, 2017.

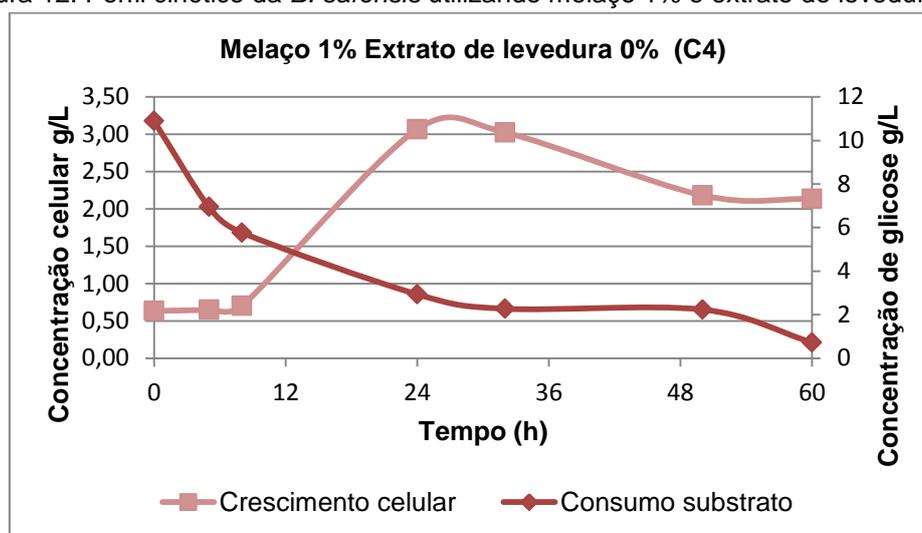
Os cultivos 2 e 4 também foram comparados com o intuito de avaliar a influência da concentração de nitrogênio no perfil de crescimento celular e consumo de substrato conforme mostra Figura 11 e 12. Para a condição 2 (melão 1% e extrato de levedura 1%) a linhagem utilizou 9g de substrato e atingiu uma concentração de aproximadamente 3,9g/L de células em 24h, sugerindo que a relação concentração de carbono/ concentração de nitrogênio pode otimizar o crescimento celular; Uma vez que a mesma condição sem suplementação (condição 4) atingiu uma concentração máxima de apenas 3,01g/L nas mesmas 24h, porém com consumo quase que total de substrato, restando menos de 1g ao final da fermentação.

Figura 11: Perfil cinético da *B. safensis* utilizando melão 1% e extrato de levedura 1%.



Fonte: Autor, 2017.

Figura 12: Perfil cinético da *B. safensis* utilizando melaço 1% e extrato de levedura 0%.



Fonte: Autor, 2017.

Para avaliar a influência da concentração de melaço, os cultivos 1 e 4; e 2 e 3 foram comparados tendo em vista que apenas diferem na concentração de melaço com seus respectivos. Quando comparado os cultivos 1 e 4 nota-se que o aumento da oferta de substrato na condição 1, favorece o crescimento celular que atinge uma fase exponencial em 24h e se mantém constante por pelo menos 60h; Enquanto que para condição 4 a fase exponencial esta compreendida entre 12 e 24h quando começa a fase de declínio.

Se comparadas as condições 2 e 3, a condição 3 que apresenta maior substrato disponível deveria apresentar o maior crescimento celular porém este fato não é constatado nesse experimento, onde concentração celular máxima é de 3,71g/L e para condição 2 uma concentração de aproximadamente 3,9g/L de células. A relação carbono/nitrogênio pode explicar esse resultado. A condição 2 também usa uma menor concentração de substrato 9g versus as 14g utilizadas na condição 3.

5.3 Produção do biossurfactante

É característica do processo fermentativo de síntese de biossurfactante a produção de espuma. Esse fato foi observado nos cultivos, principalmente nos cultivos realizados em biorreator com suplementação de extrato de levedura, como é o caso do cultivo com 5% de melaço e 0,5% de extrato de levedura representado na Figura 13.

Figura 13: Cultivo em biorreator (a). *B. safensis*, melação 5%, extrato de levedura 1%, 200 rpm, pH 6,8, 37°C. Formação de espuma às 17h de cultivo (b-c). Espuma condensada após 21h de cultivo(d).



Fonte: Autor, 2017.

5.3.1 Índice de emulsificação

Os resultados dos índices de emulsificação estão demonstrados a partir das 40h de processo fermentativo onde se observou maior crescimento celular. As figuras a seguir representam o perfil obtido em dadas condições.

Uma ocorrência constante nos índices de emulsificação foi a ausência de índices consideráveis para o óleo vegetal e querosene, como verificado na Figura 14. Para o óleo de motor foram observados índices de emulsificação consideráveis que indicam de maneira indireta a produção do biossurfactante. O indicativo de produção de biossurfactante foi maior no cultivo com sacarose que com glicose, o cultivo com glicose apresentou o melhor índice de

emulsificação em 63h de cultivo de 67% de emulsificação (Figura 15). O cultivo com sacarose apresentou valores maiores que 60% a partir das 41h e apenas em 73h de cultivo esse indicativo descesse (Figura 16).

