

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
GILBERTO ALVES DE LIMA JUNIOR

OBTENÇÃO DE SURFACTINA PELO MICRO-ORGANISMO
***Bacillus subtilis* ATCC 6633**

CURITIBA
2012

GILBERTO ALVES DE LIMA JUNIOR

OBTENÇÃO DE SURFACTINA PELO MICRO-ORGANISMO

***Bacillus subtilis* ATCC 6633**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientação: Profa. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim e Dra. Debora Brand

CURITIBA

2012

AGRADECIMENTOS

À Professora Dr.^a Tania Maria Bordin Bonfim pela orientação, paciência, amizade, inspiração, oportunidade e confiança. Obrigado por me enriquecer em minha formação profissional e pessoal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná pelo suporte para realização desse trabalho.

Aos demais professores que me forneceram suporte técnico, de equipamento e apoio.

A cada amigo, cada colega de laboratório e as pessoas que passaram por minha vida por terem me auxiliado ora tecnicamente, ora emocionalmente.

A meus pais por sempre me apoiarem e confiarem em mim.

"A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos. "

Charles Chaplin

*"O professor medíocre conta;
o bom professor explica;
o professor superior demonstra;
o grande professor inspira."*

William Arthur Ward

RESUMO

Os surfactantes são compostos utilizados mundialmente no setor cosmético, farmacêutico, alimentício, petrolífero e produtos de higiene e de limpeza. A produção de surfactantes ultrapassa três milhões de toneladas por ano, sendo que 70% a 75% dos surfactantes utilizados são derivados do petróleo. Contudo, com a preocupação com o meio ambiente e legislações cada vez mais rigorosas, há a necessidade do desenvolvimento de alternativas. Uma solução é a utilização de surfactantes de origem biológica. Estes podem ser obtidos por meio de cultivos empregando resíduos industriais, como o melaço de soja, que, por exemplo, no Brasil a produção do seu grão atingiu 75 milhões de toneladas em 2011. A surfactina, biosurfactante escolhido neste estudo possui vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, como: maior atividade superficial e interfacial que os demais surfactantes, maior estabilidade (temperatura, pH e força iônica), biodegradabilidade e baixa toxicidade. O presente trabalho visa a produção da surfactina por meio do *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em diferentes meios de cultura. O micro-organismo foi cultivado em meio mineral, meio mineral modificado, meio de cultivo contendo melaço de soja e meio formulado de acordo com a composição centesimal do micro-organismo e produto. O meio de cultivo contendo melaço de soja foi avaliado com diferentes concentrações de açúcares totais, 2%, 4% e 6%. Todos os cultivos foram realizados na temperatura de 30 °C, pH inicial $6,8 \pm 0,2$ e com agitação de 150 rpm. A concentração da surfactina foi determinada por meio da cromatografia a líquido de alta eficiência e a concentração celular por método gravimétrico. Dentre os resultados encontrados, as concentrações de surfactina foram de $135 \pm 4,92 \text{ mg.L}^{-1}$ e $131 \pm 1,87 \text{ mg.L}^{-1}$, nos cultivos em meio mineral e mineral modificado, respectivamente, no tempo de 36 h. No meio formulado, a produção de surfactina atingiu a concentração de $66 \pm 1,07 \text{ mg.L}^{-1}$ em 96 h. O meio contendo melaço de soja com 2% açúcares totais apresentou o melhor rendimento, $136 \pm 9,28 \text{ mg.L}^{-1}$ de surfactina e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{P/S}$) de 8,53 no tempo de 36 h.

Palavras-chave: *Bacillus subtilis*, surfactina, composição centesimal, melaço de soja.

ABSTRACT

Surfactants are compounds used worldwide in the cosmetic, pharmaceutical, food, oil, toiletries and cleaning industries. The production of surfactants is more than three million tons per year, being 70% to 75% petroleum derivatives. However, with the environmental concerns and the increasingly stringent legislation, there is a necessity to develop alternatives. One possible solution is to use surfactants from biological origin. These can be obtained by cultivation employing industrial wastes as soy molasses, whose production of soybean reached 75 million tons in Brazil in 2011. The surfactin is the biosurfactant chosen in this study. It has advantages over the synthetic surfactants, like: higher surface and interfacial activity than the others surfactants, better stability (temperature, pH and ionic strength), good biodegradability and low toxicity. The objective of this work is to produce surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 in different culture media. The micro-organism was grown on mineral medium, mineral modified medium, culture medium containing soy molasses and medium formulated based on the centesimal composition of the micro-organism and product. The culture medium containing soy molasses was evaluated with different concentrations of total sugar, 2%, 4% and 6%. All cultivations were performed at 30 °C, initial pH 6.8 ± 0.2 and with agitation of 150 rpm. The surfactin concentration was evaluated by high-performance liquid chromatography and the cell concentration was determined by gravimetric method. Concentrations of surfactin were $135 \pm 4.92 \text{ mg.L}^{-1}$ and $131 \pm 1.87 \text{ mg.L}^{-1}$ when cultivations were carried on in mineral medium and mineral modified medium, respectively, at 36 h. In the medium formulated, the surfactin concentration reached $66 \pm 1.07 \text{ mg.L}^{-1}$ after 96 h. The medium containing soy molasses with 2% of total sugar presented the best yield, $136 \pm 9.28 \text{ mg.L}^{-1}$ of surfactin and the substrate product yield ($Y_{P/S}$) of 8.53 after 36 h.

Key-words: *Bacillus subtilis*, surfactin, centesimal composition and soy molasses.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Biossurfactantes produzidos por micro-organismos.	9
FIGURA 2 - Lipopeptídeos produzidos por micro-organismos.	10
FIGURA 3 - Primeira estrutura elucidada do lipopeptídio da família das surfactinas.	11
FIGURA 4 - Curva de calibração e equação da reta para a quantificação de surfactina	25
FIGURA 5 - Cromatograma do padrão de surfactina (vermelho) e do cultivo em meio mineral concentrado em 15 vezes em 60 horas (preto).	26
FIGURA 6 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio mineral.....	28
FIGURA 7 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio mineral modificado.	29
FIGURA 8 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio formulado.	33
FIGURA 9 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio formulado em processo descontínuo alimentado.	35
FIGURA 10 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (2% de açúcares totais).	38
FIGURA 11 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (4% de açúcares totais).	39
FIGURA 12 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (6% de açúcares totais).	40
FIGURA 13 - Variação de concentração de surfactina em função do tempo de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (2%, 4% e 6% de açúcares totais).	41

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Principais classes de biossurfactantes e produtores.	8
QUADRO 2 - Funções e aplicações de biossurfactantes.	13

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 96 horas de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio mineral.	28
TABELA 2 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 96 horas de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio mineral modificado.	30
TABELA 3 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 120 horas de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio formulado.	33
TABELA 4 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 120 horas de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio formulado em processo descontínuo alimentado.	36
TABELA 5 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 72 horas de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (2% de açúcares totais).	38
TABELA 6 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 72 horas de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (4% de açúcares totais).	39
TABELA 7 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 72 horas de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (6% de açúcares totais).	41

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	4
2 OBJETIVOS	6
2.1 OBJETIVO GERAL	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
3 REVISÃO DA LITERATURA	7
3.1 BIOSSURFACTANTES E SURFACTINA	7
3.2 APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES E SURFACTINA	12
3.3 MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE SURFACTINA	13
3.4 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA SURFACTINA	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 MICRO-ORGANISMO	17
4.2 REAGENTES	17
4.3 MEIOS DE CULTIVO	17
4.4 CONSERVAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO	19
4.5 PREPARO DA SUSPENSÃO DO MICRO-ORGANISMO	19
4.6 CULTIVO EM FRASCOS	20
4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS	20
4.7.1 Análise do pH	20
4.7.2 Análise de açúcares totais	21
4.7.3 Análise da concentração celular	21
4.7.4 Extração e quantificação da surfactina	21
4.8 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS	22
4.8.1 Produtividade em biomassa	22
4.8.2 Produtividade em produto	23
4.8.3 Fator de conversão de substrato em biomassa	23
4.8.4 Fator de conversão de substrato em produto	24
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5.1 DOSEAMENTO DE SURFACTINA	25
5.2 CULTIVO DE <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 EM MEIO MINERAL E MINERAL MODIFICADO	26
5.3 CULTIVO DE <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 EM MEIO FORMULADO	32
5.3.1 Cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 em meio formulado em processo descontínuo alimentado	34
5.4 CULTIVOS DE <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 EM MEIO FORMULADO COM MELAÇO DE SOJA	37
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são substâncias utilizadas mundialmente com ampla aplicação industrial. A produção de surfactantes ultrapassa três milhões de toneladas por ano, sendo que os setores que mais aplicam essas substâncias são os de petróleo, de cosméticos, farmacêuticos, de produtos de higiene e de limpeza (BARROS *et al.*, 2007).

Nos países industrializados, 70 a 75% dos surfactantes utilizados são derivados do petróleo, o que indica a predominância de surfactante sintético. Contudo, com a preocupação com o meio ambiente e legislações cada vez mais rigorosas há a necessidade do desenvolvimento de alternativas para obtenção de biossurfactantes (NITSCHKE; PASTORE, 2002). Com esse compromisso de encontrar um substituto dos surfactantes sintéticos, os de origem natural são cada vez mais estudados, pois além de não fornecer riscos à natureza, devido à biodegradabilidade, oferecem outras vantagens (BARROS *et al.*, 2007).

Os biossurfactantes são moléculas produzidas a partir de micro-organismos. Podem ser produzidos extracelularmente ou intracelularmente durante um processo fermentativo. Sendo de origem biológica, os biossurfactantes possuem propriedades únicas as quais se diferenciam dos surfactantes de origem química. Sua baixa toxicidade, biodegradabilidade e atividade biológica são vantajosas quando comparadas à utilização de compostos sintéticos (WEI *et al.*, 2003; MULLIGAN, 2009). Esse foi o motivo que impulsionou as aplicações desse tipo de substância, como exemplo, na limpeza e recuperação de petróleo, emulsificante e dispersante, e como agente umectante (HOLMBERG, 2001; PALANISAMY, 2008; LIAO, Z. *et al.*, 2010).

O biossurfactante surfactina é produzido por micro-organismos do gênero *Bacillus* sp. (LIU, J.; ZOU; MU, 2010). Este possui a mesma aplicabilidade que os demais surfactantes, e relatam-se ainda outras aplicações como: na biorremediação de solos e água contaminada por derivados do petróleo (WHANG *et al.*, 2008, 2009) e metais pesados (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001), aplicação em nanotecnologia (LIAO, H.-T., 2008; REDDY *et al.*, 2009), apresenta atividade antiviral e antibiótica (VOLLENBROICH *et al.*, 1997a, 1997b; HWANG *et al.*, 2007), atividade hemolítica (DUFOUR *et al.*, 2005), atividade antitumoral (CAO *et al.*, 2010) e imunossupressor (PARK; KIM, 2009).

Devido à produção dos biossurfactantes ser dispendiosa, há necessidade de viabilizar a sua obtenção, visando a busca de micro-organismos produtores, a utilização de resíduos em potencial e a otimização das condições de cultivo (MAKKAR, RANDHIR S.; CAMEOTRA; BANAT, 2011). O Brasil é um dos maiores produtores de soja do planeta, além de ser uma das matérias-primas mais abundantes do país (IBGE, 2012). Proveniente da soja, o melaço de soja é uma matéria-prima de baixo custo, uma alternativa para viabilidade do processo (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008). Portanto, o melaço de soja pode ser um resíduo em potencial para produção de surfactante, oferecendo inúmeras vantagens de ser utilizado, devido ao seu custo, abundância, potencial para produção de biossurfactantes e contribuição com o meio ambiente.

Desta forma, processos biotecnológicos utilizando o micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foram conduzidos em meios descritos na literatura, meio com resíduo de soja (melaço) em diferentes concentrações de açúcares totais e meio formulado com base na composição centesimal do produto e do micro-organismo a fim de se obter a surfactina.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção de surfactina a partir do micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a formação de biomassa e surfactina em meios descritos na literatura empregando o micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633;

- Avaliar a formação de biomassa e surfactina em meio formulado com base na composição centesimal do produto e do micro-organismo empregando o micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em cultivos descontínuo e descontínuo alimentado;

- Avaliar a formação de biomassa e surfactina em meios contendo o resíduo industrial melaço de soja em diferentes concentrações de açúcares totais empregando o micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633;

- Determinar os fatores de conversão de substrato em biomassa e substrato em surfactina;

- Determinar os valores em produtividade de surfactina e produtividade em biomassa.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 BIOSSURFACTANTES E SURFACTINA

A característica fundamental dos surfactantes é a formação de micelas em solução, devidos às características anfífilas da molécula. Isso permite a formação de micelas em solução pelo surfactante o que gera as propriedades de solubilização e detergência (YING, 2006). Em 2007, estima-se que foram produzidos 10 milhões de toneladas de surfactantes, sendo que a maioria de origem do petróleo e quimicamente sintetizados (MAKKAR, RANDHIR S.; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

Biossurfactantes enquadram-se no termo surfactante os quais possuem propriedades tensoativas e origem biológica. São moléculas com características anfífilas, possuindo em sua estrutura domínios hidrofóbios e hidrofílicos que permitem suas propriedades físico-químicas e de aplicação (BANAT, I. M.; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000).

As principais vantagens dos biossurfactantes – surfactantes naturais – obtidos utilizando micro-organismos são: maior atividade superficial e interfacial que os demais surfactantes, maior estabilidade (temperatura, pH e força iônica), biodegradabilidade e baixa toxicidade. Ademais, são substâncias que podem ser produzidas a partir de substratos renováveis, não dependem do custo do petróleo no mercado como os surfactantes sintéticos e é possível a mudança na estrutura dessas substâncias de acordo com a necessidade específica por meio de manipulação genética, biológicas e químicas dos organismos produtores (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Por meio de sua característica anfífila, as porções hidrofóbica e hidrofílica da estrutura do surfactante promovem redução da tensão superficial e formação de micelas no sistema pela diminuição da energia livre e substituição das moléculas de alta energia da interface (MULLIGAN, 2009). Estas facilitam a entrada de substâncias insolúveis em água por difusão celular para o interior da célula devido à sua estrutura química possuir caráter hidrofílico e hidrofóbico (WEI *et al.*, 2003). Devido a esta alteração físico-química, se fornece as propriedades de detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade umectante, solubilização e dispersão de fases, o que justifica o amplo uso dos surfactantes pelas indústrias (SEYDLOVÁ; ČABALA; SVOBODOVÁ; BANAT, IBRAHIM M., 2000).

