



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIANA MUNHOZ LARINI

**PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus*
amyloliquefaciens MO.04b EM MISTURA DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS**

Londrina
2017

MARIANA MUNHOZ LARINI

**PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus*
Amyloliqefaciens MO.04B EM MISTURA DE RESÍDUOS
AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Rezende
Co-Orientadora: Profa. Dra. Fabiana Guillen
Moreira Gasparin

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Larini, Mariana Munhoz.

Produção de surfactina por bacillus amyloliquefaciens mo.04b em mistura de resíduos agroindustriais / Mariana Munhoz Larini. - Londrina, 2017.
141 f. : il.

Orientador: Maria Inês Rezende.

Coorientador: Fabiana Guillen Moreira Gasparin.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Bacillus amyloliquefaciens - Tese. 2. Fermentação em Estado Sólido - Tese. 3. Resíduos Agroindustriais - Tese. 4. Biossurfactantes - Tese. I. Rezende, Maria Inês. II. Gasparin, Fabiana Guillen Moreira. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

MARIANA MUNHOZ LARINI

**PRODUÇÃO DE SURFACTINA POR *Bacillus amyloliquefaciens*
MO.04b EM MISTURA DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Rezende
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel
Universidade Tecnológica Federal do Paraná -
UTFPR

Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de agosto de 2017

Dedico este trabalho a Deus, a quem sou eternamente grata pela vida e amparo em toda a minha existência.

Graças a Ele cada passo da minha caminhada é cheio de luz, sabedoria, discernimento e graças. Obrigada, Pai!

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Maria Inês Rezende, minha admiração e os meus sinceros e especiais agradecimentos, pela orientação constante e dedicada e revisão criteriosa do trabalho, pelos conhecimentos compartilhados, passados sempre com muita paciência e profissionalismo, bem como a atenção constante. Sou grata também pela relação sincera e fraterna estabelecida ao longo de todo o trabalho.

À Profa. Dra. Fabiana Guillen Moreira Gasparin, pela disponibilidade, assistência e por todo o conhecimento transmitido durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Mara Lúcia Luiz Ribeiro, pela valiosa contribuição, conhecimento partilhado e pela disponibilidade em auxiliar no desenvolvimento do trabalho com tanto carinho, atenção e interesse.

A todos os Professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, por todo ensino, que foi a base para a elaboração deste estudo. Em especial à Profa. Dra. Josiane Alessandra Vignoli e ao Prof. Dr. Doumit Camilios Neto, que auxiliaram em momentos cruciais para a continuidade deste trabalho.

Ao Dr. Ismael Rodrigues Amador, pela disponibilidade em instruir em práticas de laboratório, análise de dados, e pelo interesse neste trabalho.

Ao técnico de laboratório Nelson Janeiro Rodriguez, pela disposição, prontidão, paciência e ajuda na realização dos experimentos deste trabalho.

Aos meus pais, meus maiores exemplos de vida e meus alicerces. Foram eles quem mais me incentivaram nos momentos complicados e me encorajaram a chegar ao final do trabalho confiante sobre o que foi realizado.

Aos meus amigos, pelo entendimento e pelo carinho oferecidos, e aos companheiros de laboratório, pela companhia e auxílio durante as práticas experimentais.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

O meu caloroso e sincero agradecimento a todos!

LARINI, Mariana Munhoz. **Produção de surfactina por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em mistura de resíduos agroindustriais**. 2017. 141 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

O Brasil, importante no cenário agrícola mundial, é produtor de soja, grão de alto teor proteico, cana de açúcar e arroz. Essas culturas, quando processadas, geram materiais que são potenciais substratos para o cultivo microbiano e produção de metabólitos de alto valor agregado. A fermentação em estado sólido (FES) possibilita o cultivo de microrganismos em condição de baixo teor de umidade e favorece o aproveitamento de diferentes resíduos agroindustriais. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de surfactina, um biossurfactante lipopeptídico, por FES, utilizando o *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b. O microrganismo foi cultivado em mistura de resíduos agroindustriais contendo farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz, umedecidos com solução de sais acrescida de glicose 0,2 % (m/v), inoculados com suspensão de células (10^7 - 10^8 UFC mL⁻¹) e incubados a 37 ± 2 °C. Após a interrupção da FES com água destilada, a mistura foi homogeneizada, a biomassa determinada por turbidimetria a 600 nm e contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Essa mistura foi submetida a centrifugação a $3.500 \times g$ por 15 minutos. O peso do material sólido fermentado foi determinado por gravimetria e o extrato livre de células (ELC) utilizado para a determinação do pH (inicial e final), da atividade das enzimas proteases, xilanases, celulasas e lacases, das proteínas totais e dos açúcares totais e redutores. Os lipopeptídeos contidos no ELC foram precipitados com adição de HCl 6 mol L^{-1} até pH 2,0 e mantido em repouso durante 12 horas e extraídos com a mistura de clorofórmio e metanol [CHCl₃:CH₃OH (4:1)]. O material obtido foi então liofilizado. A quantificação de surfactina foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O pH final dos cultivos foi crescente ao longo do tempo de cultivo e atingiu o máximo de 8,5 em 72 horas, assim como a biomassa, que cresceu ao longo do tempo, até 18 – 24 horas, atingindo o máximo de 1×10^8 UFC mL⁻¹. Quanto ao material sólido fermentado, foi verificada a redução progressiva do peso seco, de 1,2207g (0 horas) até 0,9268 g (72 horas), mostrando que em 72 horas de cultivo o microrganismo hidrolisou 25 % do total dos resíduos agroindustriais. A atividade de proteases e xilanases foram $0,946 \text{ U mL}^{-1}$ e $0,81 \text{ U mL}^{-1}$, respectivamente, entre 6 e 12 horas de cultivo. Não foram detectadas atividades de celulase e lacase. A surfactina foi produzida em todos os períodos analisados, e teve maior produção em 18 horas de cultivo, de $64,15 \text{ mg mL}^{-1}$. A mistura de resíduos utilizada favoreceu o crescimento do microrganismo, o qual foi capaz de consumir 25 % dos resíduos nas condições de FES apresentadas. Tais condições propiciaram à bactéria a produção das enzimas protease e xilanase e de surfactina, cuja maior produção ocorreu em 18 horas de cultivo.

Palavras-chave: *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b. Fermentação em Estado Sólido. Resíduos Agroindustriais. Biossurfactantes.

LARINI, Mariana Munhoz. **Production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b in mixed agroindustrial waste**. 2017. 141p. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

Brazil, important in the world's agricultural scenario, is a producer of soybeans, high-protein grain, sugar cane and rice. These cultures, when processed, generate materials that are potential substrates for the microbial culture and production of metabolites of high added value. A solid state fermentation (FES) allows the cultivation of microorganisms in a condition of low moisture content and favors the use of different agroindustrial residues. The objective of this work is to evaluate the production of surfactin, a lipopeptide biosurfactant, by FES using *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b. The microorganism was cultivated in a mixture of agroindustrial residues containing soybean meal, sugarcane bagasse and rice husk, moistened with salt solution plus 0.2% glucose (m/v), inoculated with cell suspension (10^7 - 10^8 CFU ml⁻¹) and incubated at 37 ± 2 °C. After interruption of FES with distilled water, the mixture was homogenized, the biomass determined by turbidimetry at 600 nm and counting of the colony forming units (CFU). This mixture was subjected to centrifugation at $3500 \times g$ for 15 min. The weight of the fermented solid material was determined by gravimetry and the free cell extract (ELC) used for the determination of the pH (initial and final), activity of enzymes protease, xylanases, cellulases and laccases, total proteins, total sugars and reduced sugar. The lipids contained in the ELC were precipitated with addition of 6 mol L^{-1} HCl to pH 2.0 and held for 12 hours and extracted with a mixture of chloroform and methanol [CHCl₃:CH₃OH (4:1)]. The obtained material was then lyophilized. The quantification of surfactin was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). The final pH of the cultures was increased over the growing time and reached the maximum of 8.5 in 72 hours, as well as the biomass, which grew over time, up to 18 - 24 hours, reaching a maximum of 1×10^8 CFU mL⁻¹. As regards the fermented solid material, a progressive reduction of dry weight was observed from 1.2207g (0 h) to 0.9268 g (72 h), showing that in 72 h of culture the microorganism hydrolyzed 25% of the total agroindustrial waste. The activity of proteases and xylanases were 0.946 U mL^{-1} and 0.81 U mL^{-1} , respectively, between 6 and 12 hours of culture. No cellulase and laccase activities were detected. Surfactin was produced in all analyzed periods, and had a higher production in 18 hours of culture, of 64.15 mg mL^{-1} . The mixture of residues used favored the growth of the microorganism, which was able to consume 25% of the residues under the FES conditions presented. These conditions allowed the bacterium to produce protease and xylanase and surfactin enzymes, whose highest production occurred in 18 hours of culture.

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b. Solid State Fermentation. Agroindustrial Waste. Biosurfactants

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Estrutura do principal homólogo (iso-C15) da surfactina. Isoformas: (A) Surfactina A, (B) Surfactina B e (C) Surfactina C 18
- Figura 2** – Estrutura química básica do C15-surfactina-O-metil éster..... 20
- Figura 3** – Aspecto dos meios cultivos para FES de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b cultivado nos resíduos bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja, casca de arroz. Em A, o aspecto do controle e dos frascos cultivo de 6 horas; em B, os frascos cultivo de 18 horas; em C, o aspecto dos frascos cultivo de 48 horas; em D, os frascos cultivo de 72 horas, incubados a 37 ± 2 °C. As setas indicam as regiões onde houve maior crescimento dos microrganismos 55
- Figura 4** – Curva de atividade de protease produzida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b em FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz como substrato durante 0, 6, 9, 12, 18, 24, 48 e 72 horas de cultivo, a 37 ± 2 oC..... 58
- Figura 5** – Curva de atividade de xilanase produzida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b em FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz como substrato durante 0, 6, 9, 12, 18, 24, 48 e 72 horas de cultivo, a 37 ± 2 oC..... 59
- Figura 6** – Aspecto dos meios cultivos para FES de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b cultivado nos resíduos bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja, casca de arroz. Em A aspecto do frasco controle, e em B os frascos cultivo de 12 horas, em C os frascos cultivo de 24 horas e em D os frascos cultivo de 48 horas, incubados a 37 ± 2 °C..... 62
- Figura 7** – Aplicação de diferentes reveladores de Cromatografia de Camada Delgada (CCD). Em 1, revelação com vanilina-sulfúrica, com padrão de surfactina (2 mg mL⁻¹) e amostras (0,92 mg mL⁻¹, 1,04 mg mL⁻¹ e 0,72 mg mL⁻¹); em 2 e 3, p-anisaldeído e orcinol sulfúrico, respectivamente, ambos com padrão de surfactina (2 mg mL⁻¹, 0,1 mg mL⁻¹ e 0,01 mg mL⁻¹) e amostra (0,72 mg mL⁻¹ e 0,036 mg mL⁻¹); em 4, 5, e 6, Dragendorff, ácido sulfúrico 5 % e ninidrina, com padrão de surfactina (2 mg mL⁻¹, 0,1 mg mL⁻¹ e 0,01 mg mL⁻¹) e

	amostras (0,92 mg mL ⁻¹ e 0,046 mg mL ⁻¹ , 1,04 mg mL ⁻¹ e 0,052 mg mL ⁻¹ e 0,72 mg mL ⁻¹ e 0,036 mg mL ⁻¹).....	63
Figura 8 –	Placas cromatográficas (sílica gel) após corrida cromatográfica em fase móvel de clorofórmio:metanol:água (65:25:1, v/v/v) e revelação com diferentes reveladores. Em 1 NH ₄ OH foi dissipado dentro da cuba durante a corrida cromatográfica; em 2 e 3 as placas foram saturadas com NH ₄ OH; em 4 e 5 as placas foram borrifadas com NH ₄ OH 0,1 molar; em 6 a placa foi encubada durante dez minutos com iodo para revelação das manchas. Revelação com vanilina sulfúrica: 1,2 e 4. Revelação com ninidrina: 3 e 5.....	64
Figura 9 –	Curva padrão para determinação da biomassa.....	66
Figura 10 –	Biomassa da suspensão obtida do cultivo de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO-04b em FES em 7,5 g da mistura contendo bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz a 37 ± 2 oC em diferentes tempos de cultivo.	67
Figura 11 –	Cromatograma do padrão de surfactina (Sigma-Aldrich) a 100 µg mL ⁻¹ , apresentando os 7 picos, cujos tempos de retenção foram de 8,392 minutos, 9,725 minutos, 10,325 minutos, 12,208 minutos, 13,067 minutos, 14,100 minutos e 15,508 minutos. Os picos 2, 3, 4, 5 e 7 são os homólogos da surfactina.....	69
Figura 12 –	Curva analítica do padrão de surfactina.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes cepas de <i>Bacillus subtilis</i> produtoras de surfactina	22
Tabela 2 - Diferentes cepas de <i>Bacillus subtilis</i> produtoras de surfactina, o substrato utilizado e a quantidade de surfactina produzida.....	23
Tabela 3 - Microrganismos produtores de surfactina.....	24
Tabela 4 - Aplicações terapêuticas e ambientais da surfactina.....	29
Tabela 5 - Óleos e hidrocarbonetos acrescidos em Meios de Sais Minerais para a produção de surfactina por cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	37
Tabela 6 - Resíduos da agroindústria e outros substratos utilizados na produção de surfactina por <i>Bacillus</i>	38
Tabela 7 - Materiais hidrolisados utilizados como substrato para a produção de biossurfactantes por diferentes microrganismos	38
Tabela 8 - Composição do meio de DYGS	44
Tabela 9 - Composição do meio de sais minerais (MSM)	44
Tabela 10 - Avaliação da capacidade de hidrólise dos resíduos lignocelulósicos farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO-04b cultivado por 72 horas a 37 ± 2 °C.....	56
Tabela 11 - Massa de extrato seco obtido do processo fermentativo, em mg; concentração das amostras aplicadas no sistema de CLAE em mg mL ⁻¹ ; concentração de surfactina determinada pela equação de regressão linear proveniente da curva analítica, em µg mL ⁻¹ ; concentração total de surfactina em relação à massa total de extrato seco, em mg mL ⁻¹ ; rendimento de surfactina, em mg por grama de substrato seco	70