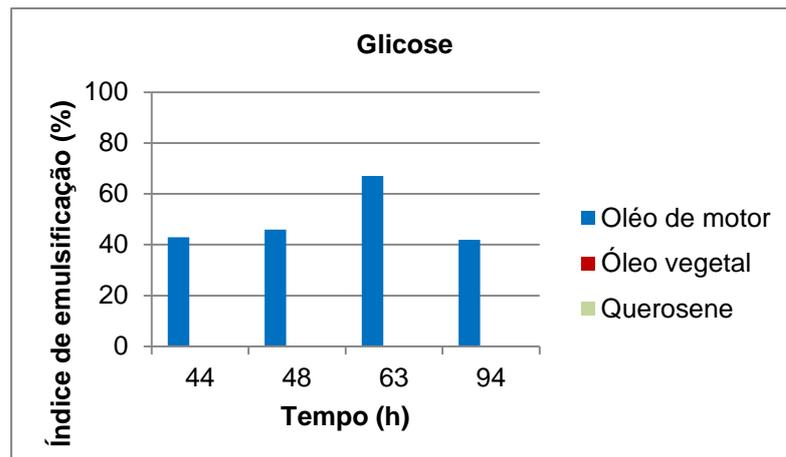
Figura 14: Teste de emulsificação com óleo de motor (a), óleo vegetal (b) e querosene (c) utilizando caldo fermentado *B. safensis*, melão 5% e extrato de levedura 0,5%.



Fonte: Autor, 2017.

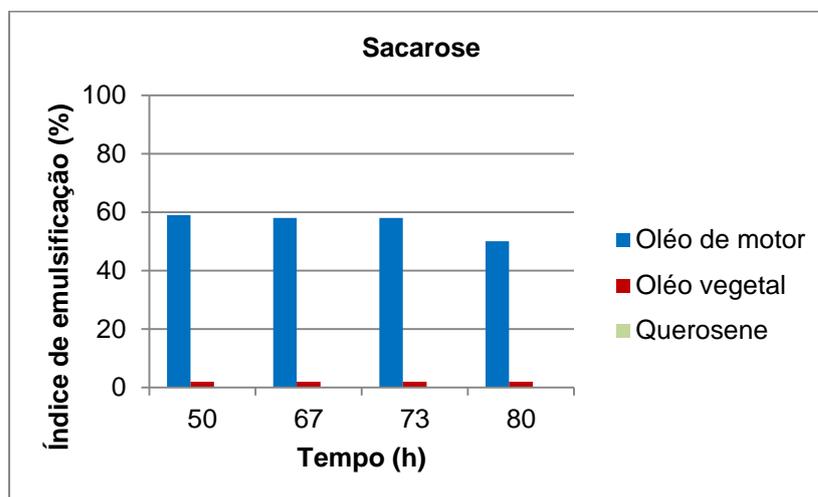
Um estudo mostrou que em 48h uma concentração máxima de biossurfactante é produzida e que sua produção permaneceu constante até 72h para *B. subtilis* em biorreator utilizando um meio mineral suplementado com glicose e frutose. Esse mesmo estudo concluiu também que a produção de biossurfactante ocorreu em associação com o crescimento celular (GIRO, 2009).

Figura 15: Perfil da porcentagem de emulsificação *B. safensis* em glicose.



Fonte: Autor, 2017.

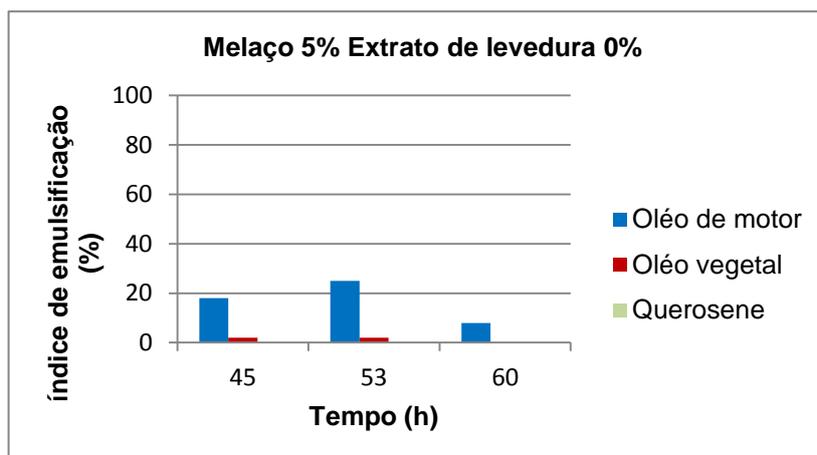
Figura 16: Perfil da porcentagem de emulsificação *B. safensis* em sacarose.



Fonte: Autor, 2017.