Essas moléculas anfífilas são classificadas de acordo com a composição química e a origem microbiana, apresentam estrutura complexa constituída por uma variedade de compostos químicos incluindo peptídeos, glicolípídeos, ácidos graxos, fosfolípídios e antibióticos (AL-ARAJ *et al.*, 2007). O Quadro 1 mostra as principais classes de surfactantes com seus respectivos micro-organismos produtores.

Classe de biossurfactante	Micro-organismo
Glicolípídios - ramnolípídios - sorofosfolípídios - trehalolípídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apícola</i> <i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas - Peptídio-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, lípidios neutros e fosfolípídios - Ácidos graxos - Lípidios neutros - Fosfolípídios	<i>Corynebacterium lepus</i> <i>Nocardia erythropolis</i> <i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos - emulsan - biodispersan - liposan - carboidrato-lípido-proteína - manana-lípido-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

QUADRO 1 - Principais classes de biossurfactantes e produtores.

FONTE: Nitschke; Pastore (2002).

Os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com a massa molecular. Sendo assim, são divididos em dois grupos: biossurfactantes de baixa massa molecular, como exemplo os glicolípídios, lipopeptídios, ácidos corinomicólicos e fosfolípídios, e biossurfactantes de alta massa molecular como emulsan, liposan, polissacarídeos e proteínas complexas (LEE, S. *et al.*, 2008). Na Figura 1 estão representados alguns exemplos de biossurfactantes.

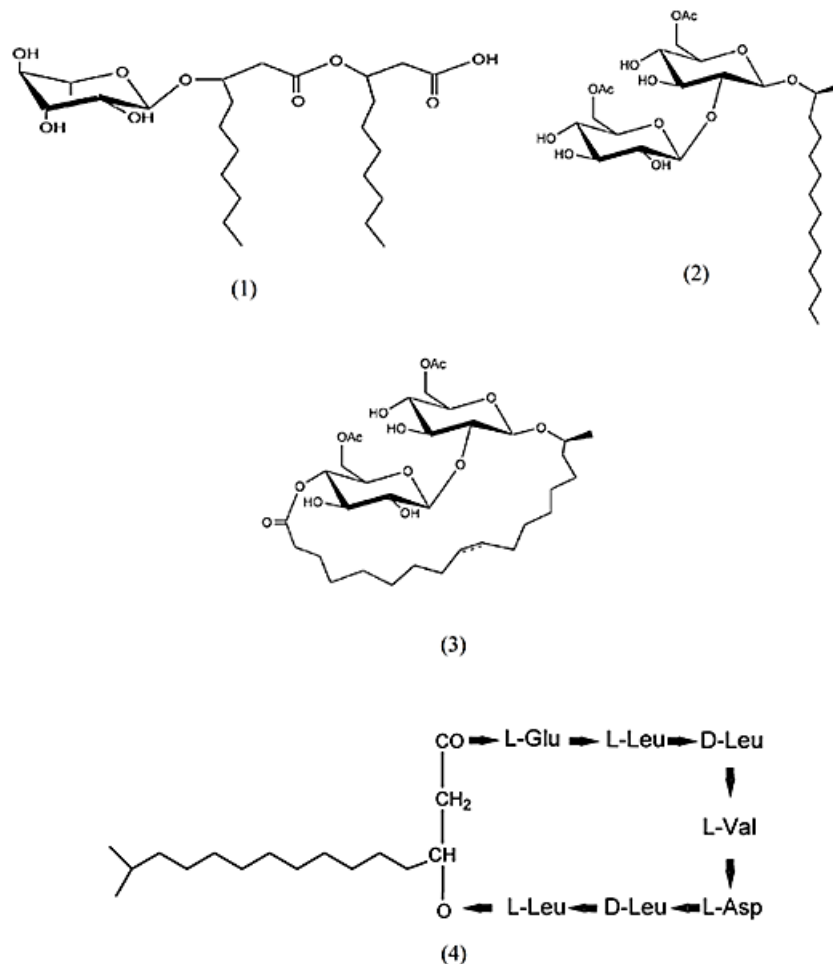


FIGURA 1 - Biossurfactantes produzidos por micro-organismos.

Nota: monoramfólípido (1) e diramunólípido (2) sintetizados por *Pseudomonas aeruginosa*, sofrólípido lactônico (3) clássico sintetizado por *Candida bombicola* e surfactina (4) sintetizado por *Bacillus subtilis*. ADAPTADO: Lang (2002).

Os lipopeptídeos são substâncias de baixo peso molecular e são classificados em quatro diferentes famílias: inturinas, fengicinas, curstaquinas e surfactinas. Os lipopeptídeos são estruturas químicas anfífilas que possuem duas regiões, um anel de aminoácidos o qual se liga por uma ligação lactônica a uma cadeia graxa. Devido a essa estrutura, as famílias são diferenciadas pelo número e arranjo dos carbonos da cadeia graxa, e pelo número e tipos de aminoácidos que formam o anel de peptídeo (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011). A Figura 2 apresenta exemplos de lipopeptídeos.

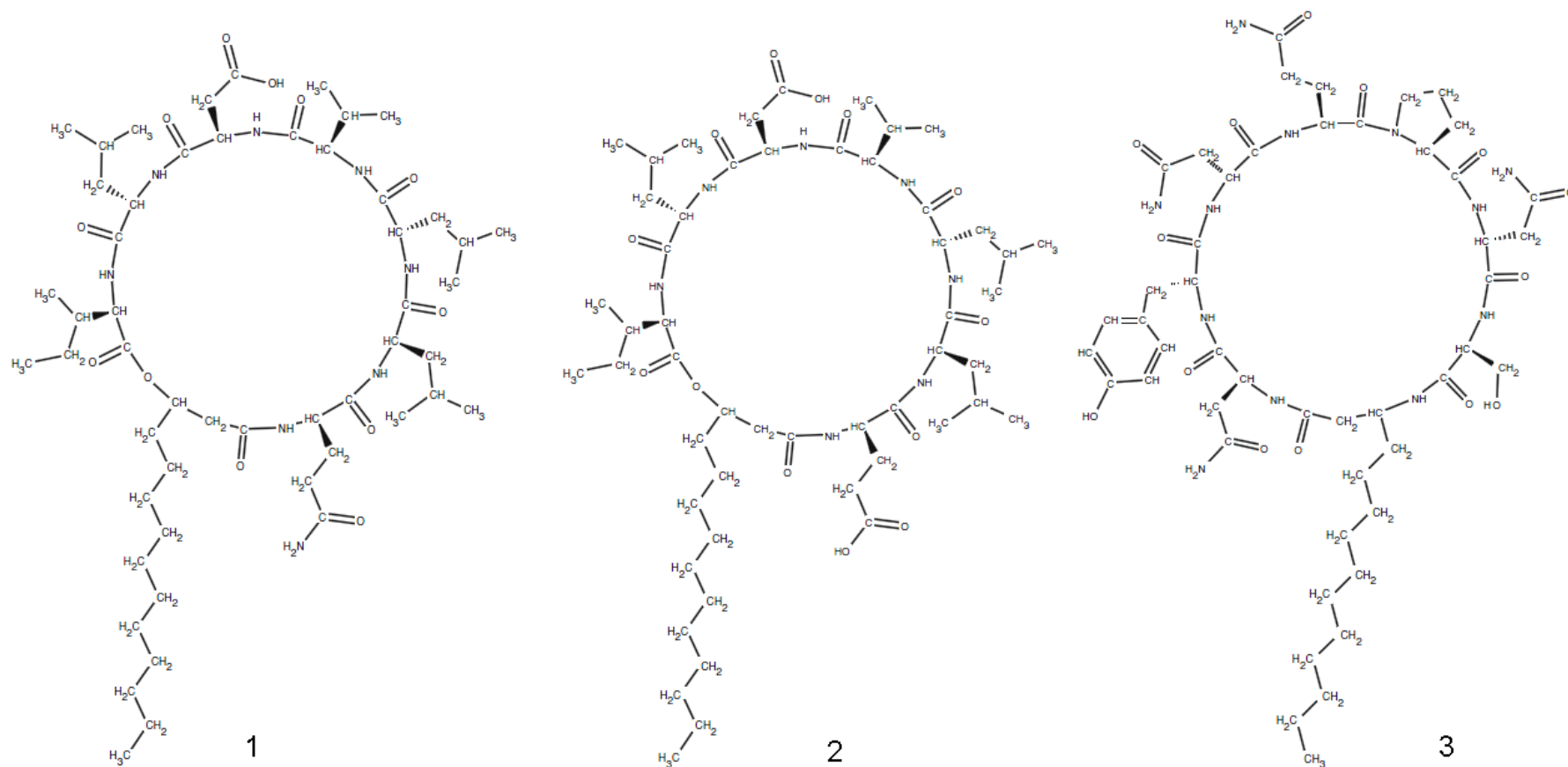


FIGURA 2 - Lipopeptídeos produzidos por micro-organismos.

Nota: Lichenisina *n*-C14 (**1**) e surfactina *n*-C14 (**2**) da família das surfactinas e inturina *n*-C14 (**3**) da família das inturinas.

ADAPTADO: Soberón-Chávez (2011).

A surfactina é um biossurfactante produzido principalmente por micro-organismos do gênero *Bacillus*. O *Bacillus subtilis* foi a primeira espécie mencionada e sendo a mais estudada para produção. Kakinuma *et al.*, (1969), elucidaram a primeira estrutura da família das surfactinas a partir do sobrenadante da cultura desse micro-organismo conforme demonstrado na Figura 3 (KAKINUMA; *et al.*, 1969).

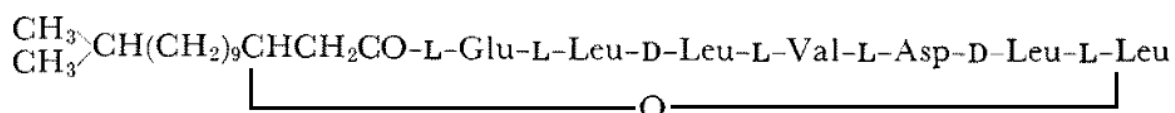


FIGURA 3 - Primeira estrutura elucidada do lipopeptídio da família das surfactinas.
 FONTE: Kakinuma, Hori, Sugino, Yoshida *et al.* (1969).

Na literatura encontram-se relatos de outros micro-organismos produtores da família das surfactinas, como *Bacillus pumilus* produtor de pumilacidina (MORIKAWA; HIRATA; IMANAKA, 2000), *Bacillus amyloliquefaciens* produtor de surfactina (KOUUMOUSTSI *et al.*, 2004), *Bacillus licheniformis* produtor da lichenisina (YAKIMOV *et al.*, 1995) e *Klebsiela* sp. Y6-1 produtor de surfactina (LEE, S. *et al.*, 2008).

A estrutura química das surfactinas é definida por um lipopeptídio, constituída de um ácido graxo unido por uma ligação lactônica a um heptapeptídio cíclico. Esta substância é encontrada como um complexo de isoformas variável, apresentando uma estrutura comum com extensão de cadeia do ácido graxo de 12 a 17 carbonos, anel heptapeptídico com sequência quiral (LLDLLDL) de diferentes aminoácidos, sendo na posição 3 e 6 do anel apresentar sempre o D-leucina e na posição 4 L-ácido aspártico (KAKINUMA; HORI; ISONO; *et al.*, 1969; KAKINUMA; HORI; SUGINO; ISONO; *et al.*, 1969; KAKINUMA; HORI; SUGINO; YOSHIDA; *et al.*, 1969; BOETTCHER *et al.*, 2010; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011).

Toda essa variação de estrutura mostra a diversidade de lipopeptídeos da família das surfactinas. Estima-se que são em torno de 20 lipopeptídeos já elucidados, classificados em: bamylocina A; esperina, lichesina, pumilacidina e surfactina, diferenciando entre si pelos aminoácidos e a cadeia graxa (SOBERÓN-CHÁVEZ, 2011).

3.2 APLICAÇÃO DOS BIOSSURFACTANTES E SURFACTINA

Devido à estrutura singular dos biossurfactantes, há potencial de aplicação em diversas áreas. O solo e águas contaminados são uma grande preocupação para a saúde da população e o meio ambiente, resultando no aumento da pesquisa e desenvolvimento na área de biorremediação. Os biossurfactantes apresentam a capacidade de emulsionar derivados de petróleo os quais apresentam potencial de contaminação. Por exemplo, o diesel, que por meio da diminuição da concentração micelar crítica produzida por ramnolipídios e surfactina promovem redução da tensão superficial, favorecendo a biodegradabilidade daquele em sistemas de águas contaminadas (WHANG *et al.*, 2008, 2009).

Os metais pesados presentes no ambiente é outra preocupação. O zinco, cádmio, cobre, mercúrio e chumbo são considerados importantes poluentes para o meio ambiente (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1992). A remoção de metais pesados ocorre pela sorção do biossurfactante na superfície do solo e a complexação do metal, deslocando o metal para a solução que contém o surfactante, ocorrendo assim a associação do metal com as micelas formadas. No caso da surfactina, os metais associados a fases orgânicas podem ser removidos por soluções básicas com surfactina (MULLIGAN; YONG; GIBBS, 2001).

Os agroquímicos, prejudiciais ao meio ambiente e aos seres humanos, são utilizados nos solos contra doenças causadas por fungos fitopatogênicos, conhecidas como antracnoses. No ambiente, os micro-organismos fixadores de nitrogênio e os insetos favoráveis ao solo não sobrevivem a esses agroquímicos. Além disso, provocam resistência dos patógenos, fixam no alimento e acumulam no corpo humano como resíduos indesejáveis. Os biossurfactantes são ativos em uma variedade de fitopatógenos, como bactérias e fungos, promovendo antagonismo de crescimento destes, indutor de resistência do vegetal contra o patógeno e agente benéfico para o crescimento de micro-organismos fixadores de nitrogênio (ONGENA; JACQUES, 2008; KIM *et al.*, 2009).