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	SURFACTANTES E BIOSURFACTANTES.....	16
3.2	SURFACTINA.....	17
3.2.1	Microrganismos Produtores.....	20
3.2.2	Aplicações	24
3.2.2.1	Aplicações terapêuticas.....	24
3.2.2.2	Aplicações ambientais	27
3.3	PRODUÇÃO DE SURFACTINA.....	30
3.3.1	Fatores que Influenciam a Produção.....	30
3.3.2	Condições Nutricionais	32
3.3.2.1	Fontes de carbono.....	34
3.3.2.2	Fontes de nitrogênio.....	34
3.3.2.3	Elementos traços.....	35
3.3.3	Utilização de Substratos Complexos	36
3.3.3.1	Tipos de substratos	36
3.4	SOJA E SEUS SUBPRODUTOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES	39
3.5	BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS NA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1	MICROORGANISMO E MANUTENÇÃO.....	43
4.2	RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS.....	43
4.3	MEIOS DE CULTIVO	43
4.3.1	Meio de Manutenção DYGS.....	43
4.3.2	Meio de Sais Minerais (MSM).....	43
4.4	PREPARO DO INÓCULO	44
4.5	CULTIVOS EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO	45

4.5.1	Preparo dos Meios de Cultivo.....	45
4.5.2	Interrupção dos Cultivos e Obtenção do Extrato Livre de Células (ELC)	45
4.5.3	Determinação do Peso Seco do Material Sólido Fermentado	45
4.6	DETERMINAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO CELULAR	45
4.6.1	Preparo da Curva padrão para Determinação de Biomassa por Espectrofotometria	45
4.6.2	Determinação da Viabilidade Celular por Plaqueamento e Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	46
4.7	DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ENZIMAS EXTRACELULARES	47
4.7.1	Atividade de Protease	47
4.7.2	Atividade de Xilanase	47
4.7.3	Atividade de Celulase.....	48
4.7.4	Atividade de Lacase	49
4.8	CULTIVO EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES	49
4.9	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA SURFACTINA.	50
4.9.1	Precipitação e Extração de Surfactina.....	50
4.9.2	Cromatografia de Camada Delgada (CCD).....	50
4.9.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	51
4.10	OUTRAS DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS	52
4.10.1	Determinação do pH (inicial e final).....	52
4.10.2	Determinação das Proteínas Totais	52
4.10.3	Determinação dos Açúcares Totais.....	52
4.10.4	Determinação dos Açúcares Redutores	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO POR BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS MO.04B NA MISTURA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (BC), FARELO DE SOJA (Fs) E CASCA DE ARROZ (CA).....	54
5.2	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS EXTRACELULARES POR BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS MO.04B EM FES NA MISTURA DE	

	BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, FARELO DE SOJA E CASCA DE ARROZ.....	57
5.2.1	Atividade de Protease	57
5.2.2	Atividade de Xilanase	58
5.2.3	Atividade de Celulase e Lacase	60
5.3	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO POR BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS MO.04B NA MISTURA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (BC), FARELO DE SOJA (FS) E CASCA DE ARROZ (CA) PARA A OBTENÇÃO DE SURFACTINA.....	61
5.4	IDENTIFICAÇÃO DA SURFACTINA POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD).....	62
5.5	CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	66
5.6	QUANTIFICAÇÃO DA SURFACTINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....	68
6	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICES	94
APÊNDICE A -	Primeira versão do artigo científico de revisão a ser submetido à revista Revista Evidência – Ciência e Biotecnologia	95
APÊNDICE B -	Primeira versão do artigo científico a ser submetido à revista Orbital: The Eletronic Journal of Chemistry	123
	ANEXOS	135
ANEXO A -	Normas da Revista Biotechnology Journal para publicação de artigos de revisão.....	136
ANEXO B -	Normas da Revista Orbital: The Eletronic Journal of Chemistry para publicação de artigo científico	140

1 INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, caracterizadas por sua capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. Eles reduzem a tensão superficial (TS), formando microemulsões e promovendo a dispersão de hidrocarbonetos nas soluções aquosas. Sua obtenção pode ser sintética, por meio de reações químicas, maneira pela qual a maioria é sintetizada atualmente, ou natural, por microrganismos específicos. Os biossurfactantes, produzidos a partir de fontes renováveis, são uma alternativa para a substituição dos sintéticos, originários de derivados do petróleo.

Os biossurfactantes apresentam outras vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, tais como biodegradabilidade e baixa toxicidade, e ainda contam com outros benefícios, como maior taxa de redução de tensão superficial, solubilidade em água, estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH. Além do mais, existe a possibilidade de modificação estrutural deste biocomposto utilizando recursos da engenharia genética. Apesar das inúmeras vantagens, a sua produção em larga escala apresenta alto custo, limitando sua aplicação (BUGAY, 2009).

Além dessas vantagens, eles também apresentam inúmeras aplicações frente a diversos setores industriais, tais como o de alimentos, cosméticos, agricultura, detergentes, medicina, e principalmente, na indústria do petróleo, tanto para a extração como para sua incorporação nas formulações de óleo, dispersão de derramamento de óleo em solo e no mar, remoção de lodo de óleo de tanques de estocagem, na recuperação melhorada de petróleo e na descontaminação ambiental, já que os biossurfactantes aceleram a degradação microbiana de muitos óleos, e por consequência promovem a biorremediação de águas e solos (DECESARO; RIGON, 2013; BUGAY, 2009).

Os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com sua composição química. Dentre os grupos, o dos lipopeptídeos se destaca pela sua eficiência e são produzidos por várias espécies de *Bacillus*. Estes, por sua vez, apresentam elevada capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular, além de alta taxa de crescimento.

A fermentação submersa (FS) e a fermentação em estado sólido (FES) são relacionadas como processos de produção de metabólitos microbianos, dentre eles os

biossurfactantes. A diferença entre as técnicas reside no teor de água contido nos meios de cultivo, sendo que na FS utiliza-se a água como solvente e os substratos estão dissolvidos nos meios de cultivo, enquanto na FES há o uso de substratos sólidos, sendo que a água é um dos componentes e apresenta teores variáveis entre 30 a 70 % (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006).

O uso de resíduos agroindustriais para a produção de biossurfactantes tem sido uma boa alternativa, já que reduz a geração de resíduos, além de produzir metabólitos que podem ser comercializados. O Brasil é um país de grande importância no cenário agrícola mundial, sendo um dos grandes produtores de soja. Esse grão fornece um subproduto bastante nutritivo e proteico, o farelo de soja, que pode ser utilizado para obtenção de diferentes produtos através da FES. Também destaca-se como produtor de arroz e cana-de-açúcar, o que leva há um grande acúmulo de casca de arroz e bagaço de cana-de-açúcar, que são pobres em proteínas, porém, podem ser empregados na FES, proporcionando condições mais favoráveis para o crescimento microbiano em baixo teor de umidade.

Este trabalho visa avaliar a produção de surfactina pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b, utilizando mistura de resíduos agroindustriais como substrato. Para tal, será avaliada a produção do lipopeptídeo pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em fermentação em estado sólido, a 37 °C, em diferentes períodos de cultivo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de surfactina por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em mistura de resíduos agroindustriais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b por fermentação em estado sólido em mistura de farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz;
- Conhecer o perfil hidrolítico do microrganismo através da produção das enzimas extracelulares protease, xilanase, celulase e lacase;
- Extrair os lipopeptídeos produzidos pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b em fermentação em estado sólido;
- Identificar a surfactina produzida por cromatografia de camada delgada (CCD);
- Quantificar por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) a surfactina de *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 SURFACTANTES E BIOSSURFACTANTES

Os surfactantes são constituídos de porções hidrofóbicas e hidrofílicas, sendo capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre moléculas individuais na superfície e interface (MULLIGAN, 2009). Os biossurfactantes tem substituído os surfactantes químicos por produção biotecnológica com síntese enzimática ou microbiana. Estes compostos anfipáticos reduzem a tensão superficial do meio ao qual estão sendo produzidos, sendo assim apresentam aplicações na indústria, agricultura, mineração, e recuperação de petróleo, com propriedades tais como agentes molhantes, espumantes e emulsionantes em produtos farmacêuticos e cosméticos (GAUTAM; TYAGI, 2006).

Em 2010, o aumento anual na produção de surfactantes era de 2 – 4 % (CAMEOTRA et al., 2010). O mercado mundial de surfactantes passou por um crescimento constante nos últimos anos. Foi avaliado em aproximadamente US\$ 30,65 bilhões em 2015. Crescendo 4,4 % ao ano nos próximos anos, espera-se que o mercado atinja US\$ 39,69 bilhões em 2021 e se aproxime de US\$ 45,16 bilhões até 2024 (ACMITE MARKET INTELLIGENCE, 2016). Porém, o alto custo associado à produção de biossurfactantes tem se tornado um problema para a indústria e prejudicou seu desenvolvimento. Apesar de os biossurfactantes terem que competir com surfactantes sintéticos em termos de custo, os biossurfactantes devem continuar sendo utilizados em alguns produtos de alto custo, como em cosméticos e medicamentos (CHEN; JUANG; WEI, 2015).

Os biossurfactantes, apesar da questão de custo envolvida na produção, apresentam algumas vantagens sobre os surfactantes obtidos a partir do petróleo, tais como biodegradabilidade, produção a partir de substratos renováveis, baixa toxicidade, biocompatibilidade, digestibilidade, diversidade de estrutura química e propriedades, efetividade mesmo em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (FRANÇA et al., 2015). Por estas razões os biossurfactantes são uma alternativa real aos surfactantes produzidos por processos químicos e já estão sendo usados como substitutos daqueles (MARCHANT; BANAT, 2012).

Os biossurfactantes são classificados conforme a estrutura química em glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos, lipídios

neutros e compostos poliméricos (KHOPADE et al., 2012). Os lipopeptídeos contêm peptídeos hidrofílicos que diferem na composição de aminoácidos e sequência (de sete a dez aminoácidos) ligados a um ácido graxo hidrofóbico com diferentes comprimentos de cadeia. Eles estão entre os biossurfactantes mais isolados e caracterizados e são produzidos por numerosos *Bacillus spp.* são classificados em três famílias devido as suas sequências de aminoácidos: iturinas, fengicinas e surfactinas (AYED et al., 2014).