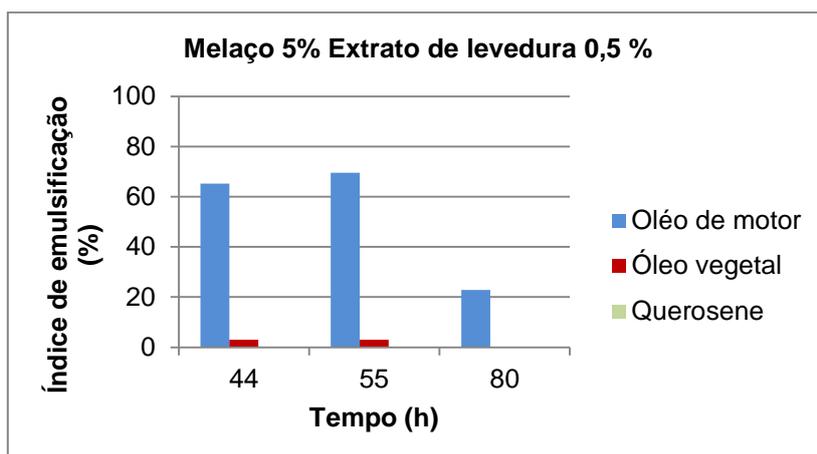
Para o cultivo em biorreator com melaço 5% e sem suplementação de nitrogênio um baixo índice de emulsificação foi observado, média de 17% para 45h, 53h e 60h (Figura 17). Os cultivos com suplementação apresentaram médias maiores, sendo a média do suplementado com 0,5% de extrato de levedura de 52% para 44h, 55h e 80h (Figura 18); e a média do suplementado com 1% de extrato de levedura de 29% para 41h, 50h e 60h (Figura 19); todos os casos para óleo de motor, os demais óleos não apresentaram índices de emulsificação consideráveis.

Figura 17: Perfil da porcentagem de emulsificação *B. safensis* em melão 5%, extrato de levedura 0%.



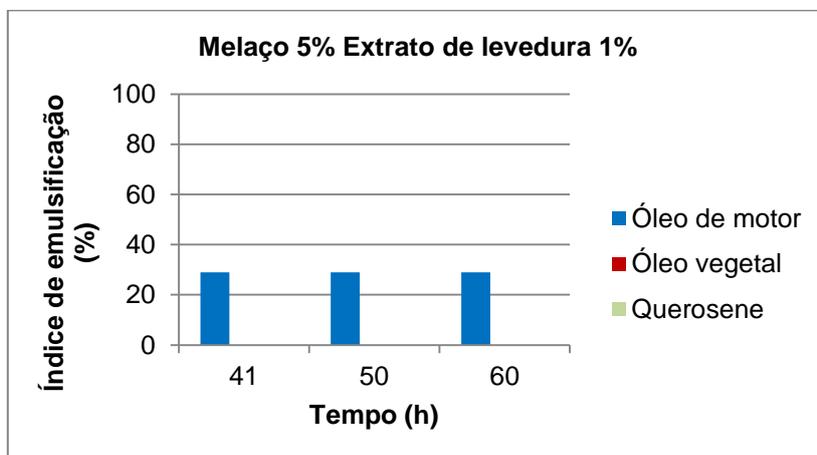
Fonte: Autor, 2017.

Figura 18: Perfil da porcentagem de emulsificação *B. safensis* em melão 5%, extrato de levedura 0,5%.



Fonte: Autor, 2017.

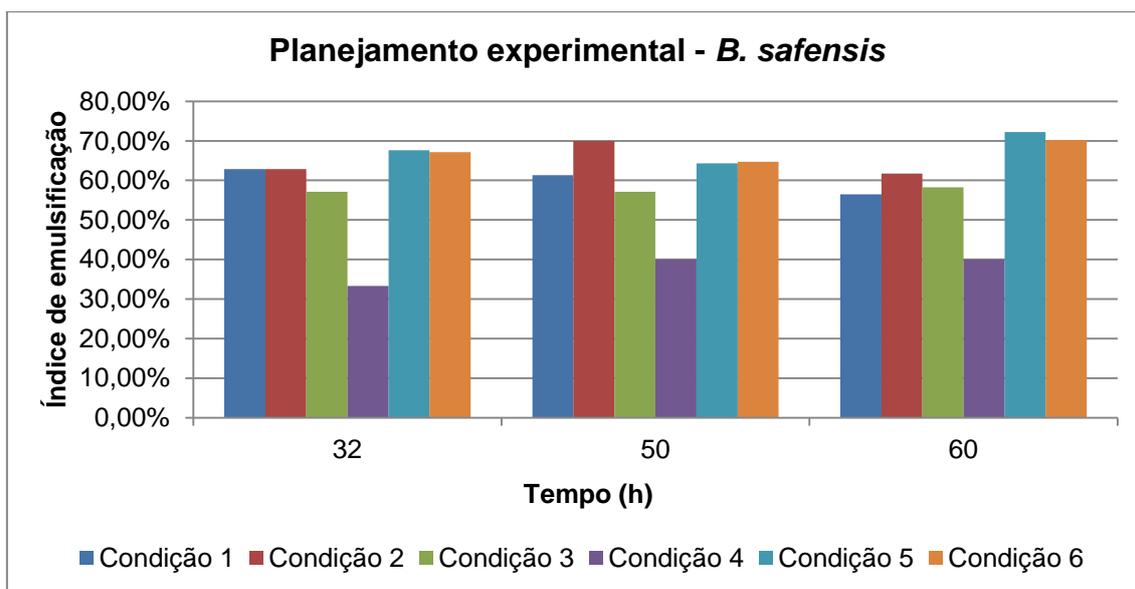
Figura 19: Perfil da porcentagem de emulsificação *B. safensis* em melão 5%, extrato de levedura 1%.