Além das aplicações ambientais, a surfactina possui emprego na área biológica e terapêutica. Os biossurfactantes são empregados como anticoagulantes, antibióticos, terapia do câncer e terapia gênica. Por exemplo, o glicolípido manosileritrol lipídio A é uma molécula estudada na terapia gênica, pois apresenta um potencial na transferência de genes por meio de formação de lipossomas

catiônicos, mostrando que é um vetor promissor na terapia gênica (IGARASHI; HATTORI; MAITANI, 2006; UENO *et al.*, 2007). A surfactina possui atividade antifúngica e antibacteriana moderadas; relata-se também atividade contra micoplasmas (SINGH; CAMEOTRA, 2004). Em humanos, é anticoagulante por mecanismo de inibição da fibrina, logo da formação do coágulo (KIKUCHI; HASUMI, 2002; SINGH; CAMEOTRA, 2004). Além disso, induz a formação de canais de íons na bicamada lipídica de membranas celulares, inibe o AMPc e a fosfolipase A2 e demonstra atividade antiviral e antitumoral (SINGH; CAMEOTRA, 2004; CAO *et al.*, 2010; CAO *et al.*, 2011; LEE, J. H. *et al.*, 2012). A surfactina também é relatada como agente anti-inflamatório por redução da síntese das interleucinas (PARK *et al.*, 2010).

A ampla utilização dos biossurfactantes na área comercial e suas funções estão resumidas no Quadro 2.

Função do biossurfactante	Campos de aplicação
Emulsionantes e dispersantes	Cosméticos, tintas, biorremediação, óleos, alimentos
Solubilizantes	Produtos farmacêuticos e de higiene
Agentes molhantes e penetrantes	Produtos farmacêuticos, têxteis e tintas
Detergentes	Produtos de limpeza, agricultura
Agentes espumantes	Produtos de higiene, cosméticos e flotação de minérios
Agentes espessantes	Tintas e alimentos
Seqüestrantes de metais	Mineração
Formadores de vesículas	Cosméticos e sistemas de liberação de drogas
Fator de crescimento microbiano	Tratamento de resíduos oleosos
Demulsificantes	Tratamento de resíduos, recuperação de petróleo
Redutores de viscosidade	Transporte em tubulações, oleodutos
Dispersantes	Misturas carvão-água, calcáreo-água
Fungicida	Controle biológico de fitopatógenos
Agente de recuperação	Recuperação terciária de petróleo

QUADRO 2 - Funções e aplicações de biossurfactantes.

ADAPTADA: Banat, Makkar Cameotra (2000) e Nitschke, Pastore (2002).

3.3 MEIOS DE CULTURA PARA PRODUÇÃO DE SURFACTINA

O primeiro meio relatado na literatura a fim de melhor produção de surfactina foi o meio mineral descrito por Cooper *et al.*, (1981). Com o decorrer das décadas outros autores, em estudos de otimização, buscaram a mudança desse meio nas fontes de carbono, nitrogênio e concentração de minerais visando a produção de surfactina (WEI; CHU, 1998; WEI; LAI; CHANG, 2007; ABDEL-MAWGOUD;

ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008; LIU, X. *et al.*, 2012). Este meio também é empregado em estudos de extração e recuperação de surfactina (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 2001; ISA *et al.*, 2007) e em estudos que visam otimizar a produção de surfactina em biorreatores (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999; YEH; WEI; CHANG, 2006).

Em estudo por Cooper *et al.*, 1981, vários nutrientes foram adicionados ao meio mineral, tais como: meio líquido nutriente, hexadecano 2% e 4%, extrato de levedura 0,1% e aminoácidos presentes na estrutura da molécula de surfactina, visando maior produção de surfactina empregando o *Bacillus subtilis* ATCC 21332. Entretanto, todos estes nutrientes não contribuíram na melhora da obtenção do biossurfactante para esse micro-organismo, prevalecendo o meio a 4% de glucose e minerais.

Posteriormente, houve estudos de otimização visando melhorar o meio mineral, tanto em mudança de fontes de carbono e nitrogênio, e, principalmente, a concentração de cada mineral presente no meio. A utilização de efluentes de batata, melaço de soja, hexadecano e diversos monossacarídeos demonstraram-se promissores na produção de surfactina (COOPER *et al.*, 1981; THOMPSON; FOX; BALA, 2000; ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008).

Quanto à fonte de nitrogênio, as inorgânicas apresentaram melhores resultados na produção de surfactina quando empregadas em concentrações de 550 mg.L⁻¹, em média, contra 250 mg.L⁻¹ de nitrogênio orgânico (MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, 2002; ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008).

Cooper *et al.* (1981) relataram que a adição de aminoácidos não promoveu maior obtenção de surfactina, entretanto outros autores demonstraram que a adição pode aumentar e induzir a produção de diferentes surfactinas (JACQUES *et al.*, 1999; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, 2002; ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008).

Em outros estudos de otimização a concentração de nitrato de amônio que gerou maior obtenção de concentração de surfactina foi de 4,0 g.L⁻¹ (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008; LIU, X. *et al.*, 2012).

Valores de açúcares totais para maior obtenção de surfactantes variam de 2% a 4% na literatura (MAKKAR, RANDHIR S.; CAMEOTRA, 2001; REIS; SÉRVULO; FRANÇA, 2004; CHEN; BAKER; DARTON, 2006).

Os minerais ferro, manganês, potássio e magnésio influenciam a produção de surfactantes (COOPER *et al.*, 1981; WEI; CHU, 1998; WEI; LAI; CHANG, 2007). O ferro, por sua vez, em concentrações de 2-4 mM multiplicou de 2 a 3 vezes a produção em concentração de surfactina em *Bacillus subtilis* ATCC 21332 (WEI; CHU, 1998). Wei *et al.*, (2007) em estudo de otimização da concentração de elementos traço em meio de cultura com objetivo de obter maior concentração de surfactante definiram a concentração ideal destes íons para *Bacillus subtilis* ATCC 21332, 2,4 mM de Mg^{2+} ; 0,01 mM de Mn^{2+} ; 0,008 mM de Fe^{2+} os quais em forma de sais estão em concentrações de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,592 g.L⁻¹; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,00222 g.L⁻¹; $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0,00169 g.L⁻¹.

Os meios mineral segundo Cooper *et al.*, 1981 e mineral modificado segundo Wei *et al.*, 2007 foram escolhidos como meios de cultivo para o *Bacillus subtilis* ATCC 6633 com intuito de comparar com os outros meios testados no presente estudo.

3.3.1 Melaço de soja

O alto custo de produção dos biossurfactantes ocorre principalmente porque a extração e a purificação do produto são dispendiosas. Por exemplo, no ano de 2012 o preço de mercado de 1000 mg de surfactina era de 15.300,00 dólares, em torno de 300 reais. Com isso, os objetivos para tornar viável a produção dos biossurfactantes são: utilizar o micro-organismo apropriado e matéria-prima ou resíduo financeiramente acessível, preferencialmente, para conversão de substrato em produto; otimização das condições de cultura e do processo de extração do biossurfactante e utilização de micro-organismos super-produtores ou recombinados para aumento do rendimento (MAKKAR, RANDHIR S.; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

O Brasil é um dos maiores produtores de soja do planeta, além de ser uma das matérias-primas mais abundantes do país, ficando apenas atrás da cana de açúcar, chegando a uma produção próxima de 75 milhões de toneladas (IBGE, 2012). A utilização de matérias-primas de baixo custo é uma alternativa a qual favorecerá a viabilidade do processo, pois o substrato pode representar de 10-30% do custo total de produção (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008).

O resíduo originado na produção de leite de soja, chamado de okara pelos japoneses, demonstrou em micro-organismos do gênero *Bacillus* ser promissor para produção tanto de surfactina quanto à iturina A em fermentação de estado sólido (O'TOOLE, 1999). Em estudos de otimização para melhor rendimento de surfactina para *Bacillus subtilis* isolados do mar HuangBo, China, as fontes de carbono que favoreceram maior rendimento foi a sacarose e glicose; sendo a sacarose em maior abundância no melaço de soja (LIU, X. *et al.*, 2012).

A utilização de fontes de carbono insolúveis pode induzir ou reprimir a produção de surfactantes, no caso pode ser observado nos meios contendo soja uma indução da produção de biossurfactantes quando comparado a meios mineral e mineral modificado (MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, 2002).

Portanto, o melaço de soja oferece inúmeras vantagens quando utilizado, devido principalmente ao seu custo, abundância e fácil acesso. Logo matéria-prima em potencial para produção de biossurfactantes, contribuindo ainda com o meio ambiente em se utilizar um resíduo industrial em processo biotecnológico.

3.4 EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA SURFACTINA

Há diversas classes de biossurfactantes originadas de diferentes micro-organismos possibilitando o desenvolvimento de diferentes técnicas de extração e purificação destes em meios de cultura, por exemplo, precipitação por solventes, ácidos ou bases; adsorção-desorção; cromatografia; centrifugação; cristalização; filtração e precipitação; fracionamento da espuma; extração por meio de solvente; ultrafiltração; liofilização (SATPUTE *et al.*, 2010). A precipitação ácida e, em seguida, extração por solvente para estudo da surfactina é um dos mais viáveis, pois essa técnica é barata e de fácil execução (COOPER *et al.*, 1981; MUKHERJEE; DAS; SEN, 2006; DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008; WANG *et al.*, 2010). Quanto à determinação de biossurfactantes, geralmente as técnicas aplicadas são a cromatografia a líquido ou cromatografia a líquido acoplada à espectrometria de massas (WEI; CHU, 1998; LIU, T. *et al.*, 2007; SATPUTE *et al.*, 2010).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 empregado nos experimentos foi adquirido da coleção *American Type Culture Collection*.

4.2 REAGENTES

Os reagentes analíticos utilizados foram das marcas Merck, Sigma Chemicals, Chimex, Difco, Carlo Erba.

4.3 MEIOS DE CULTIVO

O meio líquido nutriente (peptona 5,0 g.L⁻¹; extrato de carne 3,0 g.L⁻¹; pH 6,8 ± 0,2) adicionado de agente crioprotetor (glicerol 15% v/v) foi utilizado para manutenção do micro-organismo. O meio líquido nutriente foi empregado para o estudo de cinética de crescimento.

A fim de satisfazer os objetivos do trabalho foram empregados diferentes meios de cultivo para o micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633:

- Meio mineral: glicose 40,0 g.L⁻¹; NH₄NO₃ 4,00 g.L⁻¹; Na₂HPO₄ 5,68 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 4,08 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,197 g.L⁻¹; EDTA.Na₂ 0,00150 g.L⁻¹; FeSO₄.7H₂O 0,00111 g.L⁻¹; CaCl₂ 0,00078 g.L⁻¹ (COOPER *et al.*, 1981);

- Meio mineral modificado: glicose 40,0 g.L⁻¹; NH₄NO₃ 4,00 g.L⁻¹; Na₂HPO₄ 5,68 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 1,36 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,592 g.L⁻¹; FeSO₄.7H₂O 0,00222 g.L⁻¹; MnSO₄.H₂O 0,00169 g.L⁻¹; EDTA.Na₂ 0,00150 g.L⁻¹; CaCl₂ 0,000777 g.L⁻¹ (WEI; LAI; CHANG, 2007);

Os meios formulados nesse trabalho foram elaborados de acordo com a composição centesimal do micro-organismo e obtenção de produto (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2003).

- Meio formulado: glicose 16,28 g.L⁻¹; extrato de levedura 16,90 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 0,55 g.L⁻¹; K₂HPO₄ 0,55 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 0,25 g.L⁻¹; CaSO₄.2H₂O 0,24 g.L⁻¹; NaCl 0,13 g.L⁻¹; FeSO₄.7H₂O 0,054 g.L⁻¹;
- Meio formulado com melão de soja 2% (corresponde a 20 g.L⁻¹ de açúcares totais): 71 g.L⁻¹ de melão de soja; FeSO₄.7H₂O 0,5 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 8,8 g.L⁻¹; NaCl 0,8 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 3,45 g.L⁻¹; Na₂HPO₄ 0,5 g.L⁻¹; ureia 10,4 g.L⁻¹;
- Meio formulado com melão de soja 4% (corresponde a 40 g.L⁻¹ de açúcares totais): 142 g.L⁻¹ de melão de soja; FeSO₄.7H₂O 0,5 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 8,8 g.L⁻¹; NaCl 0,8 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 3,45 g.L⁻¹; Na₂HPO₄ 0,5 g.L⁻¹; ureia 10,4 g.L⁻¹;
- Meio formulado com melão de soja 6% (corresponde a 60 g.L⁻¹ de açúcares totais): 213 g.L⁻¹ de melão de soja; FeSO₄.7H₂O 0,5 g.L⁻¹; KH₂PO₄ 8,8 g.L⁻¹; NaCl 0,8 g.L⁻¹; MgSO₄.7H₂O 3,45 g.L⁻¹; Na₂HPO₄ 0,5 g.L⁻¹; ureia 10,4 g.L⁻¹;

Todos os meios de cultivos foram corrigidos para pH 6,8 ± 0,2 com soluções de hidróxido de sódio a 2 mol.L⁻¹ ou solução de ácido sulfúrico a 2 mol.L⁻¹ a temperatura ambiente.

A esterilização foi realizada por calor úmido e sob pressão a 121 °C e 1 atm em autoclave vertical Phoenix. O tempo de esterilização variou de acordo com o volume de meio de cultivo, sendo 40 minutos e 30 minutos necessários para esterilização de volumes de até 1,0 e 0,5 litros, respectivamente (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2003). Os meios mineral e mineral modificado foram preparados separando os micronutrientes e macronutrientes. A glicose e nitrato de amônio foram esterilizados separadamente, assim com os fosfatos. Os demais minerais foram esterilizados juntos. Para os meios de cultivo formulado e com melão de soja, a fonte de carbono, nitrogênio e minerais foram esterilizadas separadamente.

Os meios utilizados para alimentação durante os cultivos foram preparados com concentrações de fontes de carbono, nitrogênio e minerais equivalente a dez vezes do meio utilizado para produção de surfactina.

4.4 CONSERVAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO

O micro-organismo liofilizado obtido da coleção *American Type Culture Collection* foi ativado utilizando meio líquido nutriente com pH $6,80 \pm 0,2$, a temperatura $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ e agitação 150 rpm durante 12 horas. Este foi cultivado em três etapas de 12 h com mesmas condições de temperatura e agitação a fim de aumentar a concentração celular. A primeira etapa foi em Erlenmeyer de 50 mL de capacidade contendo 10 mL de meio líquido nutriente. Posteriormente, as células recém-crescidas foram transferidas para um Erlenmeyer de 125 mL de capacidade contendo 25 mL de meio líquido nutriente. Depois de 12 h, foi realizada a terceira etapa, os 25 mL de cultura foram transferidos para um Erlenmeyer de 1 L de capacidade contendo 175 mL de meio líquido nutriente. Após 12 h, 1 mL do cultivo foi transferido para tubos de polipropileno e centrifugado a 5000 g por 3 minutos, e depois descartado o sobrenadante. Isso foi realizado até atingir densidade ótica 1,40 em 650 nm (Shimadzu, modelo UV1601PC) a fim de obter a maior quantidade de células por tubo de polipropileno. Para finalizar, para cada tubo polipropileno foi adicionado meio líquido nutriente com agente crioprotetor. Em seguida, os tubos contendo as células foram conservados por congelamento em freezer a temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$. Repiques anuais foram realizados.