3.2 SURFACTINA

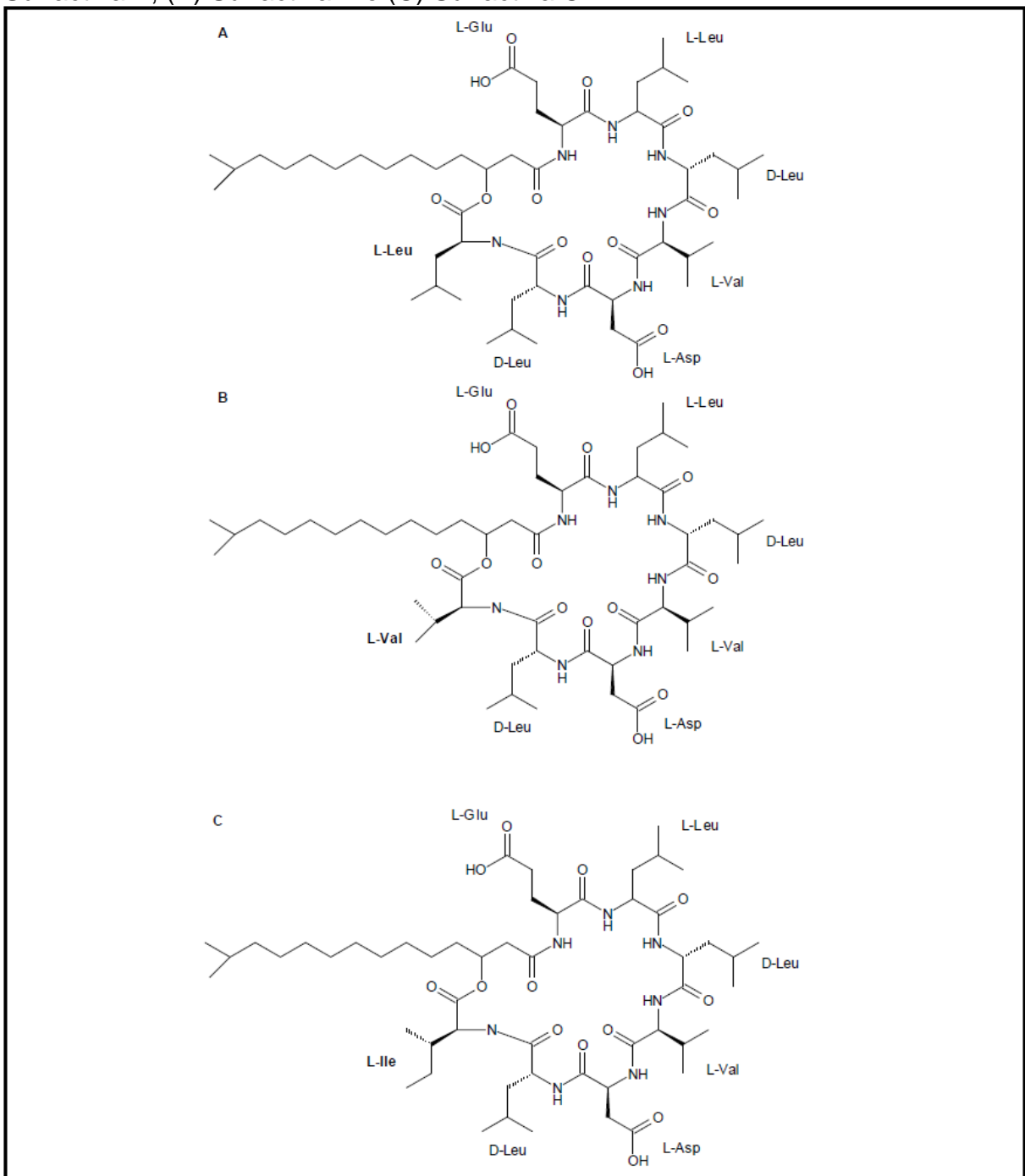
A surfactina foi relatada pela primeira vez por Arima, Kakinuma e Tamura (1968), que tentavam encontrar um inibidor da formação do coágulo de fibrina. A partir de cultivo de *Bacillus subtilis* foi isolado um lipopeptídeo cristalino, com potente ação inibidora da formação de coágulo sanguíneo e também um poderoso agente tensoativo de superfície. A concentrações tão baixas quanto 0,005 % em água destilada, este composto ativo de superfície, então denominado surfactina, revelou-se capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN m^{-1} para 27 mN m^{-1} e mostrou possuir atividade de superfície melhor que o lauril sulfato de sódio, um surfactante sintético (SEN et al., 2010). Além disso, a surfactina promove a redução da tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 mN m^{-1} a valores menores que 1 mN m^{-1} com uma concentração micelar crítica (CMC) de 10^{-5} M . A CMC indica a máxima concentração de surfactante com propriedades tensoativas onde, a partir dessa concentração, inicia-se a formação de micelas que conferirá as propriedades de detergência e solubilização do composto (SLIVINSKI, 2012; BARROS et al., 2007; LIU et al., 2015).

A estrutura primária da surfactina foi determinada por Kakinuma et al. (1969). É composta por uma cadeia peptídica formada por sete α -aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidroxi com comprimento de cadeia que varia de 12 a 16 átomos de carbono, para formar um lipopeptídeo cíclico (LIU; YANG; MU, 2005; IGLESIAS-FERNÁNDEZ, 2015; BARROS et al., 2007; KAKINUMA et al., 1969).

As diferenças nas sequências de aminoácidos e no número de átomos de carbono no ácido graxo indica que as surfactinas apresentam uma variedade de análogos estruturais ou isoformas (KAKINUMA et al., 1969; LIU et al., 2005). A

principal isoforma, surfactina A, possui em sua porção peptídica a seqüência de resíduos de aminoácidos N-L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu-C. As isoformas da surfactina A, B e C variam na posição do sétimo aminoácido, entre Leu, Val e Ile, respectivamente e estão representadas na Figura 1 (VATER et al., 2002; BARROS et al., 2007; LIU; YANG; MU, 2008).

Figura 1 - Estrutura do principal homólogo (iso-C₁₅) da surfactina. Isoformas: (A) Surfactina A, (B) Surfactina B e (C) Surfactina C



Fonte: Vater et al. (2002)

O padrão de aminoácidos e de ácidos graxos β -hidróxi na molécula depende das cepas bacterianas que produzem a surfactina e do tipo das condições de cultura (SEYDLOVÁ et al., 2011).

Três compostos de surfactina foram produzidos pelas linhagens de *B. subtilis* ATCC 21332 e OKB 105, dois dos quais foram diferentes da estrutura básica no aminoácido Leu⁷, o qual foi substituído por Val e Ile, respectivamente, indicando que foram encontradas as surfactinas B e C (BAUMGART et al., 1991). Liu et al. (2007) utilizaram os métodos de análise de sequência de aminoácido descrita por Yang, Wei e MU (2006) e de análise de ácido graxo ligado à cadeia peptídica (WEI; LAI; CHANG, 2007), e identificaram as surfactinas produzidas por *B. subtilis* quando incubado com o mesmo meio de cultura e encontraram três tipos de surfactina com diferentes porções peptídicas. A primeira delas foi uma surfactina com a sequência de aminoácido N-Asp-Leu-Leu-Val-Glu-Leu-Leu-C; a segunda, N-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu-C e o terceiro tipo de surfactina identificado apresentou uma cadeia peptídica metil esterificada. Os ácidos graxos dessas surfactinas foram diversos, incluindo ácidos graxos β -hidróxi iso C₁₂, iso C₁₃, anteiso C₁₃, iso C₁₄, iso C₁₅, anteiso C₁₅, n C₁₅, anteiso C₁₆, e anteiso C₁₇.

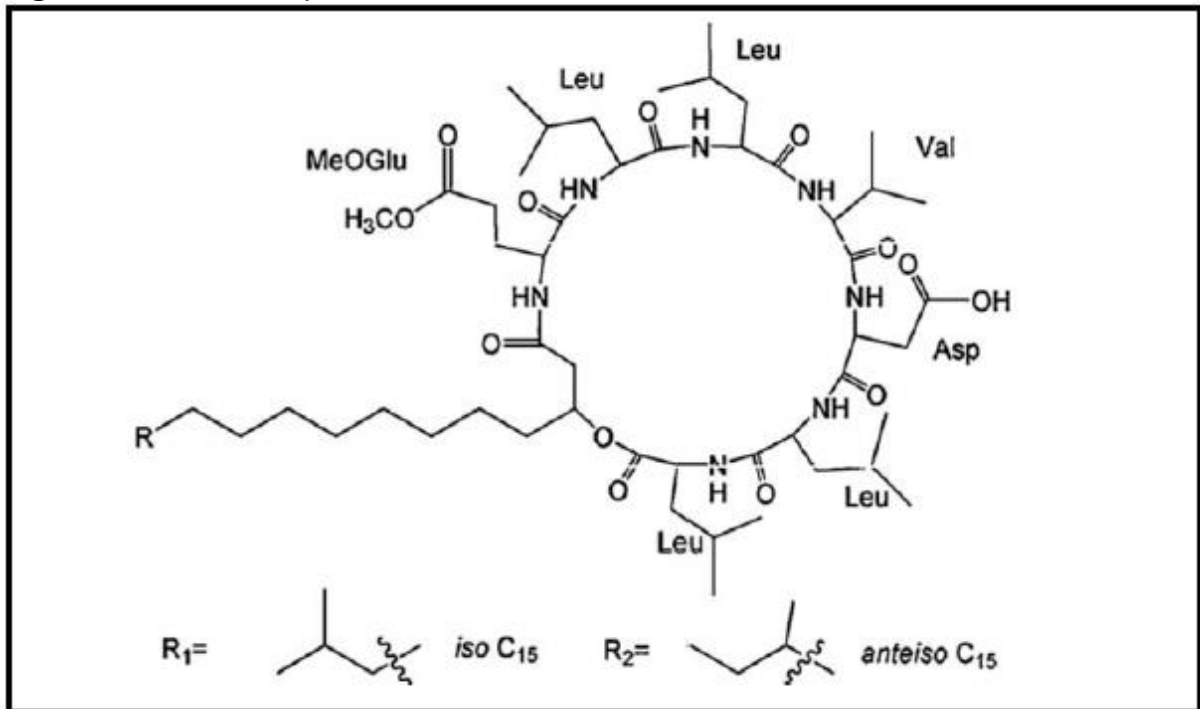
Ao empregar a linhagem de *B. subtilis* HSO121, Liu, Yang e Mu (2008) isolaram e identificaram uma nova molécula de surfactina, o lipopeptídeo C12, que possui o menor comprimento de cadeia entre os lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis*. Liu, Yang e Mu (2009), ao empregar a mesma linhagem do microrganismo, identificou o C₁₅-surfactina-O-metil éster, que é um tipo de lipopeptídeo esterificado. As porções de ácido graxo do C₁₅-surfactina-O-metil éster foram identificadas como sendo ácidos graxos β -hidróxi iso C₁₅ e anteiso C₁₅. O anel peptídico foi analisado e a sequência de aminoácido de N-Glu(OMe)-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu-C foi identificada. A estrutura do C₁₅-surfactina-O-metil éster está representada na Figura 2.

O *B. subtilis* produziu um total de 44 compostos de surfactinas e seus metil e dimetil ésteres, incluindo a conhecida variante de surfactina com L-Leu, L-Val, ou L-Ile na posição 7 do anel peptídico e variantes desconhecidas com resíduos de leucina na posição 2 e/ou 7 substituída por L-Val and L-Ile (KOWALL et al., 1998).

Yang, Yu e Shen (2015) identificaram 4 isoformas de surfactina produzidas por *B. subtilis* THY-15. As isoformas de surfactina nas frações 1, 2 e 4 tiveram a mesma sequência peptídica de Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu, mas diferentes

cadeias de ácidos graxos iso-C₁₃, C₁₄ e C₁₅, enquanto a isoforma na fração 3 possuía uma sequência peptídica especial de Glu-Val-Leu-Leu-Asp-Leu-Val.

Figura 2 - Estrutura química básica do C₁₅-surfactina-O-metil éster



Fonte: Liu, Yang e Mu (2009)

Segundo Liu et al. (2015), diferentes linhagens bacterianas podem produzir o mesmo composto de surfactina e mesmas linhagens mostram-se capazes de produzir lipopeptídeos pertencentes a diferentes famílias.

3.2.1 Microrganismos Produtores

A síntese de surfactina em *Bacillus subtilis* tem sido amplamente estudada. *B. subtilis* é o microrganismo mais importante na produção de surfactina (SEN et al., 2010; IGLESIAS-FERNÁNDEZ et al., 2015; INÈS; DHOUHA, 2015; WILLENBACHER et al., 2015; GUDIÑA et al., 2015; MARIN et al., 2015; SAKTHIPRIYA; DOBLE; SANGWAI, 2015).

As células de *B. subtilis* são bastonetes, Gram-positivos, naturalmente encontradas em solo e vegetação. Crescem na faixa de temperatura de 25 – 37 °C. Esta bactéria tem desenvolvido uma série de estratégias que permitem sua sobrevivência em condições extremas tais como de estresse ambiental e falta de

alimento (CHEN; JUANG; WEI, 2015).

Alguns autores investigaram a melhoria no rendimento de produção de surfactina, tais como Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011), que utilizaram o *Bacillus subtilis* SPB1, e obtiveram a máxima produção de surfactina em meio contendo 40 g L⁻¹ de glicose como fonte de carbono, 5 g L⁻¹ de uréia como fonte de nitrogênio orgânico e aplicando uma razão C/N de 7 com cloreto de amônio como fonte de nitrogênio inorgânico e 2 % de querosene, alcançando 4,920 g L⁻¹ de surfactina. Enquanto Willenbacher et al. (2015) constataram o melhor rendimento avaliando os efeitos de diferentes concentrações de glicose, seguida da introdução de um agente quelante e fonte de nitrogênio. A utilização de 8 g L⁻¹ de glicose, 0,008 mM de citrato de sódio e 50 mM de (NH₄)₂SO₄ elevaram a produção de surfactina de 0,700 a 1,100 g L⁻¹ durante os experimentos em frascos de agitação aplicando a linhagem de *Bacillus subtilis* DSM10.

Outros autores avaliaram a produção de surfactina ao empregar o glicerol como fonte de carbono. Faria et al. (2011) utilizaram o *Bacillus subtilis* LSFM-05 para produzir surfactina, utilizando glicerol bruto obtido do biodiesel como única fonte de carbono. A produção de surfactina foi realizada em um fermentador de bancada de 15 L e a surfactina foi obtida a partir da espuma produzida, sendo que a produtividade da surfactina purificada foi de 0,230 g de surfactina por litro de espuma coletada. Sousa et al. (2012) empregaram as cepas de *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009, e obtiveram 0,441 g L⁻¹ e 0,267 g L⁻¹ de surfactina, respectivamente. Sousa et al. (2014), ao empregarem o glicerol (2 %, v/v) obtido do processo de produção de biodiesel como a principal fonte de carbono para a produção de surfactina pelo *Bacillus subtilis* ATCC 6633, tiveram como resultado que após 48 horas de cultivo houve um aumento na produção de surfactina, alcançando uma concentração de 0,158 g L⁻¹ após 72 horas de fermentação.

Outros estudos centraram-se no uso de resíduos como substratos para a produção de surfactina, tais como Nitschke e Pastore (2006), que empregaram a manipueira para a produção de surfactina, e obtiveram 3,000 g L⁻¹ de surfactina usando *Bacillus subtilis* LB5a.