Fonte: Autor, 2017.

Para o planejamento experimental os índices de emulsificação com óleo de motor (Figura 20) foram todos superiores a 55%, exceto para a condição 4 que obteve a menor média num valor de 37,78% para 32h, 50h e 60h. As condições 4 e 5 apresentaram as maiores médias de índices de emulsificação em torno de 67% e o tempo de 60h foi que apresentou o maior valor, 71% de emulsificação.

Figura 20: Perfil da porcentagem de emulsificação para óleo de motor *B. safensis* – planejamento experimental.



Fonte: Autor, 2017.

5.3.2 Tensão superficial

A medida da tensão superficial para os experimentos com melação 5% foi aferida ponto a ponto (Tabela 15). Observa-se que nos pontos 2 e 3 (entre 15 e 17h de cultivo) a tensão superficial começa a reduzir para os cultivos com suplementação de nitrogênio.

Alguns autores relatam que biossurfactantes de alto peso molecular podem ser proteínas (LEVISAUSKAS et al., 2004). Desta forma a relação carbono-nitrogênio (C/N) é um fator importante para a produção dessa proteína.

Tabela 15: Tensão superficial *B. safensis*, experimentos com melaço 5%.

| Melaço 5% | Tensão Superficial | 0h | 3h | 6h | 20h | 32h | 53h | 60h | ΔTS máx |
|--------------------------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|-----------------|
| Extrato de levedura 0% | | 72,5 | 69 | 71,9 | 71 | 71 | 71,4 | 71,7 | 3,5 |
| Extrato de levedura 0,5% | | 71,2 | 70,6 | 70,8 | 69,6 | 68,7 | 68,3 | 67,4 | 3,8 |
| Extrato de levedura 1% | | 71,4 | 71,2 | 59,3 | 65,5 | 65,6 | 65,2 | 67,1 | 12,1 |

Fonte: Autor, 2017.

A medida da tensão superficial para o planejamento experimental está descrita na Tabela 16. Foram aferidas as tensões superficiais dos pontos iniciais e finais de cada condição. A condição que mais reduziu a tensão foi a condição 3 que apresenta 3% de melaço e 1% de nitrogênio.

Tabela 16: Tensão superficial *B. safensis*, experimentos do planejamento experimental.

| Tensão superficial | P_i (0h) | P_f (60h) | ΔTS |
|--------------------|------------|-------------|-------------|
| C1 | 73,6 | 69,9 | 3,7 |
| C2 | 72,3 | 70,2 | 2,1 |
| C3 | 72 | 62,2 | 9,8 |
| C4 | 73,2 | 70,4 | 2,8 |
| C5 | 72,5 | 67,1 | 5,4 |
| C6 | 72,3 | 66,9 | 5,4 |

Fonte: Autor, 2017.

Embora haja indicativos da produção de biossurfactante em nenhum dos cultivos a tensão superficial foi reduzida para valores menores que 59,3 mN/m, valor esse obtido no cultivo com melaço 5% e extrato de levedura 1%. Nitschke; Ferraz; Pastore (2014) observaram a redução da tensão superficial para alguns isolados bacterianos a partir de melaço, de 72 mN/m para 34,97 mN/m resultado que não se assemelha com os obtidos nesse estudo.

A produção de biossurfactante pelo isolado 28 pode está relacionada ao crescimento celular, como ocorre com *Bacillus* sp. (VALTER, 1986), no entanto, este não é um fator determinante; sendo muito mais considerável a relação entre carbono e nitrogênio oferecida. Khiangam et al. (2014) descreveu linhagens de *B. safensis* capazes de produzir enzimas industriais como

amilases, celulases, proteases e lipases; pode-se inferir que a produção de enzimas justificaria então a ausência de consideráveis reduções superficiais devido desvios da rota metabólica.

5.3.3 Pré-purificação do biossurfactante

O caldo fermentado e espuma dos experimentos conduzidos em biorreator com concentração de 5% de melaço foram recuperados e o rendimento em produto isolado foi de 0,03320 / 0,0023 g/mL para o experimento sem suplementação de nitrogênio, de 0,06115/ 0,00499 g/mL para o experimento com 0,5% de suplementação e de 0,04759/ 0,0043 g/mL para o com 1% de suplementação, para uma relação caldo fermentado e a espuma respectivamente.