4.5 PREPARO DA SUSPENSÃO DO MICRO-ORGANISMO

Nos cultivos em frascos, a partir das células congeladas, o micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 foi reativado de acordo com o item 4.4 e em três etapas foi cultivado a fim de obter uma concentração de 10^6 células. A primeira etapa foi realizada a partir de um tubo de polipropileno cultivado em 10 mL de meio nutriente em frasco Erlenmeyer de 50 mL. Após 12 h, a segunda etapa para o aumento da concentração celular foi a partir de 10 mL de cultivo recém-crescidos em 25 mL de meio nutriente em frasco Erlenmeyer de 125 mL. A terceira etapa foi realizada com 15 mL de células e em 145 mL de meio líquido nutriente em frasco Erlenmeyer de 1 L.

As condições de agitação e temperatura foram, respectivamente, 150 rpm e $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ em agitador-incubador TECNAL TE-421 durante o período de 12 horas, no fim

de cada etapa. Ao fim da última etapa, foram inoculadas as células em frascos contendo o meio mineral (COOPER *et al.*, 1981), mineral modificado (LIU, T. *et al.*, 2007) e os meios formulados baseados na composição centesimal do micro-organismo e produção de surfactina.

4.6 CULTIVO EM FRASCOS

Os meios de cultivos testados para verificar a formação de surfactina foram o meio mineral (COOPER *et al.*, 1981), meio mineral modificado (LIU, T. *et al.*, 2007), meio formulado com melaço de soja e o meio formulado. Foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 100 mL de meio de cultivo, respeitando a proporção 1:5 de volume de meio para volume de frasco.

Cada frasco contendo meio foi inoculado com 10 mL de uma suspensão de 10^6 células do *Bacillus subtilis* recém-crescidas em meio líquido nutriente. Em seguida, os frascos foram colocados em agitador-incubador TECNAL TE-421 a 30 °C, 150 rpm. A cada 12 horas foram retiradas amostras dos cultivos em meio mineral e mineral modificado, e a cada 12 ou 24 horas, dos meios formulados. Cada frasco de amostra forneceu dados de pH, concentração de biomassa, concentração de açúcares e de surfactina.

4.7 MÉTODOS ANALÍTICOS

Cada amostra de cultivo foi centrifugada a 5000 g em centrífuga da marca Janetzki T23 durante 20 minutos. O sobrenadante foi utilizado para determinação da concentração de açúcares totais e surfactina, e nas células precipitadas, a concentração de biomassa.

4.7.1 Análise do pH

Para todas as amostras coletadas, o pH foi mensurado a temperatura ambiente em potenciômetro WTW, modelo 300i.

4.7.2 Análise de açúcares totais

A determinação de açúcares totais foi realizada pela técnica do fenol sulfúrico em aparelho Shimadzu, modelo UV1601PC (DUBOIS *et al.*, 1956).

4.7.3 Análise da concentração celular

A análise da concentração celular foi realizada pelo método gravimétrico. Foram centrifugados 10 mL cultivo a 5000 *g* por 20 minutos. O *pellet* formado foi lavado até a remoção completa do meio de cultura e foi submetido à liofilização até massa constante em liofilizador de bancada marca Lodan. A biomassa seca foi pesada em balança analítica Bioprecisa modelo FA2104N. A determinação da concentração celular foi calculada segundo a equação (HISS, 2001).

$$X_t = X.V^{-1} \quad (1)$$

Onde: X_t = concentração de biomassa seca (g.L^{-1}) no tempo t de cultivo, X = biomassa seca (g) e V = volume de amostra (L).

4.7.4 Extração e quantificação da surfactina

A extração da surfactina foi realizada a partir do sobrenadante o qual foi submetido à precipitação com ácido clorídrico a $6,0 \text{ mol.L}^{-1}$, reduzindo até pH 2. Este acidificado foi mantido a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ por 12 horas ou até observação de ausência de turbidez. O acidificado foi centrifugado a 10000 *g* por 20 minutos para a formação de um *pellet* de biosurfactante bruto. Este foi dissolvido em água com pH 7,5 e foi liofilizado. Posteriormente, houve a solubilização em metanol absoluto e filtração a $0,22 \text{ } \mu\text{m}$ (DAS; MUKHERJEE; SEN, 2008).

A quantificação foi realizada por meio da cromatografia a líquido de alta eficiência em cromatógrafo da marca Varian® Pro Star, bomba ternária Prostar 210 acoplada em coluna de fase reversa da marca Kromasil® 100 C-18 de dimensões $4,6 \text{ mm} \times 2,0 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}$ com partículas de $5 \text{ } \mu\text{m}$ e software Workstation Star 6.0.

O volume de injeção foi de 20 μL de amostra e a corrida ocorreu com eluição isocrática, com fase móvel 80% acetonitrila, 20% água e 0,1% ácido trifluoracético (v/v/v) e com fluxo $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, A detecção foi realizada a 212 nm em detector UV-Vis DAD da marca Varian Pro Star (WEI; CHU, 1998; LIU, T. *et al.*, 2007).

4.8 EXPRESSÃO DOS RESULTADOS

A comparação quantitativa entre as diferentes condições de cultivo foi possível por intermédio de variáveis como as velocidades de transformação e os fatores de conversão. Uma definição especial de velocidade é a produtividade em biomassa ou a concentração do produto, denominada produtividade de surfactina, cujo interesse prático está na avaliação do desempenho de um processo. Os fatores de conversão relacionam em um determinado tempo de cultivo os correspondentes valores de biomassa, substrato e produto entre si (HISS, 2001). Os parâmetros cinéticos de produtividade em biomassa e surfactina e os fatores de conversão de substrato em biomassa e em surfactina foram calculados para os cultivos em frascos.

4.8.1 Produtividade em biomassa

A produtividade em biomassa representa a velocidade média de crescimento referente ao tempo de cultivo, e pode ser calculada pela equação 2 (HISS, 2001).

$$P_X = (X_t - X_0) \cdot t_f^{-1} \quad (2)$$

Onde: P_X = produtividade em biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), X_t = concentração de biomassa seca ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) no tempo t de cultivo, X_0 = concentração de biomassa seca ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) no início do cultivo e t_f = tempo de cultivo (h).

4.8.2 Produtividade em produto

A produtividade em produto representa a velocidade média de formação de surfactina em relação ao tempo de cultivo, e pode ser calculada pela equação 3 (HISS, 2001).

$$P_p = (P_t - P_0) \cdot t_f^{-1} \quad (3)$$

Onde: P_p = produtividade em produto ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$), P_t = concentração volumétrica de surfactina (mg.L^{-1}) no tempo t de cultivo, P_0 = concentração volumétrica de surfactina (mg.L^{-1}) no início do cultivo e t_f = tempo de cultivo (h).

4.8.3 Fator de conversão de substrato em biomassa

O fator de conversão de substrato em biomassa possibilita a avaliação do cultivo a partir da biomassa formada em relação à quantidade de açúcares totais consumida pelo micro-organismo, segundo equação 4 (HISS, 2001).

$$Y_{X/S} = (X_t - X_0) \cdot (S_0 - S)^{-1} \quad (4)$$

Onde: $Y_{X/S}$ = fator de conversão de substrato em biomassa (grama de biomassa seca obtida por grama de açúcar total consumido), X_t = concentração de biomassa seca (g.L^{-1}) no tempo t de cultivo, X_0 = concentração de biomassa seca (g.L^{-1}) no início do cultivo S_0 = concentração do substrato (g.L^{-1}) no início do cultivo e S = concentração do substrato (g.L^{-1}) no tempo t de cultivo.

4.8.4 Fator de conversão de substrato em produto

O fator de conversão de substrato em produto possibilita a avaliação do cultivo a partir da quantidade de surfactina formada em relação à quantidade de açúcares totais utilizado pelo micro-organismo, segundo equação (5) (HISS, 2001).

$$Y_{P/S} = (P_t - P_0) \cdot (S_0 - S)^{-1} \quad (5)$$

Onde: $Y_{P/S}$ = fator de conversão de substrato em surfactina (miligrama de surfactina obtida por grama de açúcar total consumido), P_t = concentração de surfactina (mg.L^{-1}) no tempo t de cultivo, P_0 = concentração de surfactin (mg.L^{-1}) no início do cultivo, S_0 = concentração do substrato (g.L^{-1}) no início do cultivo e S = concentração do substrato (g.L^{-1}) no tempo t de cultivo. A concentração do produto no início do cultivo (P_0) é geralmente desprezível.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os cultivos foram realizados em frascos, em duplicata, e como experimentos independentes. O desvio padrão (OriginPro 8.0.63.988 SR6 v8.0988) foi calculado para cada parâmetro: concentração de surfactina, formação de biomassa, açúcares totais e pH. A produtividade (P_x e P_p) e fatores de conversão ($Y_{x/s}$ e $Y_{p/s}$) foram calculados com software Microsoft Office Professional Plus 2010, versão 14.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de avaliar a formação de surfactina foram realizados cultivos em frascos de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 nos meios mineral (COOPER, 1985) e mineral modificado (WEI; LAI; CHANG, 2007), meio com melaço de soja e meio formulado, sendo este último, com e sem alimentação de substrato. Em cada cultivo, foi retirado o micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 da conservação e este foi reativado conforme as etapas descritas no item 4.5. Nos referidos cultivos, foram determinados: concentração de surfactina, de células secas e de açúcares totais, e valores de pH em função do tempo.

5.1 DOSEAMENTO DE SURFACTINA

A concentração de surfactina foi determinada por meio da cromatografia a líquido. A curva de calibração encontra-se na Figura 4, esta foi realizada a partir da soma das áreas dos 5 picos cromatográficos ($R^2 = 0,9975$) obtidos a partir de diferentes concentrações dos padrões, o padrão e uma das amostras encontram-se na Figura 5.

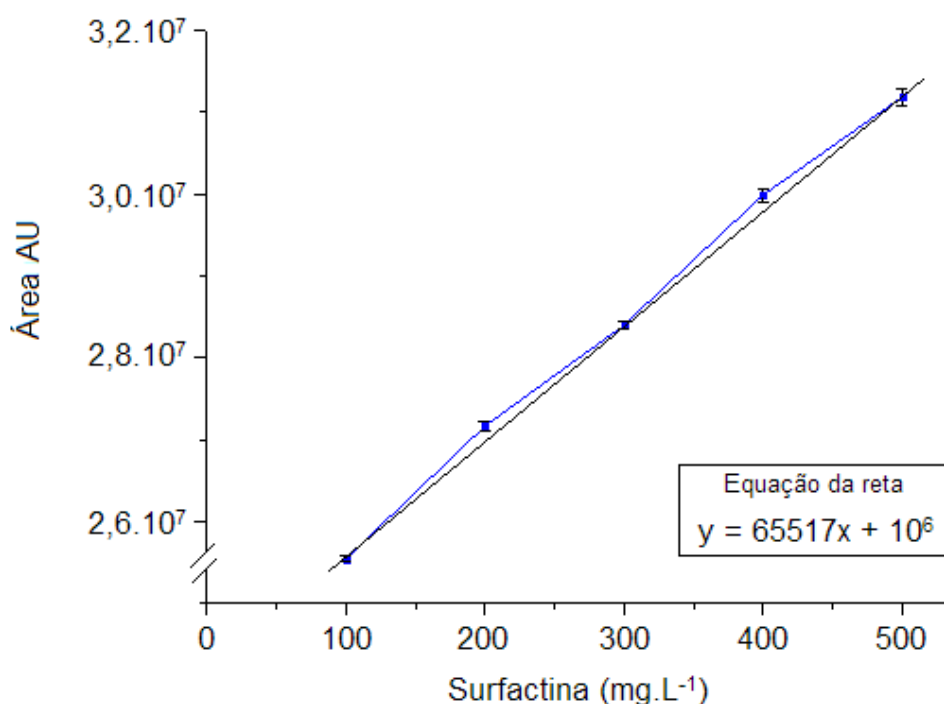


FIGURA 4 - Curva de calibração e equação da reta para a quantificação de surfactina .
FONTE: O autor (2012).

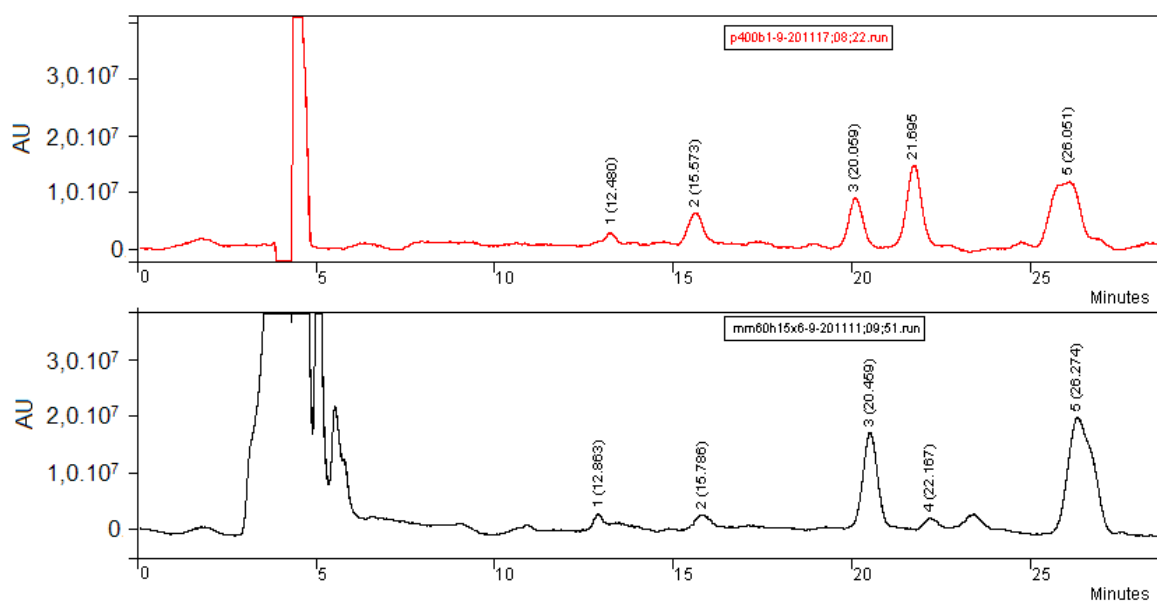


FIGURA 5 - Cromatograma do padrão de surfactina (vermelho) e do cultivo em meio mineral concentrado em 15 vezes em 60 horas (preto).
 FONTE: O autor (2012).