Gudiña et al. (2015) avaliaram a produção de surfactina pelo *Bacillus subtilis* #573 usando milhocina como meio de cultura. Os melhores resultados foram obtidos em um meio de cultura contendo 10 % (v/v) de milhocina, com uma produção de surfactina de aproximadamente 1,300 g L⁻¹. Gurjar e Sengupta (2015), empregaram

o resíduo de arroz como substrato para o crescimento microbiano do *Bacillus subtilis* MTCC 2423 por FS para produzir surfactina, obtendo um rendimento de 4,170 g kg⁻¹ de resíduo. Ramírez et al. (2015) avaliaram a produção de surfactina pelo *Bacillus subtilis* N1, utilizando resíduos moídos da azeitona como única fonte de carbono e obtiveram concentração máxima de 0,312 g L⁻¹ de surfactina com 2 % m/v do substrato no meio.

Outros autores utilizaram diferentes cepas de *Bacillus subtilis* para a produção de surfactina, dentre eles Loiseau et al. (2015), os quais obtiveram surfactina ao empregar a cepa de *Bacillus subtilis* AM1, enquanto Hsieh et al. (2004) ao empregaram o *B. subtilis* ATCC 21332 e *B. subtilis* S15, obtiveram como resultado o acúmulo de 0,110 g L⁻¹ e 0,126 g L⁻¹ de surfactina, respectivamente. A Tabela 1 apresenta demais cepas de *B. subtilis* empregadas para a obtenção de surfactina.

Tabela 1 - Diferentes cepas de *Bacillus subtilis* produtoras de surfactina

Cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	Referência
ATCC 21332	(CHEN; CHEN; JUANG, 2008)
G2, C3, C6, H4, F1, I7, E3, F9, J3 e E5	(COMPAORÉ et al., 2013)
MI113	(OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M., 1992)
RB14	(OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M., 1995)
BBK-1	(ROONGSAWANG et al., 2002)
C4, M1 e G2III	(SABATÉ; AUDISIO, 2013)
DSM 10 ^T , DSM 3256, DSM 3258, DSM 1090, ATCC 21332, LM43a50°C	(WILLENBACHER et al., 2014)

Fonte: o próprio autor (2017)

As diferenças nas propriedades físico-químicas em séries homólogas e isoformas de biossurfactantes podem afetar a aplicação e a efetividade dessas biomoléculas, então é necessário avaliar suas propriedades funcionais, toxicidade e adequação para aplicação industrial (FRANÇA et al., 2015).

A Tabela 2 resume os dados de produção de surfactina referenciados na Tabela 1, acrescidas de novas referências de produção deste biossurfactante a partir de diferentes cepas de *Bacillus subtilis*.

Além do *B. subtilis*, outros microrganismos foram relatados como produtores

de surfactina (Tabela 3).

Tabela 2 - Diferentes cepas de *Bacillus subtilis* produtoras de surfactina, o substrato utilizado e a quantidade de surfactina produzida

Cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	Substrato	Surfactina	Referência
SPB1	Glicose, ureia, cloreto de amônio e querosene	4,920 g L ⁻¹	(GHRIBI; ELLOUZE-CHAABOUNI, 2011)
DSM10	Glicose, Na ₃ trissódico e (NH ₄) ₂ S ₀ ₄	1,100 g L ⁻¹	(WILLENBACHER et al., 2015)
LSFM-05	Glicerol	0,230 g LE ^{-1*}	(FARIA et al., 2011)
ATCC 6633	Glicerol	0,158 g L ⁻¹	(SOUSA et al. (2014)
LAMI005 LAMI009	Glicerol	0,441 g L ⁻¹ 0,267 g L ⁻¹	(SOUSA et al., 2012)
LB5a	Manipueira	3,000 g L ⁻¹	(NITSCHKE; PASTORE, 2006)
#573	Milhocina	1,300	(GUDIÑA et al. (2015)
MTCC 2423	Resíduo de arroz	4,170 g kgR ^{-1*}	(GURJAR; SENGUPTA, 2015)
N1	Resíduos moídos da azeitona	0,312 g L ⁻¹	(RAMÍREZ et al., 2015)
ATCC 21332 S15	Não informado	0,110 g L ⁻¹ 0,126 g L ⁻¹	(HSIEH et al., 2004)
ATCC21332	Turfa hidrolisada	7,700 g L ⁻¹	(SHEPPARD; MULLIGAN, 1987)
BS5	Melaços	1,100 g L ⁻¹	(ABDEL-MAWGOUD; ABOULWafa; HASSOUNA, 2008a)
MTCC 2423	Glicose Resíduo de óleo de girassol Resíduo de óleo de farelo de arroz	2,100 g gs ^{-1*} 1,490 g gs ^{-1*} 1,100 g gs ^{-1*}	(VEDARAMAN; VENKATESH, 2011)
BS-37	Meio LB Meio de glicose	0,413 g L ⁻¹ 0,585 g L ⁻¹	(LIU et al., 2015)

Fonte: o próprio autor (2017)

g LE^{-1*}: gramas por litro de espuma; **g KgR^{-1*}:** grama por kilograma de resíduo; **gs^{-1*}:** grama por grama de substrato

Tabela 3 - Microrganismos produtores de surfactina

Microrganismo	IE₂₄[*] (%)	T.S.[*] (mN m⁻¹)	Surfactina (g L⁻¹)	Referência
<i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 448	82	27,0	3,300	(SLIVINSKI, 2012)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> TSBSO 3.8	63	28,5	N.I.*	(ALVAREZ et al., 2015)
<i>Bacillus mojavensis</i> B0621A	N.I.*	N.I.*	0,225	(MA; HU, 2015)
<i>Virgibacillus salarius</i>	80	30,0	2,800	(ELAZZAZY; ABDELMONEIM; ALMAGHRABI, 2015)
<i>Bacillus sp.</i> BMN 14 e BMN 27	N.I.*	27,2 34,3	1,830 0,625	(HERYANI; PUTRA, 2017)

Fonte: o próprio autor (2017)

IE₂₄^{*}: Índice de Emulsificação com 24 horas; **T.S.^{*}:** Tensão Superficial; **N.I.^{*}:** não informado

3.2.2 Aplicações

3.2.2.1 Aplicações terapêuticas

Aplicações terapêuticas da surfactina são antimicoplasma, antibacteriana e antiviral, anti-adesiva e antitumoral, e são descritas a seguir.

Mycoplasma é um gênero de bactérias da família Mycoplasmataceae que causa inflamação respiratória e doenças do trato urogenital. Antibióticos são ineficazes no tratamento dessas infecções pois não podem penetrar sua membrana citoplasmática. Vollenbroich et al. (1997) revelaram que esta bactéria poderia ser tratada e completamente desintegrada pela surfactina.

Kracht et al. (1999) revelaram que a surfactina (C₁₅) com carga negativa exibiu a atividade antiviral mais forte. A função da efetividade da surfactina é atribuída a sua habilidade em formar canais condutores de íons em membranas de bicamada lipídica bacterianas através da sua ação do tipo detergente (HOSONO; SUZUKI, 1983; HEERKLOTZ; SEELIG, 2001; HEERKLOTZ, WIEPRECHT; SEELIG, 2004; HEERKLOTZ; SEELIG, 2007). Esta ação detergente torna a surfactina um potente inibidor da enzima adenosina 3, 5-monofosfato fosfodiesterase cíclica, facilitando a ação quelante dos grupos carboxil livres do ácido glutâmico e resíduos

de ácido aspártico da surfactina (CHEN; JUANG, 2008).

A surfactina de *B. subtilis* possui atividade antibiótica mais potente (PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999) e aquela obtida de *B. licheniformis* inibe a germinação de *Mycoplasma grisea* (TENDULKAR et al., 2007). Bechard et al. (1998) demonstraram que o lipopeptídeo de *B. subtilis* possuía um largo espectro de atividade contra bactérias Gram-negativas e pequena atividade contra microrganismos Gram-positivos. Levando em conta a natureza anfipática da surfactina, acredita-se que as atividades mencionadas são uma direta consequência da interação do lipopeptídeo com sua membrana alvo e da alteração das propriedades da bicamada lipídica (LIU et al., 2015).

As características estruturais anfipáticas da surfactina possibilitam a sua interação com membranas celulares em macromoléculas, tais como enzimas e lipopolissacarídeos (LPSs) (CHANG et al., 2011).

Muitos investigadores tem estabelecido que a surfactina inibe o efeito inflamatório da interação direta de LPS com as células (KIM et al., 1998; DAE et al., 2006; SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007; SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008). Pode também inibir a expressão induzida por LPS da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS). Além disso, reduz os níveis de endotoxinas no plasma, fator de necrose tumoral em ratos que tem sofrido choque séptico e também suprime a interação do lipídio A com LBP (proteína de ligação ao lipopolissacarídeo) (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008).

O biosurfactante possui propriedades anti-adesivas que inibem a produção de biofilme e a adesão de bactérias em locais de infecção (MIRELES II; TOGUCHI; HARSHEY, 2001; SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008; SEN et al., 2010). A surfactina inibe a formação de biofilmes pela *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008). Este efeito pode ter aplicações biomédicas, particularmente em dispositivos cirúrgicos e implantes.

A atividade antitumoral da surfactina tem sido associada com a natureza hidrofóbica do ácido graxo que interage com a cadeia acil do fosfolipídio ligado à membrana. Simultaneamente, suas frações peptídicas interagem fortemente com as cabeças polares dos lipídeos de membrana em células cancerosas. A surfactina, tendo uma longa cadeia de ácido graxo, penetra mais eficientemente em membranas de células cancerosas.

Liu et al. (2010) constataram que a surfactina causou inibição das vias de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt) e proteína quinase ativada (MAPK) em células MCF-7. Ela também reduziu a insaturação da composição de ácido graxo na membrana da célula que conduz a apoptose celular em células de câncer de mama Bcap-37.

A surfactina purificada do *Bacillus subtilis natto* foi relatada pela primeira vez por possuir efeitos antitumorais em células do carcinoma de Ehrlich e a surfactina purificada a partir da linhagem TK-1 inibiu células do câncer de mama MCF-7. A surfactina causou indução de apoptose e o círculo celular parou na fase G₂/M em células de câncer de mama MCF-7 como um resultado da clivagem da caspase-3 em células MCF-7 (CAO et al., 2009a).

Isso foi confirmado pelo uso de inibidores de caspase ZVAD-fmk e Z-DEVC-fmk que revertem o efeito da apoptose induzida por surfactina em células MCF-7. Caspases são um grupo de proteases baseadas em cisteína. A ativação sequencial de caspases apresenta uma parte crucial em eventos de apoptoses ou morte celular programada (RAJPUT et al., 2013).

Cao et al. (2009b) demonstraram que a surfactina causou acúmulo intracelular de Ca²⁺, o qual possui papel crucial na indução de apoptose em células MCF-7. Os autores também relataram que a surfactina provoca mudanças na expressão de várias proteínas reguladoras do ciclo celular. A p53 é uma proteína que induz a apoptose e a parada do ciclo celular através da ativação de outra proteína, p21. Foi relatada também como indutora da parada do ciclo celular na fase G₂/M pelo aumento da expressão de p53 e p21 e pelo aumento da expressão de ciclina B1 e p34^{cdc2}.

Kim et al. (2007) relataram o efeito da surfactina na proliferação de células LoVo causadoras de carcinomas no cólon. Ela fortemente bloqueou a proliferação destas células através da indução de atividade pro-ap e parada do ciclo celular.

A propriedade anticâncer da surfactina foi devida à fragmentação de DNA, clivagem de PARP, ativação de caspase-3 e expressão alterada de muitas proteínas com o p21^{WAF1/Cip1}, p53, quinase dependente de ciclina (CDK)2 e ciclina E. A atividade antiproliferativa da surfactina também foi mediada pela inibição da proteína cinase regulada por sinais extracelulares (ERK) e PI3K/Akt (KIM et al., 2007).

3.2.2.2 Aplicações ambientais

As atividades de superfície e emulsificação da surfactina a conduz a aplicações ambientais, tais como biorremediação e melhoramento em recuperação de petróleo (CHEN; JUANG 2008).

A recuperação microbiológica avançada de petróleo – do inglês MEOR (Microbial enhanced oil recovery) – é considerada uma tecnologia de recuperação de petróleo terciária que usa microrganismos e seus metabólitos para mobilizar petróleo residual em reserva de petróleo, o qual está preso nos poros de rochas por força capilar (KHIRE, 2010). Possuindo vantagens extremamente eficazes, incluindo baixa toxicidade, maior biodegradabilidade e efetividade em temperaturas, salinidade e condições de pH extremas, bem como alta atividade interfacial aliada a baixa CMC, a surfactina é um candidato bastante promissor em MEOR (BANAT et al., 2010).

As surfactinas podem manter atividade sob condições severas e recuperar petróleo preso a areia. Al-wahaibi et al. (2014) relataram que a surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis* B30 se mostrou estável dentro de ampla faixa de temperatura, de 50 – 80 °C, de pH, de 6 – 12, e de salinidade, com até 5 % de NaCl. A surfactina obtida elevou a recuperação de petróleo leve e pesado em 17 – 26 % e 31 %, respectivamente.

Schaller et al. (2004) usaram a surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis* ATCC 21332 para verificar o efeito de alterar a concentração de NaCl de 0 – 10 %, o pH de 3 – 10 e a temperatura de 21 – 70 °C na atividade da surfactiva, medida pelas reduções na tensão superficial. Os autores concluíram que cada um desses parâmetros, assim como a combinação deles, resultaram em mudanças discretas na atividade da surfactina, indicando que a surfactina estudada deve ser explorada como um agente em MEOR.