Tabela 17: Pré-purificação do biossurfactante de *B. safensis* experimentos com melaço 5%.

| Melaço 5% | Pré-purificado | Caldo Fermentado (g/ml) | Espuma (g/ml) |
|-----------|--------------------------|----------------------------|------------------|
| | Extrato de levedura 0% | 0,03320 | 0,0023 |
| | Extrato de levedura 0,5% | 0,06115 | 0,00499 |
| | Extrato de levedura 1% | 0,04759 | 0,0043 |

Fonte: Autor, 2017.

Em posse dos dados da pré-purificação infere-se que para a mesma concentração de melaço 5%, a melhor condição de suplementação de nitrogênio foi de 0,5% (Tabela 17).

Bezerra (2016) em um estudo com linhagem isolada de poço de petróleo em Mossoró/Natal, utilizando melaço observou que para as mesmas condições de aeração, temperatura, rotação e concentração de substrato, o aumento da concentração de nitrogênio favorecia a síntese do biossurfactante, porém a concentração máxima avaliada por ele foi de 3% de melaço.

Os valores pré-purificados do biossurfactante para a melhor condição estão próximos dos valores relatados na literatura COUTTE et al (2010), descreve para *B. subtilis* ATCC 21332, produções de biossurfactante próximas a 500 mg.L⁻¹.

6 CONCLUSÕES

O resíduo de melaço de cana apresentou resultados promissores e pode ser explorado como substrato alternativo para a produção de biossurfactantes de baixo custo.

A *B. safensis* (isolado 28) demonstrou indícios de produção de biossurfactante com alta atividade emulsificante, porém requer mais estudos para esclarecimento do perfil de biossurfactante produzido.

Ao que se refere à fermentação em estado submerso utilizando melaço-de-cana como substrato, a linhagem *B. safensis* (isolado 28) tem melhor crescimento em meios suplementados com extrato de levedura (fonte de nitrogênio) com melhor capacidade de emulsificação.

7 REFERÊNCIAS

- ALTAF, M. D.; NAVEENA, B. J.; VENKATESHWAR, M.; KUMAR, V.; REDDY, G. Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract – optimization by RSM. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 465-472, 2006.
- ASSADI M.; TABATABAEE M. S. Biosurfactants and their use in upgrading petroleum vacuum distillation residue: a review. **Int. J. Environ. Res.** v. 4, p. 549–572, 2010.
- BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 87, n. 2, p. 427-444, 2010.
- BARROS, F.F.C.; QUADROS, C. P. de; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, ed. 4, v. 28, p. 979-985, 2007.
- BEZERRA, M. S. Levantamento e avaliação de critérios para a ampliação da escala de produção de biossurfactantes utilizando melão como substrato. 2006. Dissertação (Mestrado) - **Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química**, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 152, n. 1, p. 41-52, 1999.
- BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; *Biotechnologia Industrial*, v. 1, **Editora Edgard Blucher LTDA**, 2008.
- CAMPOS, J. M.; MONTENEGRO STAMFORD, T. L.; SARUBBO, L. A.; DE LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; BANAT, I. M. Microbial biosurfactants as additives for food industries. **Biotechnology Progress**, v.29, n.5, p.1097–1108, 2013.
- COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis Bombicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 173-176, 1984.
- COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A.; Application of solid-state fermentation to food industry – a review. **Journal of Food Engineering**, 2006.
- COUTTE, F.; LECOUTURIER, D.; YAHIA, S.A; LECLÈRE, V.; BÉCHET, M.; JACQUES, F.; DHULSTER, P. Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor, **Applied Environmental Microbiology**, v. 87, p. 499-507, 2010.
- DE MARCO, E.G. Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de *Bacillus* sp. 2012. 97f. Dissertação (Mestre em Microbiologia

Agrícola e do Ambiente) – **Instituto de Ciências Básicas da Saúde**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS.

DE OLIVEIRA, D.W.F.; FRANÇA, I.W.L.; FÉLIX, A.K.N.; MARTINS, J.J.L.; GIROA, M.E.A.; MELO, V.M.M., GONÇALVES, L.R.B. Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 34- 43, 2013.

DESAI J.D.; DESAI A.J. Production of biosurfactants. In: **Kosaric N. editor**. Biosurfactants: production, properties, applications. New York: Marcel Dekker, 1993.

DIAZ, M. J.; EUGENIO, M. E.; JIMÉNEZ, L.; MADEJÓN, E.; CABRERA, F. Modelling vinasse/ cotton waste ratio incubation for optimum composting. **Chemical Engineering Journal**, v. 93, n. 3, p. 233-240, 2003.

FELTRIN, V. P.; SANT'ANNA, E. S.; PORTO, A. C. S.; TORRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Braz. arch. biol. technol.** v. 43, n. 1, 2000.