5.2 CULTIVO DE *Bacillus subtilis* ATCC 6633 EM MEIO MINERAL E MINERAL MODIFICADO

O meio mineral foi desenvolvido e melhorado por Cooper *et al.*, 1981, a fim de obter melhor produção de surfactina por *Bacillus subtilis*. Os autores buscaram avaliar substratos e concentrações de íons no meio de cultura para a otimização da produção de surfactina. Não houve incremento com a adição de aminoácidos no meio de cultura nem com adição do hexadecano 2% e 4% o qual deveria melhorar o rendimento; pelo contrário, inibiu a biossíntese de surfactina e promoveu o crescimento de biomassa. Sendo assim, o melhor resultado demonstrado foi o meio com 4% glicose e sais minerais, como descrito no item 4.3 de Material e Métodos (COOPER *et al.*, 1981; ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008).

No presente estudo o cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio mineral no tempo de 12 horas, foi priorizada a formação de biomassa a qual foi demonstrada pelo maior fator de conversão de substrato em biomassa ($Y_{x/s}$), 0,44 quando comparado com os outros tempos, Tabela 1. A produção de surfactina foi de $0,77 \pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ em 12 horas, conforme demonstrado na Figura 4.

Entre os tempos de 24 horas e 36 horas, conforme observado na Figura 6, a produção surfactina acompanhou o crescimento exponencial do micro-organismo, comportando-se como metabólito primário, fato encontrado em estudo de otimização em cultivos de *Bacillus subtilis* BS5 em meio mineral (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAGA; HASSOUNA, 2008), e também em estudo sobre a síntese de surfactina (KRAAS *et al.*, 2010). No entanto, em estudo em biorreator de Davis *et al.*, 1999, a surfactina se comportou como metabólito secundário. Em 36 horas, foi obtida a concentração máxima de surfactina de $135 \pm 4,9 \text{ mg.L}^{-1}$, resultado próximo ao estudo envolvendo recuperação de surfactina que se obteve 122 mg.L^{-1} a qual foi produzida pelo micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 21332 em cultivo com meio mineral (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 2001). Em relação à produtividade em surfactina (P_p), os tempos de 24 e 36 horas apresentaram os maiores valores, respectivamente, 4,12 e 3,75; sendo que no tempo de 36 horas obteve-se o melhor fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$), 10,28.

No tempo de 48 horas, observou-se uma queda na concentração de surfactina a qual se estabilizou em cerca de 120 mg.L^{-1} até o término do processo (96 h), isso pode ser comparado ao estudo de otimização de Liu, X. *et al.* (2012) que atingiu o máximo de 129 mg.L^{-1} no tempo de 48 h de cultivo.

No tempo de 72 horas, a máxima concentração celular foi de $5,81 \text{ g.L}^{-1}$ de células secas. Os minerais presentes no meio de cultura podem influenciar o crescimento e metabolismo microbiano. Manganês, ferro e zinco são os mais críticos no metabolismo secundário. Além disso, esses minerais traços podem influenciar o rendimento de produtos de metabólitos primários e secundários (COOPER *et al.*, 1981; WEI; CHU, 2002).

A otimização do meio de cultura é uma das ferramentas mais comuns e efetivas para promover a produção de um produto de fermentação, tal como a surfactina. A concentração de elementos traços é crítica para uma produção eficiente de biossurfactantes (WEI; LAI; CHANG, 2007).

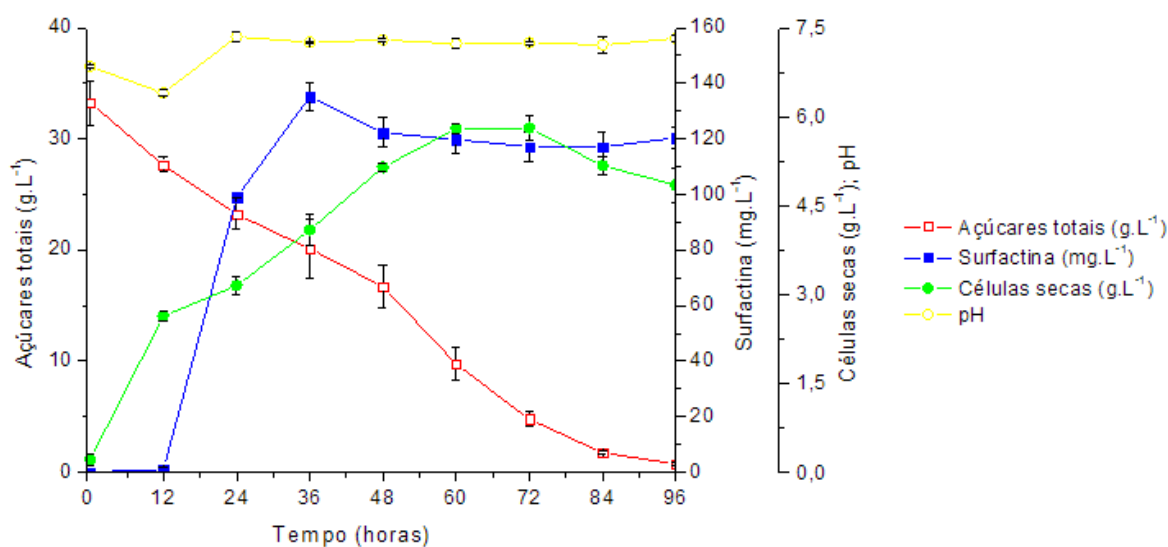


FIGURA 6 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio mineral.

FONTE: O autor (2012).

TABELA 1 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 96 horas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio mineral.

Tempo (h)	P_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	P_p (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
12	0,20	0,06	0,44	0,14
24	0,12	4,12	0,29	9,86
36	0,11	3,75	0,29	10,28
48	0,10	2,55	0,30	7,39
60	0,09	2,00	0,24	5,09
72	0,08	1,63	0,20	4,11
84	0,06	1,39	0,16	3,72
96	0,05	1,25	0,14	3,70

FONTE: O autor (2012).

NOTA: As legendas utilizadas na tabela são: P_x : produtividade em biomassa; P_p : produtividade em surfactina; $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em surfactina.

Desde a descoberta da surfactina, pesquisas são realizadas envolvendo a otimização da produção variando a concentração de minerais, como ferro, magnésio, manganês e potássio (WEI *et al.*, 2003; WEI; LAI; CHANG, 2007) e macronutrientes como fonte de carbono, como monossacarídeos, melaço e glicerol (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008) e nitrogênio - ureia, peptonas e extrato de levedura (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999). Outro foco de estudo é a otimização da recuperação e da purificação de surfactina, a qual pode ser por meio da coleta de espuma (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 2001; YEH; WEI; CHANG, 2006), precipitação ácida (WANG *et al.*, 2010), coluna de adsorção (LIU, T. *et al.*, 2007) ou por processo de ultrafiltração (ISA *et al.*, 2007) em meio mineral.

Em estudo de WEI *et al.*, 2007, foi modificada a concentração dos elementos traços (Mg^{+2} , K^+ , Mn^{+2} e Fe^{+2}) visando otimizar a produção de surfactina em meio de cultura mineral (COOPER, 1981). Os autores observaram que os íons Mg^{+2} e K^+ são fundamentais para a produção de biossurfactantes, e que para um melhor rendimento devem estar em concentrações de 2,4 mM e 10 mM, respectivamente. Foi demonstrado que os íons Fe^{+2} e Mn^{+2} aumentam a produtividade, tanto em produto quanto em biomassa, quando em concentrações de 0,008 mM e 0,01 mM (WEI; LAI; CHANG, 2007).

A Figura 7 e Tabela 2 mostram os resultados dos cultivos com o *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio mineral modificado.

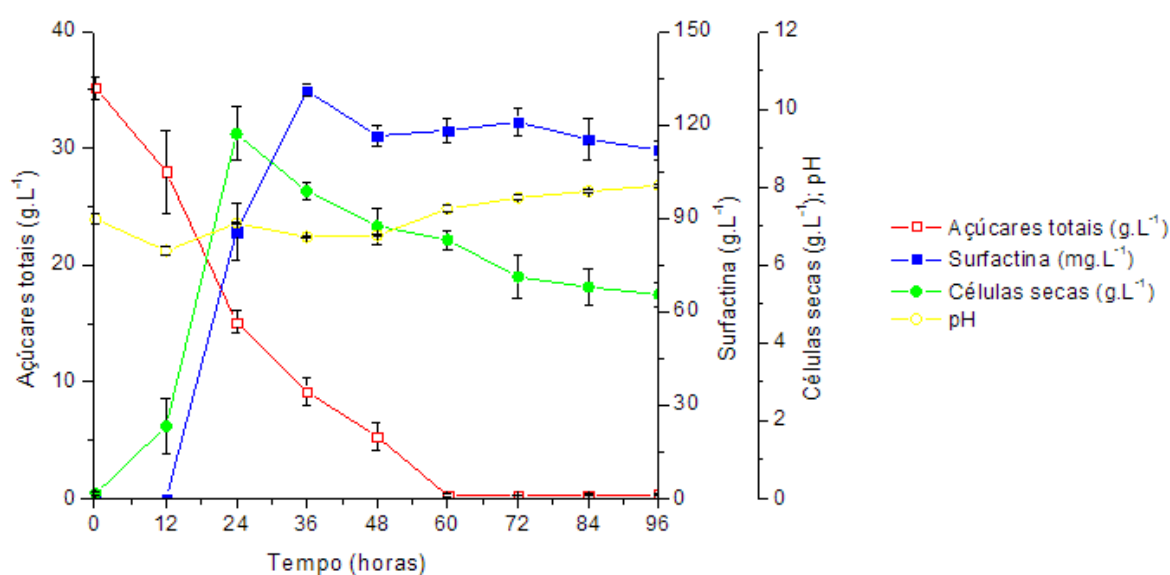


FIGURA 7 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio mineral modificado. Fonte: O autor (2012).

TABELA 2 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 96 horas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio mineral modificado.

Tempo (h)	P_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	P_p (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
12	0,14	0,00	0,24	0,00
24	0,38	3,58	0,46	4,28
36	0,22	3,64	0,30	5,04
48	0,14	2,43	0,23	3,90
60	0,11	1,97	0,19	3,39
72	0,08	1,68	0,16	3,47
84	0,06	1,37	0,15	3,31
96	0,05	1,17	0,15	3,21

FONTE: O autor (2012).

NOTA: As legendas utilizadas na tabela são: P_x : produtividade em biomassa; P_p : produtividade em surfactina; $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em surfactina.

No cultivo em meio mineral modificado, nas primeiras 12 horas, ocorreu formação exclusiva de biomassa. Posteriormente, houve o início da formação do produto o qual acompanhou o crescimento exponencial do *Bacillus subtilis*, se estendendo até o tempo de 36 horas, se comportando como metabólito primário. Neste momento observou-se a maior produção e maior fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s}$) com valores, respectivamente, $131 \pm 1,9$ mg.L⁻¹ e 5,04. Este perfil de crescimento e produção foi encontrado em cultivos de *Bacillus subtilis* BBK006, quando as células entram na fase exponencial de crescimento e a produção de surfactina se inicia, atingindo uma concentração de 24 mg.L⁻¹ após 24 horas de processo (CHEN; BAKER; DARTON, 2006).

Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Hassouna, 2008, encontraram um perfil bifásico na concentração do produto, onde ocorreu em duas etapas de produção de biosurfactante nos tempos de 72 e 120 horas em cultivo de *Bacillus subtilis* BS5 em meio mineral. Entre os tempos de 36 horas e 48 horas, a Figura 7 mostra que a concentração de surfactina sofre uma queda de $131 \pm 1,9$ mg.L⁻¹ para $116 \pm 1,2$ mg.L⁻¹, seguida de um aumento em 72 horas para $120 \pm 0,3$ mg.L⁻¹, esse perfil se assemelha ao perfil bifásico. Entretanto, a diferença no presente trabalho está na segunda etapa de produção, havendo apenas a estabilização em $111 \pm 3,1$ mg.L⁻¹, e posteriormente, queda de sua concentração. Comportamento semelhante foi encontrado no meio mineral, Figura 6, onde ocorreu o aumento de

surfactina até as 36 primeiras horas atingindo $165 \pm 3,5 \text{ mg.L}^{-1}$, seguido de queda e estabilização da concentração de surfactina em $117 \pm 5,3 \text{ mg.L}^{-1}$. O perfil de alteração de concentração da surfactina observado no presente estudo, em ambos os meios mineral e mineral modificado, é encontrado em estudo com *Bacillus subtilis* S499 onde ocorre aumento de concentração seguido de uma queda e estabilização. Este foi um estudo que objetivou otimização do meio de cultura e condições de crescimento para aumentar o rendimento de biossurfactantes (JACQUES *et al.*, 1999).

Uma das diferenças do meio mineral para o mineral modificado é a presença do íon manganês que, segundo Wei e Chu, (2002), promoveu o melhor rendimento de biossurfactante quando presente em meio de cultura em concentrações adequadas. Entretanto, a produção em meio mineral modificado para o microorganismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 não apresentou melhora nas condições de crescimento utilizadas no presente trabalho. A concentração de ferro também é outro fator para um melhor rendimento de produto (WEI; CHU, 1998; WEI *et al.*, 2003). Em comparação dos dois meios analisados, a concentração de ferro no meio mineral favoreceu maior conversão do substrato em produto obtendo-se 10,28 contra 5,04 do meio mineral modificado no tempo de 36 h. Outro motivo que pode ter acarretado a diminuição da produção de surfactina no meio mineral modificado foi o excesso de ferro. Wei *et al.*, (2003). Observaram que a presença de ferro em excesso é capaz de estimular o crescimento celular no meio mineral modificado, a custas de menor produção de surfactina.