Makkar e Cameotra (1999) observaram que a surfactina produzida por *B. subtilis* em altas temperaturas apresentou CMC de 35, 90 % de Índice de Emulsificação (IE₂₄) com óleo diesel e recuperou 62 % do petróleo retido em areia. Estes resultados mostram que a surfactina produzida por diferentes microrganismos são estáveis frente a diferentes condições e apresentam potencial em MEOR, ao forçarem o deslocamento e facilitarem o transporte do óleo das formações geológicas.

Derramamentos de petróleo nos ambientes marinhos são uma das maiores

causas de poluição. Devido a toxicidade e persistência, surfactantes sintetizados quimicamente não são favorecidos como agentes de remediação (LIU et al, 2015). Vários biossurfactantes apresentam sucesso em biorremediação, dentre eles a surfactina (ROSENBERG; RON, 1999; BARROS; DE QUADROS; PASTORE, 2008).

Métodos de avaliação da efetividade de descontaminação por biossurfactantes tem sido estabelecidos. A efetividade de dispersão de surfactinas foi avaliada através da medição de CMC e da razão de dispersante/petróleo. Para surfactinas, os valores de CMC em água destilada deionizada foram mais baixos ($0,015 \text{ g L}^{-1}$) que na solução de sal marinho ($0,020 \text{ g L}^{-1}$), o que tem sido parcialmente atribuído às mudanças conformacionais induzidas pela salina em espécies iônicas solvatadas de biossurfactantes. A razão dispersante/petróleo para a surfactina foi 1:96 em água, muito mais alta que aquela com 12 ppt (parte por trilhão) de sal marinho, de 1:30, sugerindo uma redução na eficiência de dispersante de petróleo de surfactante em salina (MARTI et al., 2014).

Sakthipriya, Doble e Sangwai (2015), ao produzir surfactina por uma cepa termofílica de *B. subtilis*, demonstraram o potencial deste lipopetídeo na recuperação avançada de petróleo no combate a derramamento de petróleo.

A surfactina produzida por *B. subtilis* (WHANG et al., 2008; LAI et al., 2009) é eficiente em transportar petróleo. Whang et al. (2008) examinaram a biodegradação de diesel, avaliando dois biossurfactantes, a surfactina e ramnolipídio. Encontraram que $0,04 \text{ g L}^{-1}$ de surfactina promove a produção de biomassa e biodegradação de diesel para mais que o dobro daquelas alcançadas em experimentos em batelada sem adição de surfactina.

A surfactina reportada por Lai et al. (2009) acelera a biodegradação de hidrocarbonetos. Os autores observaram que dois biossurfactantes (ramnolipídio e surfactina) podem remover Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH) do solo e compararam sua efetividade com surfactantes sintéticos. Seus resultados indicaram que os ramnolipídios e a surfactina exibiram eficiência de remoção de 63 % e 62 % de TPH em solo contaminado com $9.000 \text{ mg TPH kg}^{-1}$ de solo seco, respectivamente. Estes resultados foram superiores à eficiência de remoção de petróleo por surfactantes sintéticos.

A atividade de biocontrole exercida pela surfactina compreende outra das aplicações ambientais deste biossurfactante, o qual exhibe principalmente atividade bactericida e age de modo a desestabilizar a membrana fosfolipídica do fitopatógeno

alvo, resultando em lise da célula. O mecanismo de lise celular sugere que a surfactina será efetiva contra um amplo espectro de fitopatógenos, incluindo aqueles que tem desenvolvido uma resistência a agentes antimicrobianos específicos.

Debois et al. (2015) mostraram que a imunidade induzida por surfactina prepara a planta para resistir melhor ao ingresso do patógeno e envolve apenas expressão limitada de eventos moleculares relacionados à defesa e não provoca inibição de crescimento das mudas.

Cawoy et al. (2014) mostraram que linhagens de *Bacillus* associadas a plantas produzem resistência sistêmica no hospedeiro, por exemplo, surfactina, a qual contribui ao seu efeito protetivo contra fitopatógenos. Os resultados destes relatos mostraram que a surfactina é efetiva a específicos patógenos, eficaz em uma ampla gama de ambientes físicos e químicos. A Tabela 4 apresenta aplicações terapêuticas e ambientais da surfactina.

Tabela 4 - Aplicações terapêuticas e ambientais da surfactina

Terapêuticas	Mecanismos	Referências
Antimicoplasma	Induz a formação de canais iônicos em membranas de bicamada lipídica	(VOLLENBROICH et al., 1997)
Antiviral		(KRACHT et al., 1999)
Antibacteriana		(SHEPPARD et al., 1991)
		(HEERKLOTZ; SEELIG 2001)
		(HEERKLOTZ, WIEPRECHT; SEELIG, 2004)
Antiinflamatória	Inibição da fosfolipase citosólica plaquetária	(HEERKLOTZ; SEELIG, 2007)
Antiadesiva		(HOSONO; SUZUKI, 1983)
		(CHANG et al., 2011)
		(SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008)
		(SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007)
	(KIM et al., 1998)	
	(DAE et al., 2006)	
	(SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008)	
	(MIRELES II; TOGUCHI; HARSHEY, 2001)	
	(SEN, 2010)	
Ambiental	Mecanismos	Referências
Biorremediação ambiental	Atividades de superfície e emulsificantes	(MULLIGAN, 2009)
Biodegradação de hidrocarbonetos		(WHANG et al., 2008)
		(MULLIGAN, 2009)
Biocontrole		(LAI, et al., 2009)
		(DEBOIS et al., 2015)
	(CAWOY et al., 2014)	

Fonte: Adaptado de Chen; Juang e Wei (2015)

3.3 PRODUÇÃO DE SURFACTINA

Para elucidar o processo pelo qual os microrganismos produzem surfactina, esta seção apresenta vários aspectos da produção de surfactina, incluindo as condições de cultivo e composição dos meios utilizados

3.3.1 Fatores que Influenciam a Produção

As condições de cultivo pH, temperatura, concentrações de oxigênio dissolvido e grau de aeração afetam a produção de biossurfactante por ter relação com o crescimento celular. A surfactina é secretada em grande quantidade a temperaturas de 25 °C a 37 °C (SEM; SWAMINATHAN, 2005; YEH; WEI; CHANG, 2005; ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008a). Investigações mostraram que a temperatura afeta a composição do biossurfactante gerado. Sen e Swaminathan (2005) verificaram que a temperatura ótima para a produção de surfactina pelo *B. subtilis* DSM 3256 é de 37,4 °C. Haddad, Wang e Mu (2009) mostraram que várias espécies de *Bacillus* produziram surfactina a temperaturas acima de 40 °C sem nenhum efeito em sua função de superfície.

A eficiência do oxigênio dissolvido e a transferência de massa afetam a produção de surfactina em *B. subtilis* (YEH; WEI; CHANG, 2005; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010). Um sistema de monitoramento de atividade de respiração foi usado para examinar a influência da taxa de transferência de oxigênio na síntese de lipopeptídeo por *B. subtilis* ATCC6633. Os resultados experimentais obtidos revelaram que a regulação de oxigênio atuou em diferentes níveis, sugerindo um sistema complexo para regulação da síntese de lipopeptídeo NRPS em linhagens naturais de *B. subtilis* ATCC6633 (GUEZ et al., 2008).

Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011) encontraram que em meio saturado com 30 % de oxigênio dissolvido, a produção de surfactina pelo *Bacillus subtilis* SPB1 atingiu 4,92 g L⁻¹. Yeh, Wei e Chang (2005) e Fonseca et al. (2007) mostraram que o aumento da concentração de oxigênio dissolvido através da agitação rápida influenciou positivamente a produção de surfactina por *B. subtilis*.

A velocidade de agitação também afetou a produção, de modo que o melhor rendimento foi obtido em uma velocidade de agitação de 200 rpm a 250 rpm (YEH; WEI; CHANG, 2005). Porém, velocidades de agitação superior a 350 rpm reduziu a

produção de surfactina por *B. subtilis* pelo acúmulo de espuma (SHALIGRAM; SINGHAL, 2010).

O acúmulo de espuma é outro fator crítico que afeta a produção de surfactina e seu efeito está relacionado a aeração (SHALIGRAM; SINGHAL, 2010). Yeh, Wei e Chang (2005) mostraram que uma velocidade superior a 250 rpm resultou em acúmulo de espuma e diminuiu a transferência de oxigênio e de rendimento de surfactina. O acúmulo de espuma reduz a biomassa e a produção de biossurfactante pela redução do período de fermentação (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999).

O coeficiente volumétrico de transferência de massa, kLa , afeta a produção de biossurfactante significativamente. Quatro principais parâmetros teriam influência em valores de kLa , por exemplo, velocidades superficial do líquido e gás, tensão superficial do meio líquido e presença de partículas sólidas (CHEN; JUANG; WEI, 2015).

Fahim et al. (2013) utilizaram biorreator trifásico de fase reversa de leito fluidizado para discutir o efeito do kLa na produção de surfactina pelo *B. subtilis*. A transferência de oxigênio aumentou de 175 % e de 24 % com o aumento das velocidades superficial do gás e do líquido, respectivamente. A transferência de oxigênio obtida no biorreator trifásico de fase reversa de leito fluidizado foi maior que aquela que ocorreu nos outros biorreatores usados para produção de biossurfactante, portanto, uma diminuição significativa de kLa (até 27 %) foi medida durante o processo de fermentação. Foi mostrado que essa diminuição de kLa foi resultado da diminuição da tensão superficial devido a produção de biossurfactantes, porém, a transferência de oxigênio permitiu um fornecimento adequado de oxigênio às linhagens de *B. subtilis* aeróbicas.

A condição do pH afeta de maneira substancial a produção de surfactina em *B. subtilis* (YEH; WEI; CHANG, 2005; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010). Sen e Swaminathan (2005) empregaram o *B. subtilis* DSM3256 e estudaram os efeitos das condições do processo de fermentação pH, temperatura, taxa de agitação e grau de aeração na produção de surfactina, usando Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Seus resultados revelaram que 37,4 °C, pH de 6,75, taxa de agitação de 140 rpm e grau de aeração de 0,75 vvm maximizaram a produção de surfactina, atingindo produção de 1,1 g L⁻¹.

Outras condições de cultivo, como tamanho e idade do inóculo, também

influenciam na produção de biossurfactantes. Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011) mostraram que uma D.O.₆₀₀ (densidade óptica em 600 nm) inicial inferior ou superior a 0,15 resultou em baixa produção de surfactina, sendo que a produção de biossurfactantes foi otimizada pelo cultivo do *B. subtilis* SPB1 com D.O.₆₀₀ inicial de 0,15. Este resultado revelou que a idade e tamanho do inóculo estão positivamente correlacionados com a produção de surfactina por afetar o período da fase lag, taxa de crescimento específica, biomassa e esporulação.

3.3.2 Condições Nutricionais

A produção comercial de surfactina geralmente depende de substratos caros (AL-AJLANI et al., 2007). Arima, Kakinuma e Tamura (1968) mostraram que o meio complexo, tais como LB (Luria Bertani) e caldo nutriente, renderam apenas 0,1 g L⁻¹ de produção de surfactina, o que é um valor baixo quando comparado a outros valores da literatura.

Al-Ajlani et al. (2007) testaram uma série de meios, incluindo os meios definido, semi-definido e complexo na produção de surfactina. Seus resultados experimentais revelaram que o meio complexo sem qualquer suplemento proporcionou rendimentos relativamente baixos (0,2 g L⁻¹) em relação a outros valores verificados na literatura.

A razão carbono/nitrogênio influencia a produção de surfactina. Fonseca et al. (2007) e Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011) aumentaram a produção de surfactina através do ajuste da razão carbono/nitrogênio e encontraram que a razão carbono/nitrogênio acima de sete reduz a quantidade de biossurfactantes que foram sintetizados pelo *B. subtilis*.

Elazzazy, Abdelmoneim e Almaghrabi (2015) avaliaram a influência da razão carbono/nitrogênio usando uma ampla faixa de razão C/N (10:1 – 70:1) com óleo de fritura e uréia como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, na produção de surfactina pelo *Virgibacillus salarius*. A máxima atividade emulsificante (85 %) e a mínima tensão superficial (29 mN m⁻¹) foram atingidas a uma razão C/N de 30:1. Aumento na razão C/N não apresentou efeito na produção de surfactina ou biomassa pelo *Virgibacillus salarius*.

A importância da glicose e suas concentrações na produção de surfactina foi estudada por Yeh, Wei e Chang (2005). O *B. subtilis* ATCC 21332 foi crescido em

meio líquido contendo 40 g L^{-1} de glicose com adição de 133 g L^{-1} de carvão ativado. Um declínio na concentração de surfactina foi observado após depleção de glicose, de forma que as células podem ter utilizado a surfactina como fonte de carbono para seus crescimentos. Isto indicou que a fermentação em batelada para produção de surfactina pode ser finalizada em tempo apropriado, de modo a evitar a utilização de surfactina como uma fonte de carbono e também sugeriu que o fornecimento de glicose é crítico, já que ela age como uma fonte principal de carbono. Concentrações mais altas de glicose ($50 - 60 \text{ g L}^{-1}$) levou ao acúmulo de glicose no meio, causando diminuição do pH e uma diminuição resultante na produção de surfactina. Isto mostrou que a regulação do pH é importante na produção de surfactina. O pH ótimo para a produção foi na faixa de 6,3 a 6,7.

Whang et al. (2008) estudou a biodegradabilidade de diesel, onde surfactina e ramnolípido foram avaliados. A surfactina ($0,04 \text{ g L}^{-1}$) foi capaz de elevar a produção de biomassa e biodegradação de diesel em mais que o dobro comparado aos experimentos em batelada sem adição de surfactina. A natureza do nutriente limitante de crescimento é também importante para a produção otimizada de muitos metabólitos secundários.