HUDAK, A. J.; CASSIDY, D. P. Stimulating In-Soil Rhamnolipid Production in a Bioslurry Reactor by Limiting Nitrogen. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 88, n. 7, December 30, p.861-868, 2004.

JAIN, A.; MORLOK, C. K.; HENSON, J. M. Comparison of solid-state and submerged-state fermentation for the bioprocessing of switchgrass to ethanol and acetate by *Clostridium phytofermentans*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 2, p. 905- 917, 2013.

JAVAHERI, M.; JENNEMAN, G. E.; MCINERNEY, M. J.; KNAPP, R. M. Anaerobic Production of a Biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 698–700, 1985.

JIMENEZ, A. M; BORJA, R.; MARTÍN, A. A comparative kinetic evaluation of the anaerobic digestion untreated molasses and molasses previously fermented *Penicillium decumbens* in batch reactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 18, n. 2, p. 121-132, 2004.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A.J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresour. Technol.**, v. 99, p. 195–199, 2007.

KHIANNGAM S.; TECHAKRIENGKRAI T.; RAKSASIRI B.V.; KANJANAMANEESATHIAN M.; TANASUPAWAT S; Isolation and screening of endophytic bacteria for hydrolytic enzymes from plant in mangrove forest at Pranburi, PrachuapKhiri Khan, Thailand. In:**Endophytes for Plant Protection: the State of the Art**, p. 279–284ed. 11 v.2, 2013.

KIM, B.S.; HOU, C. T.; Production of lipase by high cell density fed-batch culture of *Cnadida cylindracea*. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 29, p. 59-64, 2006.

KIM, S.K.; LIM, E. J.; LEE, S. O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and Characterization of Biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnonology Applied and Biochemistry**, v. 31, p.249-253, 2000.

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

LEVISAUSKAS, D.; GAUBASKAS, V.; ZUNDA, G; Model-based optimization of biosurfactante production in fed-batch culture *Azotobacter vinelandii*. **Biotechnology letters**, v.26, p.1141-1146, 2004.

MAKKAR, R.S. e CAMEOTRA, S.S. An update on the use of uncoventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, ed. 58, p. 428–434, 2002.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 74, p. 887–889, 1997.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Utilization of molasses for biosurfactant production by two *Bacillus* strains at thermophilic conditions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, n. 7, p. 887-889, 1997.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 1, p. 1–19, 2011.

MAO, X.; JIANG, R.; XIAO, W. e YU, J. Use of surfactants for the remediation of contaminated soils: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 285, p. 419–435, 2015.

MARCHANT R.; BANAT I. M. Microbial biosurfactants: challenges and opportunities for future exploitation. **Trends Biotechnol.** v. 11, p. 558–565, 2012.

MELAÇO MELADO RAPADURA. **Resolução - CNNPA nº 12, de 1978**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12_78_melaco.htm> Acesso em: 14 de maio de 2017.

MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. Biosurfactants: production, properties, applications; **Kosaric**, n. 1, ed. 1, cap.13; Marcel Decker: New York, 1993.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Braz. J. Microbiol.**, v. 35, n. 1-2, p. 81-85, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química nova**, v. 25, n. 5, p. 772-776, 2002.

OLIVEIRA, J.G.; GARCIA-CRUZ, C.H. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. **Braz. arch. biol. technol.**, Curitiba , v. 56, n. 1, p. 155-160, 2013 .

PARASKEVOPOULOU, A.; ATHANASIADIS, I.; KANELAKI, M.; BEKATOROU, A.; BLEKAS, G.; KIOSSEOGLOU, V. Functional properties of single cell protein produced by Kefir microflora. **Food Research International, Barking**, v. 36, n. 5, p. 431-438, 2003.

RODRIGUES, L.R.; BANAT, I.M.; TEIXEIRA, J.A.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: Potential applications in medicine. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 57, n. 4 p. 609–618, 2006.

ROSENBERG E.Z.; RON E.Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v. 52 p. 154-162, 1999.

SAMPAIO, R. M. Estudo da produção de bioemulsificante de *Saccharomyces lipolytica* por fermentação em óleo-diesel comercial. 1995. Dissertação (Mestrado) - **Pós Graduação em Engenharia de Alimentos**, Universidade Estadual de Campinas. Campinas.

SANTOS, D. K. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A.; Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. **International Journal of Molecular Sciences**, n. 3, 2016.

SCHMIDELL, W., LIMA, U. A., AQUARONE, E., & BORZAMI, W. Agitação e aeração em biorreatores. **Biotecnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**, 2001.

SCHMITT, T.M. **Analysis of surfactants**. ed. 2 New York: Marcel Dekker, 2001.

SHEPHERD, R.; ROCKEY, J.; SHUTHERLAND, I.W.; ROLLER, S. Novel bioemulsifiers from microorganisms for use in foods. **J. Biotechnol.**, v. 40, p. 207–217, 1995.

SOBRINHO, H. B. S. Utilização de resíduos industriais como substratos de baixo custo para a produção de biosurfactante por *Candida sphaerica*. Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais – **Universidade Católica de Pernambuco**, 2007.