O meio mineral e meio mineral modificado apresentaram semelhanças como o consumo de glicose. Quanto ao crescimento microbiano, meio mineral modificado favoreceu maior crescimento chegando a $9,34 \text{ g.L}^{-1}$ de concentração de células secas com fator de conversão de substrato em biomassa de 0,46; sendo que pode ter sido favorecido esse crescimento devido à presença de íon manganês e concentrações diferentes de ferro e magnésio que podem ter favorecido a produção de biomassa. Quanto à surfactina, tanto o meio mineral, $135 \pm 4,92 \text{ mg.L}^{-1}$, quanto o mineral modificado, $131 \pm 1,87 \text{ mg.L}^{-1}$, atingiram maiores valores de produção próximos. Entretanto, quando é considerado o fator de conversão substrato em produto, o meio mineral apresenta o dobro do valor do meio mineral modificado, 10,28 e 5,04, respectivamente, no tempo de 36 horas onde ocorre o pico máximo de produção de surfactante. Pode-se inferir que o meio mineral mostrou melhor

aproveitamento de glicose para produção de biossurfactante, enquanto no meio mineral modificado obteve-se um consumo mais rápido de açúcar o qual foi transformado em maior parte em biomassa e o restante em surfactina.

5.3 CULTIVO DE *Bacillus subtilis* ATCC 6633 EM MEIO FORMULADO

O meio formulado foi elaborado acordo com a composição centesimal do micro-organismo e de surfactina, como um meio sintético alternativo aos descritos na literatura para obtenção deste surfactante. Este foi elaborado de acordo com a composição centesimal de cada átomo presente no micro-organismo e surfactina (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2003). Este meio possui como diferenças dos meios minerais da literatura a presença de nitrogênio orgânico, o extrato de levedura, e a menor concentração de glicose. Esse meio apresenta concentração de 1,6% de açúcares totais que, segundo a literatura, apresenta vantagens já que meios com concentrações de açúcares totais menores ou iguais a 2% foram observados por favorecerem a produção de biossurfactantes (CHEN; BAKER; DARTON, 2006). No meio formulado o íon manganês não foi adicionado em virtude de, em estudos preliminares com o meio mineral modificado, não ter sido observado maior fator de conversão de substrato em produto quando comparado ao meio mineral. A utilização de nitrogênio orgânico, além de possuir vitaminas e minerais, visa fornecer maior variedade de aminoácidos ao meio de cultivo, o que pode contribuir com a produção do biossurfactante (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2003).

Na Figura 8 e na Tabela 3 encontram-se os resultados obtidos com o meio formulado.

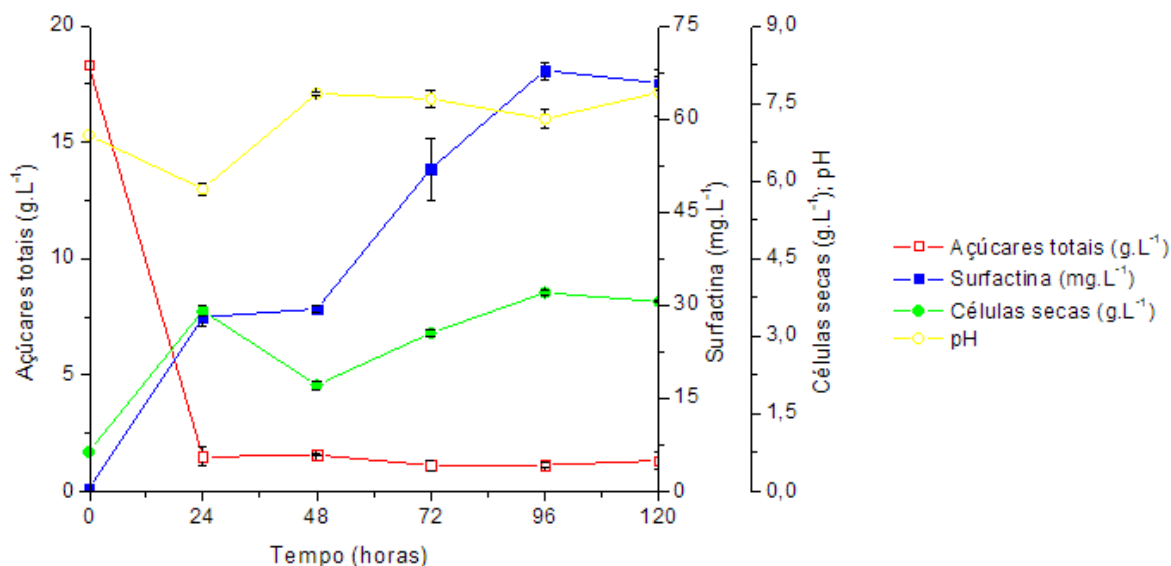


FIGURA 8 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio formulado.
FONTE: O autor (2012).

TABELA 3 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 120 horas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio formulado.

Tempo (h)	P_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	P_p (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
24	0,11	1,15	0,16	1,64
48	0,03	0,60	0,08	1,73
72	0,03	0,72	0,13	3,00
96	0,03	0,70	0,18	3,92
120	0,02	0,55	0,17	3,85

FONTE: O autor (2012).

NOTA: As legendas utilizadas na tabela são: P_x : produtividade em biomassa; P_p : produtividade em surfactina; $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em surfactina.

No meio formulado, do tempo zero até 24 horas, foi observada a formação de surfactina, chegando a uma concentração de $28 \pm 1,0$ mg.L⁻¹ a qual acompanha o crescimento exponencial do *Bacillus subtilis*. Entre o período de 24 a 48 h, houve uma queda de biomassa, de 3,49 g.L⁻¹ para 2,06 g.L⁻¹, sendo que a concentração do

biossurfactante permanece praticamente constante. Após 48 horas de cultivo, as células recomeçam a se multiplicar, e paralelamente, a concentração de surfactina tornou a aumentar atingindo o valor máximo de $Y_{P/S}$ em 96 horas, 3,92, o que mostrou novamente uma relação de crescimento microbiano e produção de produto.

Após 96 horas, o micro-organismo inicia a fase estacionária e a produção permaneceu constante com um valor de surfactina cerca de 66 mg.L^{-1} até o fim das 120 horas para o meio elaborado com concentração inicial de 1,6% de açúcares totais, valor que pode ser comparado em cultivo em frascos de *Bacillus subtilis* em meio mineral com 1% de açúcares, que foi obtido $31,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de surfactina (CHEN; BAKER; DARTON, 2006).

A concentração de surfactina no meio formulado quando comparado aos meios mineral e mineral modificado, apresentou um perfil de produção semelhante, aumento até 96 h seguido de queda, perfil também encontrado em cultivo com meio mineral como fonte de carbono o glicerol (FARIA *et al.*, 2011). Nesse meio, os valores de $Y_{p/s}$ são próximos aos meios descritos na literatura e no presente trabalho no fim das 96 h (COOPER *et al.*, 1981; LIU, T. *et al.*, 2007), entretanto não superou os maiores fatores de conversão de substrato em produto nos demais tempos de cultivo desses meios. Isso pode ter ocorrido pelo fato da fonte de nitrogênio estimular o crescimento celular em detrimento da produção de biossurfactante (REIS; SÉRVULO; FRANÇA, 2004).

5.3.1 Cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio formulado em processo descontínuo alimentado

Com objetivo de maior obtenção de produto, foi conduzido um processo descontínuo alimentado com o meio formulado (STANBURY; WHITAKER; HALL, 2003). Os resultados obtidos foram apresentados na Tabela 4 e Figura 9 na qual as flechas em destaque demonstram os tempos da alimentação (24, 48 e 72 horas) dos cultivos.

Nas primeiras 24 horas de cultivo, em meio formulado em processo descontínuo alimentado, a obtenção de produto acompanhou o crescimento em fase exponencial do micro-organismo, sendo que nesse momento atinge o maior valor de fator de conversão e produtividade em surfactina os quais, respectivamente, foram

de $1,22$ e $0,92 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Após a primeira alimentação, entre os tempos de 24 e 48 horas, notou-se um favorecimento para produção do produto, enquanto a concentração de biomassa sofre queda $3,54 \pm 0,04 \text{ g.L}^{-1}$ para $2,86 \pm 0,08 \text{ g.L}^{-1}$. Em 48 horas, após a alimentação, o crescimento microbiano se reestabeleceu e, em 72 horas, o pico de concentração de surfactina é atingido com a concentração de $40 \pm 1,0 \text{ mg.L}^{-1}$. Posteriormente a última alimentação, a concentração do produto entra em queda até 120 horas, $22 \pm 0,5 \text{ mg.L}^{-1}$; nesse período somente o crescimento foi favorecido o qual se estabiliza no tempo de 96 horas com concentração de células secas de $5,3 \text{ g.L}^{-1}$.

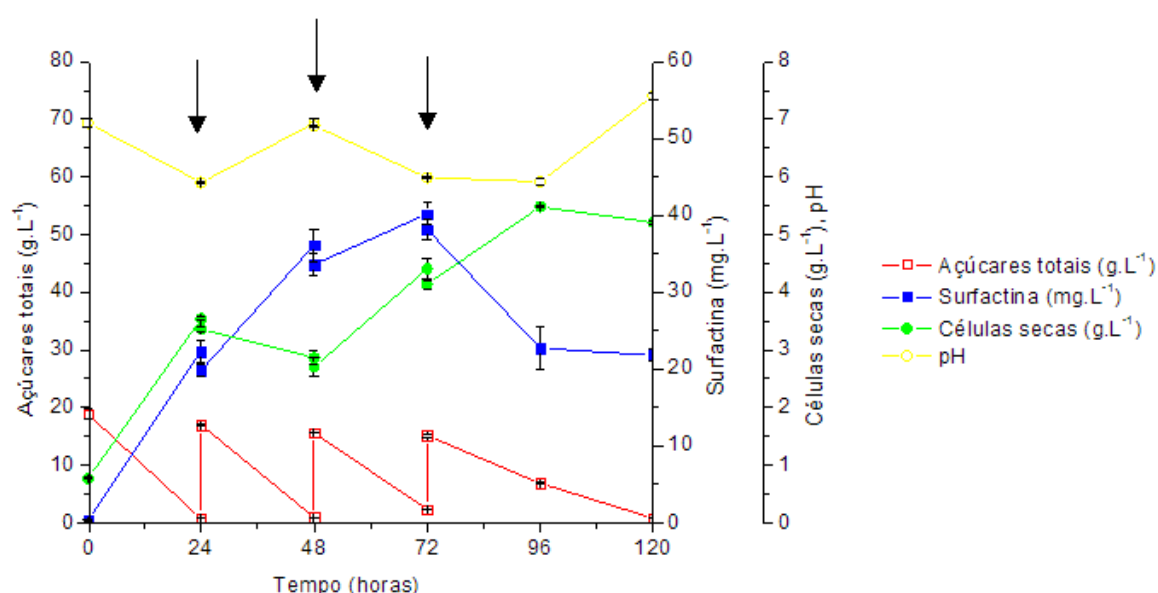


FIGURA 9 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio formulado em processo descontínuo alimentado.

FONTE: O autor (2012).

NOTA: As flechas em destaque representam momentos onde houve alimentação com o meio descrito no item 4.3.

TABELA 4 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 120 horas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio formulado em processo descontínuo alimentado.

Tempo (h)	P_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	P_p (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
24	0,11	0,92	0,15	1,22
48	0,04	0,75	-0,04	1,01
72	0,05	0,55	0,13	0,50
96	0,05	0,23	0,16	-1,86
120	0,04	0,18	-0,05	-0,15

Fonte: O autor (2012).

NOTA: As legendas utilizadas na tabela são: P_x : produtividade em biomassa; P_p : produtividade em surfactina; $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em surfactina.

O processo descontínuo alimentado no meio formulado e com as condições de crescimento utilizadas não favoreceu uma melhor produção de surfactina, pois tanto os valores de fator de conversão de substrato em produto quanto de concentração em surfactina do cultivo descontínuo, 3,85 e 66 mg.L⁻¹ em 120 h, respectivamente, foram superiores ao processo descontínuo alimentado. A alimentação manteve 1,5% de açúcares totais o que favoreceu o crescimento do *Bacillus subtilis* no meio formulado chegando a $5,48 \pm 0,02$ g.L⁻¹ de células secas no fim das 96 horas de cultivo, enquanto o processo descontínuo apresentou $3,84 \pm 0,04$ g.L⁻¹ de células secas ao fim do mesmo tempo. Nessas condições de crescimento e concentração de nutrientes, resultaram uma queda na produção de surfactina, diferente dos autores que afirmam entre 1% e 2% de açúcares totais favorece a produção de biossurfactante (REIS; SÉRVULO; FRANÇA, 2004; CHEN; BAKER; DARTON, 2006). Mas também, essa queda pode ser justificada pela ausência de nitrato o que acarretou menor formação de surfactina quando comparado aos meios minerais (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999).

5.4 CULTIVOS DE *Bacillus subtilis* ATCC 6633 EM MEIO FORMULADO COM MELAÇO DE SOJA

Em biotecnologia, buscam-se processos cada vez mais econômicos e viáveis, buscando a utilização de matérias-primas de baixo custo, como melaço, efluentes de processos, água de batata ou de lavagem de milho e hidrolisados. Em estudos de otimização, o melaço foi resíduo de escolha que se apresentou promissor para produção de surfactina (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008), além de possuir a vantagem de ser um resíduo de baixo custo originado de uma matéria-prima abundante no país, que em 2011 atingiu a produção próxima de 75 milhões de toneladas (IBGE, 2012). O melaço também apresenta em maior porcentagem a sacarose, que segundo estudo envolvendo substratos como fonte de carbono para produção de surfactina, foi umas das fontes de carbono que apresentou o melhor rendimento de biossurfactante (LIU, X. *et al.*, 2012).

No presente estudo utilizando o melaço de soja como fonte de carbono, foram utilizadas diferentes concentrações de açúcares totais: 2, 4 e 6% com finalidade de avaliar produtividade e concentração de surfactina nos cultivos com micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Os resultados obtidos foram descritos nas Figuras 10, 11 e 12 e Tabelas 5, 6 e 7.

Nos cultivos com soja preparados a fim de fornecer 2% açúcares totais, a produção de biossurfactante inicia-se na fase logarítmica do crescimento microbiano se estendendo até o tempo de 36 horas, momento onde ocorreu a máxima concentração de surfactina $136 \pm 9,28 \text{ mg.L}^{-1}$. Neste mesmo tempo, foram observados os maiores valores de produtividade em produto ($P_p = 3,79$) e fator de conversão de substrato em produto ($Y_{p/s} = 8,53$), Figura 10 e Tabela 5. Após 36 horas de processo, a biomassa continuou em fase logarítmica até 48 horas, quando entra em decadência. Em paralelo, a concentração de surfactina sofreu queda até o fim do processo alcançando um valor de $44 \pm 3,59 \text{ mg.L}^{-1}$.