Davis, Lynch e Varley (1999) relataram o efeito das limitações de carbono e nitrogênio, em condições aeróbicas e deficientes de oxigênio. A cultura usada foi o *B. subtilis* ATCC 21332 em meio suplementado com glicose, nitrato de amônio e sulfato ferroso. A produção de surfactina foi maior em meio definido com nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. Isso foi devido à utilização de nitrato, resultando em crescimento limitado por nitrato. A utilização do nitrato ocorreu em dois casos, tanto sob condições de crescimento aeróbica, ou quando houve depleção de amônia. Baixos rendimentos de surfactina resultaram em culturas sem nenhuma utilização de nitrato e tais culturas tiveram baixa quantidade de carbono, ou continham apenas amônia, mas sem nitrato. Propôs-se que o nitrato age como acceptor de elétron terminal sob condições anaeróbicas. O nitrato foi usado mesmo quando a amônia estava presente na cultura. Durante o crescimento aeróbico, o íon amônio foi utilizado preferencialmente sobre o nitrato. O estudo indicou que através da implementação da abordagem de batelada alimentada e fornecimento de amônia durante a fase de crescimento e nitrato na alimentação, a utilização de nitrato pode ser prolongada e a produção de surfactina aumentada.

3.3.2.1 Fontes de carbono

Fontes de carbono, como glicose, manitol e sacarose tem sido utilizadas na produção de biossurfactantes e, dentre eles, a surfactina. Al-Ajlani et al. (2007) testaram uma série de meios baseados em carboidratos com *B. subtilis* MZ-7, incluindo a glicose, sacarose e manitol. Os resultados experimentais revelaram que a sacarose foi a fonte de carbono ótima, já que ela possibilitou a máxima produção de surfactina pelo *B. subtilis*. Yeh, Wei e Chang (2005) realizaram um estudo com glicose como fonte de carbono e revelaram que altas concentrações de glicose (50 – 60 g L⁻¹) podem resultar no acúmulo de glicose no meio de cultivo, levando a um baixo pH e correspondente queda na produção de surfactina.

Outras fontes de carbono como glicose, sacarose, amido e glicerol foram testados para a produção de surfactina pelo *B. subtilis* SPB1, que foi capaz de usar todos estes substratos, mas o uso de glicose como fonte de carbono para produzir surfactina foi mais eficaz (GHRIBI; ELLOUZE-CHAABOUNI, 2011).

Elazzazy, Abdelmoneim e Almaghrabi (2015) empregaram a bactéria *Virgibacillus salarius* que produziu um biossurfactante similar à surfactina e avaliaram os efeitos de vários óleos comestíveis (óleo de canola, óleo de algodão e resíduo de fritura de óleo de girassol) e não comestíveis (óleo de jatropha, óleo rícino, e óleo de jojoba) derivados de plantas como fontes de carboidratos. O resíduo de fritura de óleo de girassol foi a melhor fonte de carbono para síntese de biossurfactantes.

3.3.2.2 Fontes de nitrogênio

As fontes de nitrogênio que são usualmente usadas em produção de surfactina são classificadas em orgânicas (incluindo uréia, triptona, digerido pancreático de caseína, hidrolisado de caseína, extrato de carne e extrato de levedura) ou inorgânicas (incluindo NH₄Cl, NaNO₃, e (NH₄)₂SO₄). Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Hassouna (2008a) testaram fontes de nitrogênio, incluindo fontes orgânicas (oxalato de amônio, uréia, extrato de levedura, peptona, triptona e milhocina) e fontes inorgânicas (nitrato de sódio, nitrato de potássio, nitrato de amônio, cloreto de amônio, brometo de amônio, carbonato de amônio e sulfato de amônio). Os resultados dos experimentos revelaram que o nitrato de sódio produziu

a maior quantidade de surfactina que qualquer outra fonte, tanto orgânica quanto inorgânica.

Elazzazy, Abdelmoneim e Almaghrabi (2015) avaliaram diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de amônio, nitrato de sódio, cloreto de amônio, sulfato de amônio, fenilalanina, extrato de malte e uréia) para a produção de surfactina pela bactéria *Virgibacillus salarius*. Os resultados obtidos indicaram que uréia e nitrato de amônio foram as fontes de nitrogênio mais eficientes para produção de surfactina. Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011) avaliaram o efeito das fontes de nitrogênio, incluindo uréia, digerido pancreático de caseína, extrato de carne, extrato de levedura e hidrolisado de caseína, na produção de surfactina. Os resultados mostraram que a produção mais elevada de surfactina ($0,72 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida quando do uso de uréia como fonte de nitrogênio orgânica.

3.3.2.3 Elementos traços

Quatro elementos traços Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} e Fe^{2+} são particularmente úteis na biossíntese de surfactina por *B. subtilis*. Os elementos traços podem afetar a biossíntese de surfactina por sua atuação como cofatores principais em sistemas multi enzimáticos que estão envolvidos na via de biossintética da surfactina (CHEN; JUANG; WEI, 2015).

Wei, Lai e Chang (2007) encontraram os elementos traços, Mg^{2+} , K^+ , Fe^{2+} e Mn^{2+} são fatores significativos na produção de surfactina pelo *B. subtilis* ATCC 21332. Na ausência de Mg^{2+} ou K^+ , o rendimento da produção de surfactina diminuiu para $0,4 \text{ g L}^{-1}$, o que foi apenas 25 % do valor obtido do controle. Quando Mn^{2+} e Fe^{2+} estiveram ausentes, o rendimento de produção de surfactina caiu para $0,6 \text{ g L}^{-1}$, aproximadamente um terço do valor do controle. Porém, quando apenas um dos dois íons metálicos (Fe^{2+} ou Mn^{2+}) estiveram ausentes, o *B. subtilis* ATCC 21332 permaneceu acima de 80 % produtividade original de surfactina. Foi aplicado, então, o método estatístico de Taguchi para revelar os efeitos interativos de Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Fe^{2+} na produção de surfactina. Os resultados mostram que a interação de Mg^{2+} e K^+ atingiu um nível significativo.

A otimização das concentrações de Mg^{2+} e K^+ no meio aumentou a produção de surfactina para $3,34 \text{ g L}^{-1}$, aproximadamente o dobro do rendimento obtido do controle original. Cooper et al. (1981) tentaram melhorar os rendimentos de

fermentação com adição de elementos traços FeSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaNO_3 , ZrOCl_2 , ZnSO_4 , CuSO_4 , NiSO_4 e CoSO_4 . Destes, o FeSO_4 e o MnSO_4 demonstraram efeito significativo tanto na produção de surfactina quanto na biomassa, enquanto MgSO_4 , CaCl_2 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaNO_3 e ZrOCl_2 não apresentaram influência na produção. Já os ZnSO_4 , CuSO_4 , NiSO_4 e CoSO_4 inibiram o crescimento do *B. subtilis*.

Gudiña et al. (2015) empregaram o *Bacillus subtilis* #573 para a produção de surfactina usando milhocina como substrato e avaliaram o efeito de diferentes metais (ferro, manganésio e manganês) na produção de surfactina. Todos os metais testados aumentaram a produção de surfactina (até $4,1 \text{ g L}^{-1}$, $4,4 \text{ g L}^{-1}$ e $3,5 \text{ g L}^{-1}$ para ferro, magnésio e manganês, respectivamente). Os melhores resultados foram obtidos em meio de cultura consistindo de 10 % (v/v) de milhocina, com produção de surfactina de $1,3 \text{ g L}^{-1}$. Quando o meio de cultura foi suplementado com concentração ótima dos três metais simultaneamente, a produção de surfactina foi aumentada para $4,8 \text{ g L}^{-1}$.

3.3.3 Utilização de Substratos Complexos

3.3.3.1 Tipos de substratos

A adição de hidrocarbonetos ao meio de cultura aumenta a produção de biossurfactantes, pois os biossurfactantes auxiliam na degradação de compostos aromáticos como fontes de nutrientes (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008a).

Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011) adicionaram diferentes óleos (azeite de oliva, óleo de girassol, óleo de milho) e hidrocarbonetos (parafina, querosene, óleo diesel, benzeno, e heptano) para melhorar a produção de biossurfactantes pelo *B. subtilis* SPB1. A produção mais significativa foi obtida usando o querosene, de $1,74 \text{ g L}^{-1}$. Os autores também estudaram o efeito de diferentes óleos e hidrocarbonetos (óleo de soja, azeite de oliva, hexadecano e óleo de parafina) na produção de surfactina. Diferentes autores encontraram que óleos vegetais e hidrocarbonetos tiveram efeito inibitório na produção de surfactina. A Tabela 5 indica um resumo dos resultados obtidos nos estudos citados.

Tabela 5 - Óleos e hidrocarbonetos acrescidos em Meios de Sais Minerais para a produção de surfactina por cepas de *Bacillus subtilis*

Microrganismo	Fonte de carbono	Surfactina (g L ⁻¹)	Referência
	2 % óleo de girassol	0,38	(ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFSA; HASSOUNA, 2008a)
	2 % azeite de oliva	0,31	
	2 % glicerol	0,25	
	2 % hexadecano	0,37	
	2 % óleo de parafina	0,37	
<i>B. subtilis</i>	2 % azeite de oliva	1,00	(GHRIBI; ELLOUZE-CHAABOUNI, 2011)
	2% óleo de milho	1,10	
	2 % óleo de girassol	1,10	
	2 % querosene	1,74	
	2 % parafina	1,30	
	2 % diesel	1,50	
	2 % benzeno	1,00	
	2 % heptano	1,20	

Fonte: Adaptado de Chen; Juang e Wei (2015)

Devido ao fato de aminoácidos como a L-asparagina, D,L-leucina, ácido glutâmico e L-valina fazerem parte da estrutura química da surfactina, acredita-se que estes aminoácidos sejam nutrientes na produção de surfactina por *B. subtilis* (CHEN; JUANG; WEI, 2015).

Porém, no trabalho de Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Hassouna (2008a), ao serem adicionados estes aminoácidos, a produção de surfactina foi baixa. Porém, tais adições não elevaram a produção de surfactina quando eles foram adicionados ao meio que continha sais minerais ou quando foram usados no lugar do nitrato de sódio naquele meio.

Alguns resíduos, tais como águas residuais e restos de alimentos, são usados como substratos na produção de bioprodutos microbianos, de modo a diminuir os custos de produção. A Tabela 6 apresenta um resumo da produção de surfactina, cepas de *Bacillus subtilis* empregadas, substratos utilizados e quantidade de surfactina produzida.

Além do *B. subtilis*, o *B. clausi* BS02 também foi relatado como produtor de surfactina, cultivado em borra de óleo de girassol como substrato, rendendo 2,6 g L⁻¹ de surfactina (HAZRA; KUNDU; CHAUDHARI, 2015).

Além destes substratos (Tabela 6), ainda tem sido relatados usos de diferentes materiais hidrolisados como substrato para obtenção de biossurfactantes por diferentes microrganismos (Tabela 7).

Tabela 6 - Resíduos da agroindústria e outros substratos utilizados na produção de surfactina por *Bacillus*

<i>Bacillus subtilis</i>	Substrato	Surfactina (g L ⁻¹)	Referência
#573	Milhocina	1,300	(GUDIÑA et al., 2015)
LB5a	Manipueira	3,000	(NITSCHKE; PASTORE, 2006)
LB5a		2,600	(BARROS et al., 2007)
ATCC 6633	Glicerol	0,158	(SOUSA et al., 2014)
LSFM-05		0,230	
LAMI005		0,441	(FARIA et al., 2011)
LAMI009		0,267	
N1	Resíduos moídos da azeitona	0,003	(RAMÍREZ et al., 2015)
LAMI008	Suco de caju	0,003	(PONTE ROCHA et al. 2009)
LAMI005	Suco de caju	0,123	(GIRO et al., 2009)
Cepas não informadas	Efluente do processamento de batata	0,900 0,400	(NOAH; BRUHN; BALA, 2005) (THOMPSON; FOX; BALA, 2001)
UCP0999	Farelo de arroz	8,600	(ACIOLY, 2009)
MTCC 2423	Resíduos de Óleo de fritura	0,983	(VEDARAMAN; VENKATESH, 2011)
ATCC 6633	soro de leite em pó desidratado	0,290	(CAGRI-MEHMETOGLU et al., 2012)

Fonte: o próprio autor (2017)

Tabela 7 - Materiais hidrolisados utilizados como substrato para produção de biossurfactantes por diferentes microrganismos

Microrganismo	Hidrolisado	Biossurfactante	Referência
<i>Starmerella bombicola</i> NBRC 10243	Hidrolisado de espiga de milho	Soforolipídeos 49,2 g L ⁻¹	(KONISHI; YOSHIDA; HORIUCHI, 2015)
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Hidrolisado de celulose do sisal	Surfactina Não informado	(MARIN et al., 2015)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Hidrolisado do bagaço de uva	Surfactina 4,80 mg L ⁻¹	(RIVERA et al., 2007)
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Hidrolisado de fibra de milho Hidrolisado de bagaço de sorgo doce	Soforolipídeo 1,00 g L ⁻¹ 3,60 g L ⁻¹	(SAMAD et al., 2015)

Fonte: o próprio autor (2017)

3.4 SOJA E SEUS SUBPRODUTOS PARA A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

A cultura da soja é responsável por uma significativa parcela do agronegócio nacional, possuindo grande importância econômica para o Brasil. Sua produção foi de aproximadamente 86 milhões de toneladas de grãos na safra 2013/2014, destacando-se como um dos mais importantes produtos de exportação do país. O cultivo da soja é realizado em todas as regiões do Brasil, porém, é concentrado principalmente no Centro-Oeste, responsável por 45,6 % da produção brasileira, além do Sul do país, com 34,4 % da produção (AGRIANUAL, 2015).