SOUSA, M.; DANTAS, I. T.; FEITOSA, F. X.; ALENCAR, A. E. V.; SOARES, S. A.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B.; SANT'ANA, H. B. Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 on the formation of oil / biosurfactant / water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems. **Braz. J. Chem. Eng.**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 613-623, 2014 .

SUWANSUKHO, P.; RUKACHISIRIKUL, V.; KAWAI, F; H-KITTIKUN, A.; Production and applications of biosurfactant from *Bacillus subtilis* MUV4. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, ed.30, pg. 87-93, 2008.

VAN HAMME, J.D.; SINGH A.; WARD, O.P. Physiological aspects Part1 in a series of papers devoted to surfactants in a microbiology and biotechnology. **Biotechnol Adv**, v. 26, p. 604-620, 2006.

VANZIN, C. Estudo da biossíntese de Poli-3-Hidroxi-butirato-co-Hidroxi-alcanoatos de Cadeia Média (P3HB-co-3HAMcl) a partir de ácidos graxos livres e óleo vegetal. 2008. Tese de Doutorado. **Instituto Butantan**.

VATER, J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. **Prog. Coll. Polymer Sci.**, v. 72, p. 12-18, 1986.

VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants-types, sources and applications. **Res. J. Microbiol.**, v. 10, p. 181–192, 2015.

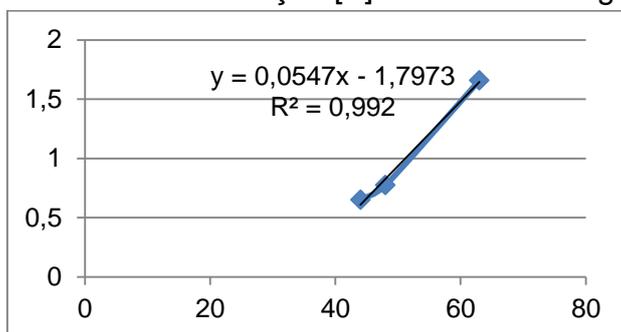
VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma Properties and Application in Cell Culture of Surfactin, a Lipopeptide Antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 63, n. 1, p. 44–49, 1997.

WALISZEWSKI, K. N.; ROMERO, A.; PARDIO, V.T. Use of cane condensed molasses in feeding broilers. **Animal Feed Science Technology**, v. 67, p. 253-258, 1997.

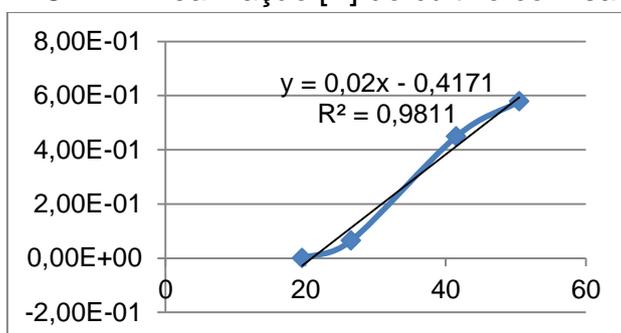
ZUBER, P.M.; M. NAKANO, M. A.; MARAHIEL, M.A. Peptide antibiotics of bacilli and other gram-positive bacteria, J. *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria: biochemistry, physiology, and molecular genetics. American Society for Microbiology, ed. **Hoch, and R. Losick**, p. 897–916, 1993.

APÊNDICES

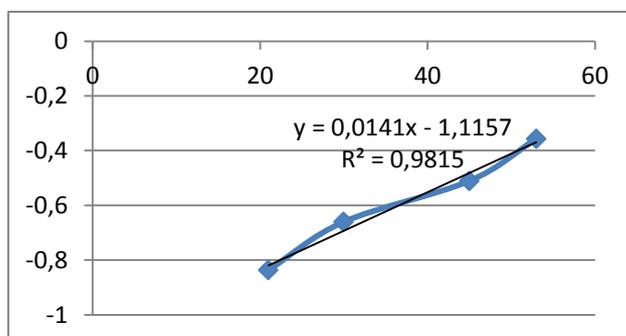
APÊNDICE A Linearização [X] do cultivo com glicose.



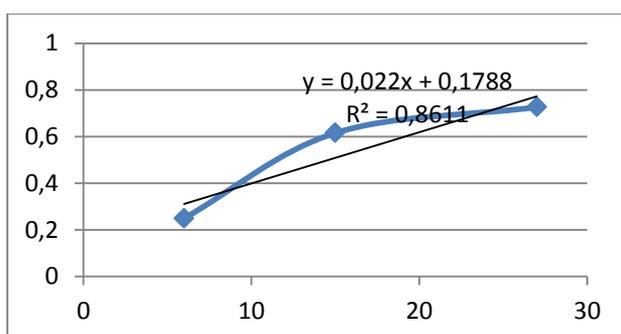
APÊNDICE B Linearização [X] do cultivo com sacarose.