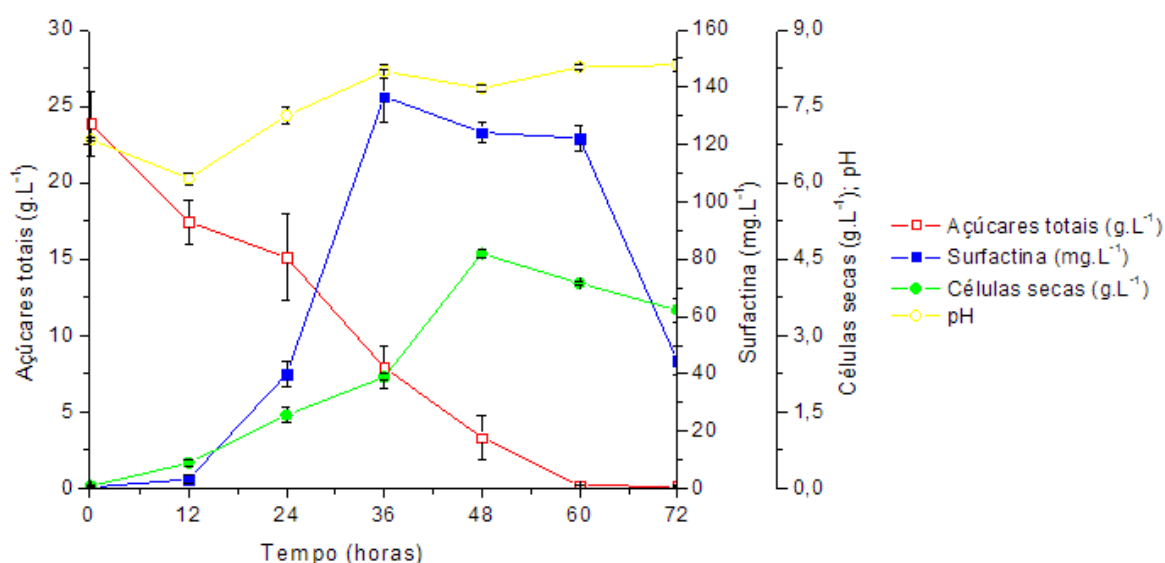


FIGURA 10 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (2% de açúcares totais).
 FONTE: O autor (2012).

TABELA 5 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 72 horas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (2% de açúcares totais).

Tempo (h)	P_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	P_p (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
12	0,04	0,23	0,07	0,42
24	0,06	1,64	0,16	4,50
36	0,06	3,79	0,13	8,53
48	0,10	2,58	0,22	6,02
60	0,07	2,03	0,17	5,13
72	0,05	0,61	0,15	1,86

FONTE: O autor (2012).

NOTA: As legendas utilizadas na tabela são: P_x : produtividade em biomassa; P_p : produtividade em surfactina; $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em surfactina.

Conforme demonstrado na Tabela 6 e Figura 11, no meio contendo 4% de açúcares totais, a produção de surfactina se iniciou nas primeiras horas do processo atingindo, em 12 horas, $22 \pm 2,64$ mg.L⁻¹ de produto. Nesse momento, foram observados os maiores valores de produtividade, 1,83 e de fator de conversão de substrato em produto 6,67.

A produção de surfactina acompanhou o crescimento do micro-organismo. Nos tempos de 24 e 36 horas, mostraram-se valores próximos de $Y_{p/s}$ comparando-

se às 12 horas, 5,56 e 5,44, respectivamente. No tempo de 60 horas, atingiu a concentração máxima de surfactina com o valor de $86 \pm 3,69 \text{ mg.L}^{-1}$ a qual, posteriormente, sofreu queda até o fim do processo.

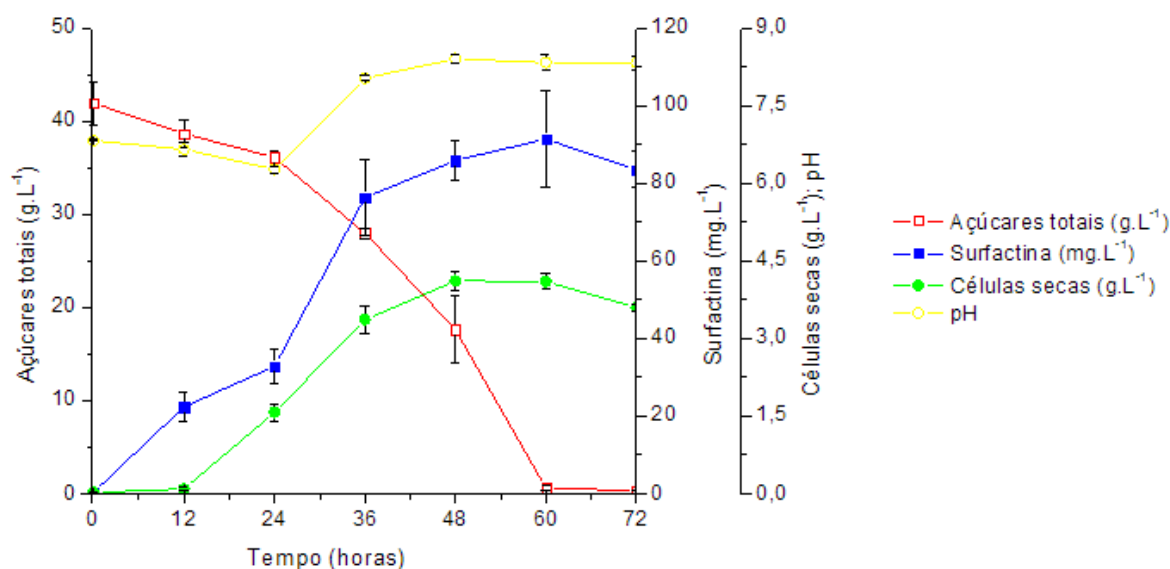


FIGURA 11 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (4% de açúcares totais).
 FONTE: O autor (2012).

TABELA 6 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 72 horas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (4% de açúcares totais).

Tempo (h)	P_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	P_p (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
12	0,01	1,83	0,02	6,67
24	0,06	1,35	0,27	5,56
36	0,09	2,11	0,24	5,44
48	0,09	1,78	0,17	3,51
60	0,07	1,52	0,10	2,20
72	0,05	1,15	0,09	2,00

FONTE: O autor (2012).

NOTA: As legendas utilizadas na tabela são: P_x : produtividade em biomassa; P_p : produtividade em surfactina; $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em surfactina.

A Figura 12 e a Tabela 7 apresentaram os resultados dos cultivos com meio formulado com soja (6% de açúcares totais). O aparecimento de surfactina iniciou no tempo de 12 horas acompanhando a fase logarítmica de crescimento até 48 horas.

No período de 36 a 48 h ocorreu a maior produção de produto, demonstrada pelos valores de produtividade em surfactina ($\text{mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) e fator de conversão, os quais foram, respectivamente, 2,02 em 48 h e 6,23 em 36 h. Após o tempo de 60 horas, a surfactina sofreu queda ($99 \pm 5,82 \text{ mg.L}^{-1}$ para $43 \pm 1,06 \text{ mg.L}^{-1}$) e, paralelamente, observou-se uma menor concentração de células secas, concluindo que após esse período as células entraram em fase de declínio metabólico.

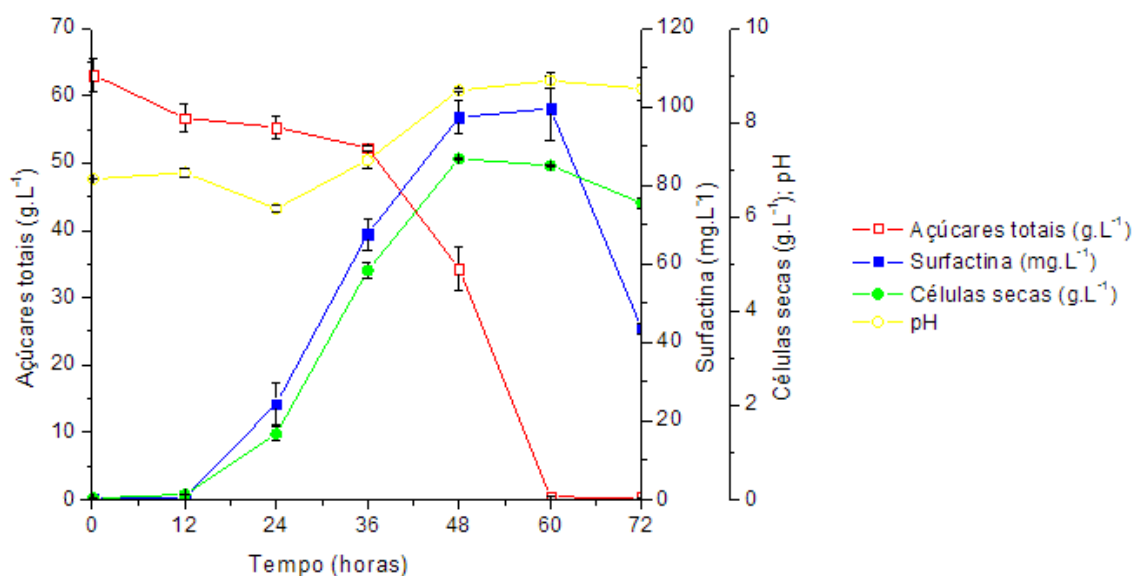


FIGURA 12 - Variação de concentração de surfactina, células secas, açúcares totais e de pH em função do tempo de cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (6% de açúcares totais).
 FONTE: O autor (2012).

TABELA 7 - Valores de produtividade de surfactina e em biomassa e fatores de conversão de substrato em biomassa e de substrato em surfactina obtidos durante o cultivo de 72 horas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (6% de açúcares totais).

Tempo (h)	P_x (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	P_p (mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{x/s}$	$Y_{p/s}$
12	0,01	0,02	0,01	0,04
24	0,06	1,01	0,18	3,13
36	0,13	1,87	0,45	6,23
48	0,15	2,02	0,25	3,38
60	0,12	1,66	0,11	1,59
72	0,09	0,60	0,10	0,69

FONTE: O autor (2012).

NOTA: As legendas utilizadas na tabela são: P_x : produtividade em biomassa; P_p : produtividade em surfactina; $Y_{x/s}$: fator de conversão de substrato em biomassa; $Y_{p/s}$: fator de conversão de substrato em surfactina.

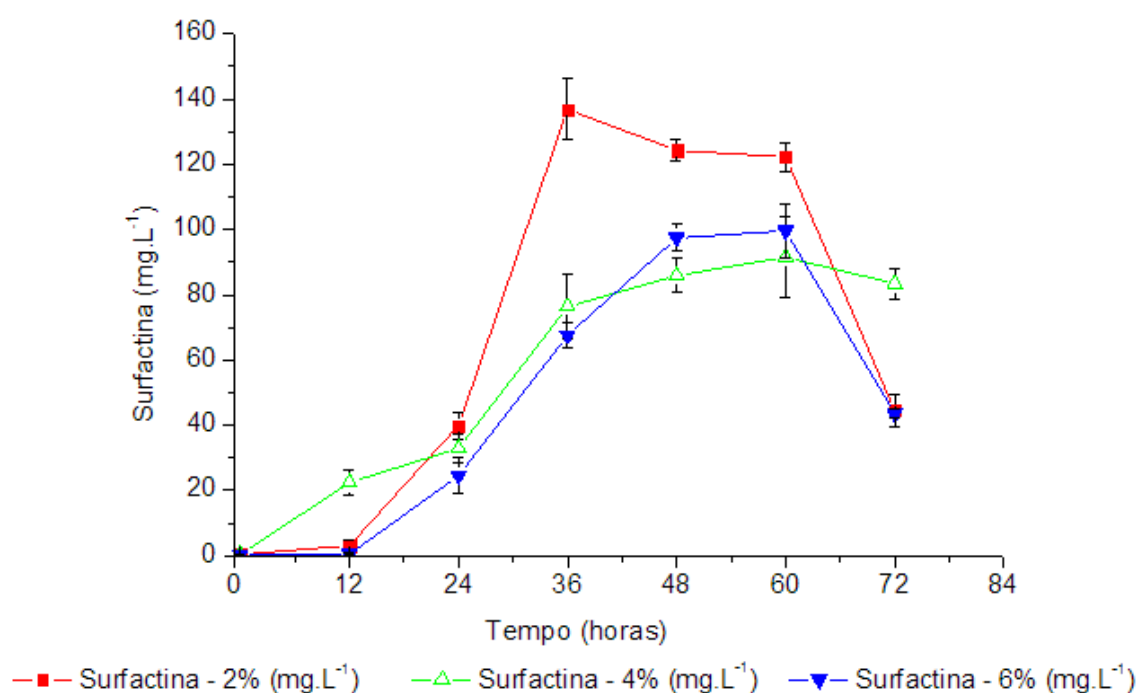


FIGURA 13 - Variação de concentração de surfactina em função do tempo de cultivo de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 em meio formulado adicionado de soja (2%, 4% e 6% de açúcares totais).

FONTE: O autor (2012).

Notou-se a queda brusca nos três meios de cultura contendo soja, sugerindo um possível consumo ou degradação de surfactina pelo micro-organismo, FIGURA 13. Tal fato foi observado em estudo com *Bacillus subtilis* (AL-AJLANI et al., 2007). Autores demonstraram quedas de surfactina em seus trabalhos (ABDELMAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008; FARIA et al., 2011), uma

justificativa para essa situação foi a acidificação do meio (WEI; CHU, 1998). Entretanto não ocorreu queda de pH nos cultivos. Isso pode ser explicado pelo consumo ou degradação da surfactina pelo micro-organismo, pois este é capaz de produzir proteases e hidrolisar a molécula para suprir o metabolismo microbiano (NITSCHKE; PASTORE, 2004; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010). Ainda, a redução da concentração pode estar associada com a formação e acúmulo de produtos tóxicos produzidos pelo metabolismo do micro-organismo (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999).