Durante o processamento da soja há liberação de resíduos e subprodutos que, muitas vezes, não tem utilização e são descartados. Porém, tais materiais podem ser aproveitados, por exemplo, como substratos para a produção de biossurfactantes. Lima (2007) investigou a produção de biossurfactante utilizando culturas de *Pseudomonas aeruginosa* PALC e óleos de soja residual proveniente da fritura de diversos alimentos como fonte de carbono. Os melhores resultados de produção do biossurfactante corresponderam a 22 g L⁻¹ de óleo de soja residual, 5,625 g L⁻¹ de nitrato de amônio e 11,5 g L⁻¹ de levedura cervejeira residual, sendo que a maior concentração obtida de raminose foi de 2,3 g L⁻¹, após 48 horas de fermentação, com índice de emulsão de 100 %. O meio de cultura utilizado para a produção de biossurfactantes era composto de 0,2 g L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 7,0 g L⁻¹ de Na₂HPO₄ e 3,0 g L⁻¹ de KH₂PO₄.

Cha et al. (2008) avaliaram a produção de biossurfactante pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 crescida em óleo de soja acidificado como fonte única de carbono. Uma produção máxima de 5 g L⁻¹ de biossurfactante foi obtida quando com o meio contendo 2 % de óleo de soja acidificado, 0,3 % de NH₄NO₃, 0,03% de KH₂PO₄, 0,03 % de K₂HPO₄, 0,02% de MgSO₄.7H₂O e 0,025 % CaCl₂.2H₂O, com agitação a 200 rpm por período de 100 horas a 30 °C.

Nitschke, Costa e Contiero (2010) utilizaram borra de óleo de soja como fonte alternativa para a produção de ramnolipídeos por *Pseudomonas aeruginosa* LBI. Foi utilizado meio de sais minerais e 2 % (m/v) de óleo de soja. Após 144 horas, a concentração de ramnolipídeo foi de 11,7 g L⁻¹.

Partovi et al. (2013) produziram biossurfactante por fermentação envolvendo a biodegradação dos resíduos do óleo de soja refinado, onde a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* MR01 foi capaz de produzir biossurfactante extracelular

quando cultivada em três resíduos de refinamento de óleo de soja, sendo eles o óleo ácido, destilado da desodorização e borra, em diferentes razões carbono/nitrogênio. O meio de fermentação era composto de 3 g de NaNO_3 , 0,25 g de KH_2PO_4 , 0,25 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,0 g de extrato de levedura e óleo de soja ou um dos resíduos citados. Nos meios contendo óleo de soja, óleo ácido, destilado da desodorização e borra, a concentração máxima obtida de biossurfactante foi de 20 g L^{-1} (C/N = 14); 35 g L^{-1} (C/N = 7,5); 40 g L^{-1} (C/N = 12,5); e 15 g L^{-1} (C/N = 6).

Marti et al. (2015) obtiveram uma variante da surfactina, chamada de Fa-Glu (Fatty-acyl-glutamate), a partir do *Bacillus subtilis* 40688-E4 e utilizando hidrolisado de casca de soja como substrato. O meio utilizado continha (por litro) 2,18 g de KH, 2,18 g de KH_2PO_4 , 14,63 g de K_2HPO_4 , 1,32 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,94 g de ácido glutâmico, 20 g de glicose, 0,73 mg de HCl, 0,49 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 14,7mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 9,9 mg de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0,14mg de ZnCl_2 , 1,35 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,67 mg de tiamina-HCl.

3.5 *BACILLUS AMYLOLIQUEFACIENS* NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTES

Diferentes autores relataram a produção de surfactina pelo *Bacillus amyloliquefaciens*. Papi (2013) empregou o *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b, otimizou a produção e fez caracterização molecular da surfactina produzida pelo microrganismo. As condições ótimas de cultivo foram de temperatura de $36,8^\circ \text{C}$; pH de 8,2; salinidade de 3,4 % (m/V) e concentração de glicose de 1,02 % (m/V). A solução do extrato bruto deste biossurfactante provocou um abaixamento da tensão superficial da água de $69,82 \text{ mN m}^{-1}$ para $29,52 \text{ mN m}^{-1}$, sendo CMC de $220 \text{ mg de surfactina L}^{-1}$. A caracterização molecular determinou uma mistura de isoformas de surfactina no extrato, com a presença de Anteiso- C_{15} , Anteiso- C_{15} [Val 7] e Iso- C_{14} [Val 7], Anteiso C_{15} [Leu 7]-O-metil ester ou Anteiso- C_{16} [Leu 7], e que a Anteiso- C_{15} se encontrava-se em maior proporção. O rendimento do biossurfactante foi de $0,34 \text{ g L}^{-1}$.

Massi (2014) empregou a mesma linhagem de *Bacillus* utilizada por Papi (2013) e produziu um lipopeptídeo semelhante à surfactina, por fermentação em estado sólido (FES), utilizando o farelo de soja e casca de arroz como substrato, e obteve 44 mg gSS^{-1} (miligramas por grama de substrato seco) do lipopeptídeo. Alvarez et al. (2015) avaliaram a produção de surfactina pelo *Bacillus*

amyloliquefaciens TSBSO 3.8. A produção da surfactina ocorreu entre 0,5 % e 7 % de NaCl, com pH que variou de 6 a 9 e temperatura de 28 a 50 °C. O *B. amyloliquefaciens* S13 teve alta produtividade de surfactina, 0,45 g L⁻¹ (HSIEH et al., 2004).

Alvarez et al. (2012) obtiveram surfactina sintetizada pelo *B. amyloliquefaciens* RP23 e MEP218. Abdallah, Frikha-Gargouri, e Tounsi (2015) empregaram o *Bacillus amyloliquefaciens* 32a, que produziu os biossurfactantes surfactina, iturina, fengicina A e fengicina B. Arguelles-Arias et al. (2009) utilizaram o *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 e observaram quatro grupos de genes envolvidos na síntese dos lipopeptídicos cíclicos surfactina, iturina A e fengicina A e B. Chi et al. (2015) empregaram o *Bacillus amyloliquefaciens* R3 para produzir biossurfactantes, que foram identificados como surfactinas (F1, F2, F3, F4 e F5) com aminoácidos (Gli-Leu-Leu-Val-D-Leu-Leu) e ácidos graxos β-hidróxi (de 12 a 15 carbonos na cadeia). O meio utilizado era composto de farinha de soja e farinha de trigo. Após 27 horas de fermentação, foi obtida a concentração de 0,48 mg mL⁻¹ do biossurfactante. Hiradate et al. (2002) obtiveram sete compostos antifúngicos, cujas análises das estruturas químicas por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas de bombardeamento atômico rápido (FAB), revelaram se tratar de iturinas, produzidas por *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2.

Khedher et al. (2015) empregaram o *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 para a produção de lipopeptídeos e policetídeos. A análise em PCR foi usada para identificar os genes potencialmente envolvidos na biossíntese dos lipopeptídeos produzidos. As sequências de DNA obtidas mostraram que o *B. amyloliquefaciens* AG1 abrigava genes envolvidos na síntese de lipopeptídeos incluindo iturina, fengicina, surfactina, e policetídeos principalmente difigidina e macrolactina. Lipopeptídeos cíclicos, identificados como iturina, surfactina e fengicina, foram produzidas pelo *Bacillus amyloliquefaciens* BC32-1 (NAM et al., 2015). Xu et al. (2014) utilizaram o *Bacillus amyloliquefaciens* M1 para a produção de lipopeptídeos, cuja concentração obtida em meio contendo farinha de soja e farinha de trigo foi de 0,28 mg mL⁻¹ após 18 horas de fermentação. O *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 produziu lipopeptídeos identificados como iturina A, fengicina, pumilacidina e surfactina (YAMAMOTO; SHIRAISHI; SUZUKI, 2015). Zhu et al. (2013) utilizaram palha de arroz e farinha de soja como substratos para produzir surfactina em fermentação em estado sólido pelo *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173. A produção

ótima de surfactina foi obtida quando o meio continha 5 g de farinha de soja, 4 g de palha de arroz, 2 % (m/m) de maltose, 2,65 % (m/m) de glicerol e pH 7. Sob condições ótimas, o rendimento de surfactina foi de 15,03 mg gSS⁻¹.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b isolada por Granzotto et al. (2012) a partir de solo contaminado por petróleo e coletado nas proximidades da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR-PR). A bactéria foi gentilmente cedida pelo professor Dr. André Luiz Martinez de Oliveira do Depto. de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL. Foi mantido em tubos de ensaio contendo meio sólido de Dextrose Yeast Glucose Sucrose (DYGS) inclinado, e após o desenvolvimento do microrganismo foi acrescido glicerol PA, autoclavado, sobre a cultura, que em seguida foi mantida em freezer (- 4 °C). Repiques foram realizados a cada seis meses.

4.2 RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os resíduos agroindustriais utilizados na Fermentação em Estado Sólido (FES) foram: bagaço de cana-de-açúcar obtido de garapeiro na cidade de Sertanópolis/PR, lavado exaustivamente para a retirada dos açúcares solúveis, a casca de arroz, cedida pela beneficiadora Máquina de Arroz Yara-Londrina/PR e o farelo de soja, cedido pela Granosul Agroindustrial-Cambé/PR e posteriormente triturado para ser utilizado nas fermentações juntamente com os outros dois resíduos.

4.3 MEIOS DE CULTIVO

4.3.1 Meio de Manutenção DYGS

Na Tabela 8 observa-se a composição do meio de manutenção de DYGS (RODRIGUEZ NETO et al., 1986). Os reagentes foram adicionados em balão volumétrico juntamente com água, o pH do meio foi ajustado para 6,0 e volume completado para 1000 mL e acrescentados 15 gramas de ágar.

Tabela 8 - Composição do meio de DYGS

Composição	g L⁻¹
Extrato de levedura	2,0
Fosfato monoácido de potássio	0,5
Glicose	0,2
Peptona	1,5
Sulfato de magnésio	0,5

Fonte: Adaptado de Rodrigues Neto et al., 1986

4.3.2 Meio de Sais Minerais (MSM)

O MSM foi utilizado para o preparo do inóculo e como solução umedecedora para os cultivos em FES com composição descrita na Tabela 9, conforme Camilios Neto et al. (2008).

Tabela 9 - Composição do meio de sais minerais (MSM)

Composição	g L⁻¹
KH ₂ PO ₄	3,0
KHPO ₄	7,5
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0

Fonte: Camilios Neto, 2008

Os reagentes foram dissolvidos em água destilada e o volume completado para 1000 mL. Uma solução de glicose 2 % (m/v) foi preparada e separadamente autoclavada e adicionada à solução de sais de modo que a concentração final fosse de 0,2 % (m/v) de glicose.

4.4 PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi desenvolvido em Erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL do MSM (CAMILIOS NETO et al., 2008), contendo glicose 0,2 % (m/v). O *B. amyloliquefaciens* MO.04b foi transferido, com auxílio de alça de platina, da cultura estoque contendo meio DYGS (RODRIGUEZ NETO et al., 1986) para os frascos de Erlenmeyers. Estes frascos foram incubados a 37 ± 2 °C sob agitação de 180 rpm em agitador orbital por 24 horas. Transcorrido esse período, 0,2 mL (10⁷ - 10⁸ UFC mL⁻¹) da suspensão de células obtida foi utilizada como inóculo (MASSI, 2014).

4.5 CULTIVOS EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

4.5.1 Preparo dos Meios de Cultivo

A FES foi desenvolvida em Erlenmeyers de 50 mL, contendo 1,5 g de uma mistura dos resíduos bagaço de cana-de-açúcar (0,5 g), farelo de soja (0,5 g) e casca de arroz (0,5 g) umedecida com 10 mL de MSM para uma umidade de aproximadamente 80 % e acrescida de glicose 0,2 % (m/v). Os frascos contendo a mistura de resíduos e MSM foram esterilizados duas vezes em autoclave por 20 minutos a 121 °C. Após o resfriamento, os frascos foram inoculados com 200 µL de suspensão de células e incubados a 37 ± 2 °C em incubadora BOD nos tempos de incubação: 0, 6, 9, 12, 18, 24, 48 e 72 horas. Todos os experimentos foram realizados em duplicatas.

4.5.2 Interrupção dos Cultivos e Obtenção do Extrato Livre de Células (ELC)

Os cultivos foram interrompidos ao final de cada período de incubação com adição de 10 mL de água destilada aos frascos de Erlenmeyer. O conteúdo foi homogeneizado em agitador orbital por 15 minutos a 180 rpm. Posteriormente, o material foi centrifugado a $3.500 \times g$ a 4 ± 2 °C por 15 minutos, para obtenção do extrato livre de células (ELC), que foi congelado para posterior determinações analíticas.

4.5.3 Determinação do Peso Seco do Material Sólido Fermentado

O peso seco do material sólido fermentado foi determinado por gravimetria (70 °C por 24 horas) para avaliar a hidrólise dos substratos.