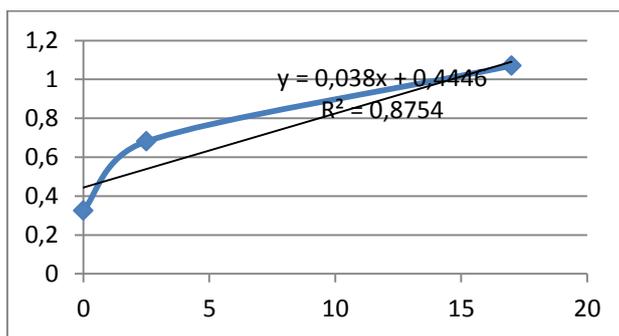
APÊNDICE C Linearização [X] do cultivo com melaço 5% e 0% de extrato de levedura.



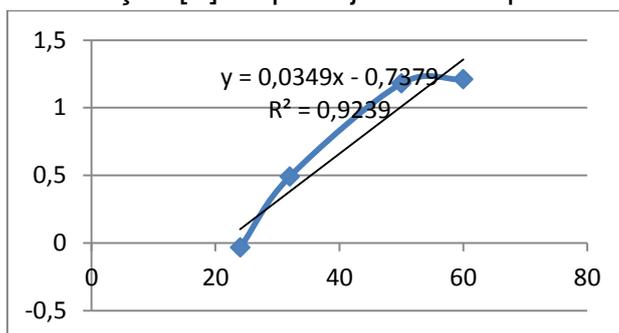
APÊNDICE D Linearização [X] do cultivo com melaço 5% e 0,5% de extrato de levedura.



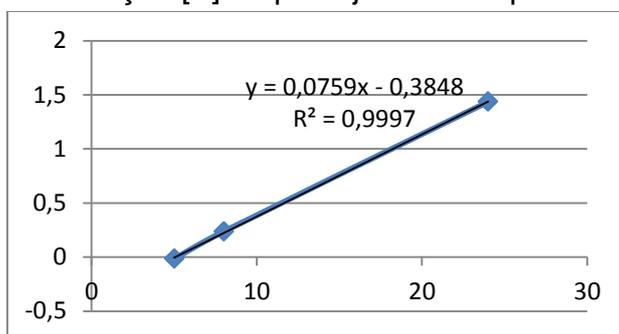
APÊNDICE E Linearização [X] do cultivo com melão 5% e 1% de extrato de levedura.



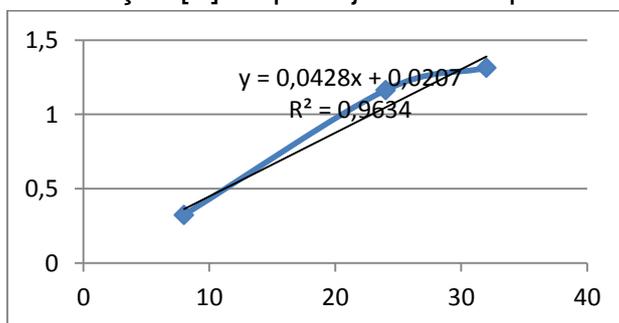
APÊNDICE F Linearização [X] do planejamento experimental – condição 1.

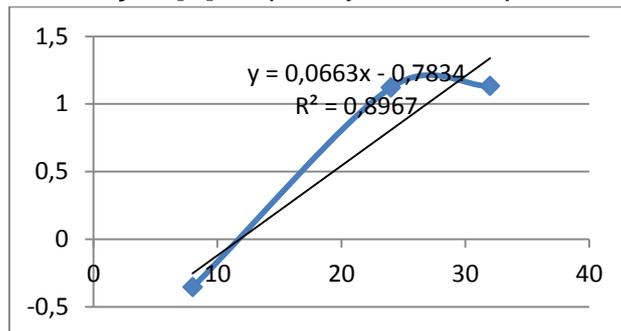
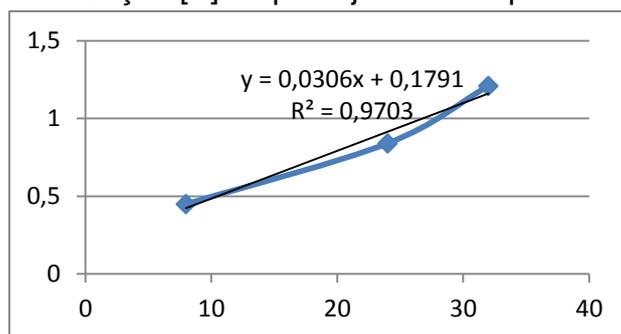


APÊNDICE G Linearização [X] do planejamento experimental – condição 2.



APÊNDICE H Linearização [X] do planejamento experimental – condição 3.



APÊNDICE I Linearização [X] do planejamento experimental – condição 4.**APÊNDICE J** Linearização [X] do planejamento experimental – condição 5.**APÊNDICE K** Linearização [X] do planejamento experimental – condição 6.