Dentre as três concentrações de açúcares totais iniciais, a concentração de 2% foi a mais promissora, apresentando um máximo de concentração 137 mg.L^{-1} de surfactina em 36 h contra 91 mg.L^{-1} e 100 mg.L^{-1} em 60 h nos meios com 4% e 6% de açúcares totais, respectivamente, fato encontrado em estudo com diferentes matérias-primas de baixo custo para produção de surfactina o qual valores entre 1% e 2% de açúcares totais apresentaram maior concentração de biosurfactante produzido (REIS; SÉRVULO; FRANÇA, 2004). Altas concentrações de açúcar no meio de cultivo são relatadas por possivelmente causarem a diminuição ou a inibição da produção de surfactina (COOPER *et al.*, 1981; PARKINSON, 1985; SULLIVAN, 1998). Quanto ao fator de conversão de substrato em produto, novamente o meio contendo 2% apresentou o melhor valor, 8,53, em menor espaço de tempo. De acordo com os presentes resultados e visto que menores concentrações de açúcares podem promover maiores concentrações de surfactina (CHEN; BAKER; DARTON, 2006), pode-se deduzir que a concentração de açúcares totais a 2% com melaço de soja pode criar condições que favoreçam uma maior concentração de surfactina produzida em meio de cultura.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O meio mineral demonstrou melhor aproveitamento da glicose pelo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 para produção de surfactina. A presença do íon manganês no meio mineral modificado favoreceu o crescimento do micro-organismo *Bacillus subtilis* ATCC 6633 nas condições de cultivo utilizadas no presente trabalho, atingindo $9,34 \text{ g.L}^{-1}$ de células secas com fator de conversão de substrato em biomassa de 0,46. No entanto, as concentrações de surfactina foram próximas de $135 \pm 4,92 \text{ mg.L}^{-1}$ e $131 \pm 1,87 \text{ mg.L}^{-1}$, no meio mineral e no meio mineral modificado, respectivamente, em 36 h.

Quando o meio formulado foi empregado para a produção de surfactina a concentração obtida foi de 66 mg.L^{-1} em 96 h e concentração de biomassa de $3,84 \text{ g.L}^{-1}$ de células secas em processo descontínuo. O processo descontínuo alimentado utilizando esse meio apresentou um incremento na formação de biomassa, a qual foi de $5,48 \text{ g.L}^{-1}$ de células secas.

A utilização dos meios de cultivo contendo o resíduo de melaço de soja apresentaram produção acima de 90 mg.L^{-1} de surfactina em todas as concentrações de açúcares totais utilizadas. Comparando-se as concentrações 2%, 4% e 6% de açúcares totais, o meio contendo melaço de soja a 2% foi o que mais favoreceu a produção de surfactina atingindo $136 \pm 9,28 \text{ mg.L}^{-1}$ em 36 h.

No presente estudo, os dois meios de cultura propostos – meio formulado e meio com melaço de soja – mostraram-se promissores para obtenção do produto de interesse, com resultados de concentração de surfactina próximos aos cultivos realizados com meios descritos na literatura.

Considerando a preocupação com o meio ambiente e com a geração de resíduos industriais, o meio formulado empregando o melaço de soja mostra-se promissor para a produção de surfactina em estudos futuros, no que se refere à otimização da sua composição, condições de cultivo e produção em maior escala empregando biorreatores.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A.-H. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 150, p. 305-325. 2008.
- AL-AJLANI, M. *et al.* Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmaceutical commercial medium. **Microbial Cell Factories**. v. 6, n.1, p. 17. 2007.
- AL-ARAJ, L. *et al.* Microbial Surfactant. **Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology**. v. 15, n.3, p. 99-105. 2007.
- BANAT, I. M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur**. v. 198, n.Mar, p. 44-47 2000.
- BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 53, n.3, p. 495-508 2000.
- BARROS, F. F. C. *et al.* Surfactina propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**. v. 30, n.2, p. 409-414. 2007.
- BOETTCHER, C. *et al.* Flexible loops of thread-like micelles are formed upon interaction of 1- α -dimyristoyl-phosphatidylcholine with the biosurfactant surfactin as revealed by cryo-electron tomography. **Biophysical Chemistry**. v. 149, n.1-2, p. 22-27. 2010.
- CAO, X.-H. *et al.* Surfactin induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through a ROS/JNK-mediated mitochondrial/caspase pathway. **Chemico-Biological Interactions**. v. 183, n.3, p. 357-362. 2010.
- CAO, X.-H. *et al.* ROS-Ca²⁺ is associated with mitochondria permeability transition pore involved in surfactin-induced MCF-7 cells apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**. v. p. 2011.
- CHEN, C.-Y.; BAKER, S. C.; DARTON, R. C. Batch production of biosurfactant with foam fractionation. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**. v. 81, n.12, p. 1923-1931. 2006.
- COOPER, D. G. *et al.* Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 42, n.3, p. 408-412. 1981.
- DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. **Journal of Applied Microbiology**. v. 104, n.6, p. 1675-1684. 2008.
- DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**. v. n.25, p. 322-329. 1999.
- DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. The application of foaming for the recovery of Surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 1, n.28, p. 346-354. 2001.
- DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. **Analytical Chemistry**. v. 28, n.3, p. 350-356. 1956.
- DUFOUR, S. *et al.* Hemolytic activity of new linear surfactin analogs in relation to their physico-chemical properties. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. v. 1726, n.1, p. 87-95. 2005.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Guide to Site and Soil Description for Hazardous Waste Site Characterization: Metals. In. Washington, DC 20460, 1992

FARIA, A. F. *et al.* Production and structural characterization of surfactin (C14/Leu7) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**. v. 46, n.10, p. 1951-1957. 2011.

HISS, H. **Cinética de processos fermentativos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 6, p. 148-159. 2001.

HWANG, Y. *et al.* Lipopolysaccharide-binding and neutralizing activities of surfactin C in experimental models of septic shock. **European Journal of Pharmacology**. v. 556, n.1-3, p. 166-171. 2007.

IBGE. **Confronto das Safras de 2011 e 2012 - Brasil - Julho 2012**. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_201207_5.shtm>. Acesso em: 01-08-2012.

IGARASHI, S.; HATTORI, Y.; MAITANI, Y. Biosurfactant MEL-A enhances cellular association and gene transfection by cationic liposome. **Journal of Controlled Release**. v. 112, n.3, p. 362-368. 2006.

ISA, M. *et al.* Recovery and purification of surfactin from fermentation broth by a two-step ultrafiltration process. **Journal of Membrane Science**. v. 296, n.1-2, p. 51-57. 2007.

JACQUES, P. *et al.* Optimization of Biosurfactant Lipopeptide Production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 90, n.77-79, p. 223-233. 1999.

KAKINUMA, A. *et al.* Determination of Amino Acid Sequence in Surfactin, a Crystalline Peptidelipid Surfactant Produced by *Bacillus subtilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 33, n.6, p. 971-972. 1969.

KAKINUMA, A. *et al.* Determination of Fatty Acid in Surfactin and Elucidation of the Total Structure of Surfactin. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 33, n.6, p. 973-976. 1969.

KAKINUMA, A. *et al.* Determination of the Location of Lactone Ring in Surfactin. **Agricultural and Biological Chemistry**. v. 33, n.10, p. 1523-1524. 1969.

KIKUCHI, T.; HASUMI, K. Enhancement of plasminogen activation by surfactin C: augmentation of fibrinolysis in vitro and in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1596, p. 234-245. 2002.

KIM, P. *et al.* Production of biosurfactant lipopeptides Iturin A, fengycin and surfactin. A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 20, n.1, p. 138-145. 2009.

KOUMOUTSI, A. *et al.* Structural and Functional Characterization of Gene Clusters Directing Nonribosomal Synthesis of Bioactive Cyclic Lipopeptides in *Bacillus amyloliquefaciens* Strain FZB42. **Journal of Bacteriology**. v. 186, n.4, p. 1084-1096. 2004.

KRAAS, F. I. *et al.* Functional Dissection of Surfactin Synthetase Initiation Module Reveals Insights into the Mechanism of Lipoinitiation. **Chemistry & Biology**. v. 17, n.8, p. 872-880. 2010.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 7, p. 12-20. 2002.

LEE, J. H. *et al.* The production of surfactin during the fermentation of cheonggukjang by potential probiotic *Bacillus subtilis* CSY191 and the resultant growth suppression of MCF-7 human breast cancer cells. **Food Chemistry**. v. 131, n.4, p. 1347-1354. 2012.

LEE, S. *et al.* Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella sp.* Y6-1 isolated from waste soybean oil. **Bioresource Technology**. v. 99, n.7, p. 2288-2292. 2008.

LIAO, H.-T. A new application of biosurfactant for the preparation of polycaprolactone/layered silicate nanocomposites. **Polymer Engineering & Science**. v. 48, n.8, p. 1524-1531. 2008.

LIAO, Z. *et al.* Biocompatible surfactin-stabilized superparamagnetic iron oxide nanoparticles as contrast agents for magnetic resonance imaging. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. p. 2010.

LIU, J.; ZOU, A.; MU, B. Surfactin effect on the physicochemical property of PC liposome. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 361, p. 90-95. 2010.

LIU, T. *et al.* Integrated process for production of surfactin Part 1: Adsorption rate of pure surfactin onto activated carbon. **Biochemical Engineering Journal**. v. 35, n.3, p. 333-340. 2007.

LIU, X. *et al.* Optimization for the Production of Surfactin with a New Synergistic Antifungal Activity. **PLoS ONE**. v. 7, n.5, p. 1-9. 2012.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Synthesis of Enhanced Biosurfactant by *Bacillus subtilis* MTCC 2423 at 45°C by Foam Fractionation. **Journal of Surfactants and Detergents**. v. 4, n.4, p. 355-357. 2001.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Effects of Various Nutritional Supplements on Biosurfactant Production by a Strain of *Bacillus subtilis* at 45°C. **Journal of Surfactants and Detergents**. v. 5, n.1, p. 11-17. 2002.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**. v. 1, n.5, p. 1-19. 2011.

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

MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**. v. 24, n.11, p. 509-515. 2006.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**. v. 14, n.5, p. 372-378. 2009.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **Journal of Hazardous Materials**. v. 85, p. 111-125. 2001.

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

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* Using Cassava-Processing Effluent. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 112, n.1, p. 163-172. 2004.

O'TOOLE, D. K. Characteristics and Use of Okara, the Soybean Residue from Soy Milk Productions - A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 47, n.2, p. 363-371. 1999.

ONGENA, M.; JACQUES, P. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. **Trends in Microbiology**. v. 16, n.3, p. 115-125. 2008.

PALANISAMY, P. Biosurfactant mediated synthesis of NiO nanorods. **Materials Letters**. v. 62, n.4-5, p. 743-746. 2008.

PARK, S. Y.; KIM, Y. Surfactin inhibits immunostimulatory function of macrophages through blocking NK- κ B, MAPK and Akt pathway. **International Immunopharmacology**. v. 9, n.7-8, p. 886-893. 2009.

PARK, S. Y. *et al.* Heme oxygenase-1 signals are involved in preferential inhibition of pro-inflammatory cytokine release by surfactin in cells activated with *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. **Chemico-Biological Interactions**. v. 188, n.3, p. 437-445. 2010.

- PARKINSON, M. Bio-surfactants. **Biotchnology Advancess**. v. 3, n.1, p. 65-83. 1985.
- REDDY, A. S. *et al.* Synthesis of silver nanoparticles using surfactin: A biosurfactant as stabilizing agent. **Materials Letters**. v. 63, n.15, p. 1227-1230. 2009.
- REIS, F. A. S. L.; SÉRVULO, E. F. C.; FRANÇA, F. P. D. Lipopeptide Surfactant Production by *Bacillus subtilis* Grown on Low-Cost Raw Materials. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 113-116, n.4, p. 899-912. 2004.
- SATPUTE, S. K. *et al.* Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. **Critical Reviews in Biotechnology**. v. 30, n.2, p. 127-144. 2010.
- SEYDLOVÁ, G.; ČABALA, R.; SVOBODOVÁ, J. Surfactin – Novel Solutions for Global Issues **Biomedical Engineering, Trends, Research and Technologies**. v. 13, p. 305-330.
- SHALIGRAM, N. S.; SINGHAL, R. S. Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation, Purification and Applications. **Food Technology Biotechnology**. v. 48, n.2, p. 2010.
- SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. **Trends in Biotechnology**. v. 22, n.3, p. 142-146. 2004.
- SOBERÓN-CHÁVEZ, G. **Microbiology Monographs**. Berlin: Springer Verlag Berlin Heidelberg, 2011.
- STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of Fermentation Technology**. 2. Bodmin: MPG Books Ltd, 2003.
- SULLIVAN, E. R. Molecular genetics of biosurfactant production. **Environmental Biotechnology**. v. n.9, p. 263-269. 1998.
- THOMPSON, D. N.; FOX, S. L.; BALA, G. A. Biosurfactants from Potato Process Effluents. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. v. 84-86, p. 917-930. 2000.
- UENO, Y. *et al.* NBD-conjugated biosurfactant (MEL-A) shows a new pathway for transfection. **Journal of Controlled Release**. v. 123, n.3, p. 247-253. 2007.
- VOLLENBROICH, D. *et al.* Antimycoplasma Properties and Application in Cell Culture of Enveloped Viruses by the Biosurfactant Surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**. v. 25, p. 289–297. 1997a.
- VOLLENBROICH, D. *et al.* Mechanism of Inactivation of Enveloped Viruses by the Biosurfactant Surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals**. v. 25, n.3, p. 289–297. 1997b.
- WANG, Y. *et al.* Separation and extraction of antimicrobial lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* ES-2 with macroporous resin. **European Food Research and Technology**. v. 231, n.2, p. 189-196. 2010.
- WEI, Y.-H.; CHU, I.-M. Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Enzyme and Microbial Technology**. v. n.22, p. 724-728. 1998.
- WEI, Y.-H.; CHU, I.-M. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**. v. 1, n.24, p. 479–482. 2002.
- WEI, Y.-H.; LAI, C.-C.; CHANG, J.-S. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **Process Biochemistry**. v. n.42, p. 40-45. 2007.
- WEI, Y.-H. *et al.* Identification of Induced Acidification in Iron-Enriched Cultures of *Bacillus subtilis* during Biosurfactant Fermentation. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 96, n.2, p. 174-178. 2003.

WHANG, L.-M. *et al.* Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil. **Journal of Hazardous Materials**. v. 151, n.1, p. 155-163. 2008.

WHANG, L.-M. *et al.* Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation—Effects of pH and ammonium addition. **Journal of Hazardous Materials**. v. 164, n.2-3, p. 1045-1050. 2009.

YAKIMOV, M. M. *et al.* Characterization of a New Lipopeptide Surfactant Produced by Thermotolerant and Halotolerant Subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. **Applied And Environmental Microbiology**. v. 61, n.5, p. 1706-1713. 1995.

YEH, M.-S.; WEI, Y.-H.; CHANG, J.-S. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochemistry**. v. 41, n.8, p. 1799-1805. 2006.

YING, G.-G. Fate, behavior and effects of surfactants and their degradation products in the environment. **Environment International**. v. 32, n.3, p. 417-431. 2006.