4.6 DETERMINAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO CELULAR

4.6.1 Preparo da Curva Padrão para Determinação de Biomassa por Espectrofotometria

Para a determinação da biomassa por espectrofotometria foram realizados os

seguintes procedimentos:

- A partir da cultura estoque foram retiradas 3 porções de células com auxílio de uma alça de platina da cultura estoque de *B. amyloliquefaciens* MO.04; esse material foi transferido para 4 Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio DYGS cada. Os frascos foram incubados a 37 ± 2 °C, 180 rpm por 24 horas;
- Após esse período, as células foram removidas por centrifugação a 8.000 x g por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado;
- As células obtidas foram lavadas com solução salina 0,85 % (m/v) por três vezes para a remoção completa de resíduos do meio;
- As células lavadas foram ressuspensas em 5 mL de solução salina e 1,0 mL da suspensão foi distribuída em cadinhos de porcelana, em triplicata, que foram deixados em estufa a 70 °C, por 48 horas, até peso constante. Com 1,0 mL da suspensão de células foram realizadas as diluições (1:50, 1:60, 1:79, 1:80, 1:90, 1:100). A turbidimetria da suspensão de células foi quantificada a 600 nm para a obtenção da curva analítica da biomassa. Com a curva analítica obteve-se a equação da reta para calcular da concentração de células em diferentes amostras (SOARES, 2014).

4.6.2 Determinação da Viabilidade Celular por Plaqueamento e Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

A viabilidade do *B. amyloliquefaciens* MO.04b foi determinada pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) nos cultivos de FES contendo 0,5 g de cada resíduo: cana-de-açúcar (BC), farelo de soja (FS) e casca de arroz (CA). Os cultivos foram interrompidos pela adição de solução salina estéril 0,85 %. Em seguida, os frascos de Erlenmeyer foram homogeneizados com auxílio de um bastão de vidro. A partir da suspensão de células obtida foram feitas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} . Alíquotas de 50 μ L das diluições 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura sólido de DYGS. As placas foram incubadas em estufa BOD a 37 ± 2 °C por 24 horas. Após este período, o número de unidades formadoras de colônias foi determinado e expresso em UFC (MASSI, 2014). Todos os procedimentos foram desenvolvidos em quadruplicatas.

4.7 DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ENZIMAS EXTRACELULARES

4.7.1 Atividade de Protease

Para determinação da atividade proteolítica, o sistema de incubação consistiu de 500 μL do ELC (diluído quando necessário), 250 μL do tampão glicina-NaOH (5 mM, pH 9,5) e 250 μL de soro albumina bovina (SAB) (5 mg mL^{-1}), incubado a 37 ± 2 °C por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de 250 μL de ácido tricloroacético 10 % e centrifugada a 3.500 x g por 15 minutos.

A concentração de tirosina solúvel do sobrenadante foi determinada pelo método de Hartree (1972) utilizando a equação da reta obtida da curva analítica construída utilizando o padrão de SAB, na faixa de concentração foi de 20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e absorvância em 650 nm. Uma unidade de atividade proteolítica (U mL^{-1}) foi definida como a quantidade de μmoles de tirosina solúvel liberada por mL do ELC por minuto. Para o cálculo da atividade proteolítica foi utilizada a Equação 1.

$$U \text{ mL}^{-1} = [Y] \times \frac{1}{\text{volume}} \times \frac{1}{60}(t) \times (fd) \quad \text{Equação 1}$$

Onde Y é igual a concentração de peptídeos determinada pela equação da reta da curva padrão de SAB, t é o tempo de incubação (minuto) e fd é referente ao fator de diluição.

4.7.2 Atividade de Xilanase

A atividade da xilanase foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados da xilana segundo Bailey, Biely e Poutanen (1992). O sistema de incubação foi formado de 100 μL da solução de xilana de "Larchwood" 1 % como substrato; 50 μL de tampão acetato 50 mM (pH 5,0); 325 μL de água destilada e 25 μL de ELC, diluído quando necessário, totalizando 500 μL de volume final.

Foram preparados os controles da enzima (C1), sem a solução de xilana e controle do substrato (C2), na ausência do ELC. O ensaio foi mantido à 50 °C por 20 minutos e a reação interrompida com adição de 500 μL do reativo de Somogyi (1945). Na sequência, os tubos foram colocados em banho Maria fervente por 10

minutos e adicionados 0,5 mL de reativo de Nelson (1944) e 3,5 mL de água destilada. Uma unidade de atividade xilanásica é definida como o número de μ moles de xilose liberados por minuto por mL do ELC, conforme a Equação 2.

$$U \text{ mL}^{-1} = M_{\text{xilose}} \times 40 \text{ (valor em } \mu\text{g mL}^{-1}\text{)} \times \frac{1}{20} (t) \times \frac{1}{150} (n_{\text{xilose}}) \quad \text{Equação 2}$$

Onde M_{xilose} equivale à massa de xilose (μg), 40 se refere à aplicação de 25 μL de enzima, t indica o tempo de incubação e n_{xilose} , o número de mol de xilose.

4.7.3 Atividade de Celulase

Para a determinação da atividade celulolítica o sistema de incubação consistiu em 1 mL de tampão citrato 50 mM (pH 4,8); 0,5 mL de ELC e uma tira de papel de filtro “Watman n° 1” com 1 X 6 cm, que equivale a aproximadamente 50 mg de glicose (MANDELS; ANDREOTTI; ROCHE, 1976).

O sistema foi mantido a 50 °C por 60 minutos e a reação interrompida com adição de 0,5 mL de DNS e incubados em banho Maria fervente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 3,5 mL de água destilada e as absorvâncias determinadas a 540 nm (MILLER, 1959).

A densidade ótica líquida ($DO_{\text{líq}}$) foi determinada pela Equação 3 e, em seguida, a unidade de atividade celulásica foi definida como o número de μ moles de glicose liberados por minuto por mL do ELC, pela Equação 4.

$$DO_{\text{líq}} = [(R_1 + R_2)/2 - C_1] \quad \text{Equação 3}$$

$$U \text{ mL}^{-1} = \frac{M_{\text{glicose}} \times 0,0925 (fpf)}{V} \quad \text{Equação 4}$$

Para a Equação 3, R_1 e R_2 referem-se ao valor de absorvância das reações e C_1 é igual ao controle da enzima. Na Equação 4, M_{glicose} representa a massa de glicose (mg), V refere-se ao volume do ELC utilizado (mL) e fpf é igual ao fator do papel filtro (0,0925).

4.7.4 Atividade de Lacase

A lacase foi determinada utilizando-se o DMP (2,6-dimethoxyphenol) como substrato, segundo BARBOSA et al. (1996). O ensaio enzimático foi desenvolvido com volume final de 1 mL, contendo 150 µL do substrato de DMP (10 mM em água deionizada), 150 µL de tampão Mac Ilvaine (pH 5,0), 200 µL de água deionizada e 500 µL do ELC.

Foram feitos os controles da enzima (C1) e do substrato (C2). Posteriormente, os tubos foram incubados em banho Maria termostaticado por 5 minutos a 50 °C. Utilizou-se água deionizada como branco da reação. Após período de incubação, as leituras de absorvância no comprimento de onda de 468 nm foram realizadas imediatamente. Determinou-se a densidade ótica líquida (DO_{liq}) utilizando a Equação 5. Uma unidade enzimática foi definida como o número de µmoles de DMP oxidado por minuto por mL de solução de enzima (Equação 6).

$$DO_{liq} = [(R_1 + R_2)/2 - C_1 + C_2] \quad \text{Equação 5}$$

$$U \text{ mL}^{-1} = [(DO_{liq}/\epsilon) \times (1/V) \times (1/t) \times 1000 \times fd] \quad \text{Equação 6}$$

Para a Equação 5, têm-se as variáveis R_1 e R_2 referentes ao valor de absorvância das reações e C_1 e C_2 iguais aos controles da enzima e do substrato. Na Equação 6 ϵ é igual ao coeficiente de extinção molar ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$), V refere-se ao volume de ELC utilizado (mL), fd é igual ao fator de diluição e t indica o tempo de incubação (minuto).

4.8 CULTIVO EM FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO PARA A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES

Uma vez que o teor de lipopetídeos extraídos do cultivo descrito em 4.5 não foi suficiente para a detecção e quantificação da surfactina, foi desenvolvido um novo cultivo, em maior escala e com intervalos de tempo igualmente espaçados, de modo que o teor de lipopetídeos produzidos fosse detectável e quantificável pelas técnicas de Cromatografia em Camada Delgada e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Erlenmeyers de 250 mL foram utilizados para o desenvolvimento dos cultivos, sendo que em cada frasco continha 7,5 g da mistura dos resíduos BC, FS e CA, com 2,5 g de cada resíduo, umedecidos com 50 mL de MSM acrescido de glicose 0,2 % (m/v). Os frascos foram inoculados com 500 µL de suspensão de células e incubados a 37 ± 2 °C em incubadora BOD nos tempos de incubação: 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas.

Ao final de cada período de incubação, os cultivos foram interrompidos com adição de 100 mL de água destilada. Separou-se o sólido fermentado da suspensão, e com esta foi determinada a biomassa por turbidimetria a 600 nm. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a $8.000 \times g$ por 15 minutos e 4 ± 2 °C, obtendo-se o ELC que foi utilizado para a extração dos lipopeptídeos, descrito a seguir. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

4.9 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DA SURFACTINA

4.9.1 Precipitação e Extração de Surfactina

Para a precipitação dos lipopeptídeos, 80 mL dos ELC referentes a cada tempo de cultivo foram inseridos em Erlenmeyers de 125 mL, e seu pH foi ajustado para 2,0 com HCl 6 mol L^{-1} . O sobrenadante acidificado foi mantido a 4 °C por 12 horas para precipitação da surfactina. O precipitado obtido foi separado por centrifugação a $8.000 \times g$ por 15 minutos e solubilizado em 10 mL de água destilada e o pH foi ajustado para 7,0 com NaOH 1 mol L^{-1} . 10 mL da solução obtida foi adicionada a 20 mL da mistura de clorofórmio e metanol [$\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (4:1)] para extração da surfactina. A fração residual, denominada extrato bruto, foi obtida através da evaporação do solvente da fase orgânica a 70 °C em evaporador rotatório, sob pressão reduzida (SLIVINSKI, 2012). O extrato foi liofilizado para a identificação e quantificação da surfactina. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.9.2 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A cromatografia de camada delgada (CCD) foi aplicada com a finalidade de isolar a substância produzida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b e identificar se

o microrganismo é capaz de produzir a surfactina. As análises em CCD foram realizadas em placas de sílica gel 60 (10 cm x 20 cm; Merck), utilizando a mistura de clorofórmio:metanol:água (65:25:1, v/v/v) como fase móvel (NAM et al., 2016), sendo que 10 µL foram aplicados nas placas. A revelação das bandas foi feita com diferentes reveladores: Vanilina sulfúrica, (ALVES, 2007), Orcinol-sulfúrico (FONTANA et al., 1988); solução de ácido sulfúrico 5 %, Dragendorff, Ninidrina p-anisalaldeído (JORK, et al., 1990) e água destilada. As placas foram borrifadas com os reveladores e aquecidas a 100 °C por 5 min.

Também foram realizados outros testes com seis placas para verificar a revelação das manchas. Todas as placas foram submetidas à corrida cromatográfica em mistura de clorofórmio:metanol:água (65:25:1, v/v/v) como fase móvel, sendo que simultaneamente à corrida cromatográfica de uma placa um recipiente contendo hidróxido de amônio (NH₄OH) foi mantido dentro da cuba da corrida cromatográfica de modo a se dissipar durante a corrida, e em seguida a placa foi revelada com vanilina sulfúrica. As cinco placas restantes, após a corrida cromatográfica, foram submetidas às seguintes condições: 1) duas placas foram inseridas em uma cuba saturada com NH₄OH, durante 10 minutos, e uma placa foi revelada com vanilina sulfúrica e a outra com ninidrina; 3) duas placas foram borrifadas com NH₄OH 0,1 molar, aquecidas a 100 °C, e uma placa foi revelada com vanilina sulfúrica e a outra com ninidrina; 4) a última placa foi inserida em uma cuba com iodo, lacrada e deixada em repouso durante dez minutos para a revelação das manchas.

4.9.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O extrato orgânico obtido de cada tempo de cultivo foi pesado em balança analítica, em mg, e o biosurfactante presente foi quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), empregando surfactina comercial (Sigma-Aldrich) como padrão e um cromatógrafo Shimadzu LC-10 AD, acoplado a um detector Shimadzu SPD-10A UV-Vis, em 210 nm, para as análises. Foi realizada separação em modo isocrático em uma coluna cromatográfica Luna[®] (Phenomenex[®]) de fase reversa C₁₈ (250 x 4,6 mm; partícula 5 µm; poro 100 Å) utilizando mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 3,8 mmol L⁻¹ (80:20, v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mLmin⁻¹, a 30 °C (HSIEH et al., 2004; LIU et al., 2012). O padrão de surfactina foi dissolvido em fase móvel (100 µg mL⁻¹), assim como as amostras, em

concentrações de 1,04 mg L⁻¹, 0,80 mg L⁻¹, 0,89 mg L⁻¹, 0,75 mg L⁻¹, 1,25 mg L⁻¹, 1,13 mg L⁻¹, 1,00 mg L⁻¹ e 1,00 mg L⁻¹, referentes aos períodos de cultivo de 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas, respectivamente. Foram injetados 20 µL das amostras na coluna cromatográfica em uma corrida de 45 minutos. Para a obtenção da concentração da surfactina nas amostras integrou-se as áreas dos picos dos homólogos. Aplicou-se o valor de área obtido na equação de regressão calculada pela curva analítica, construída em faixa de concentração de surfactina de 20 µg mL⁻¹ a 100 µg mL⁻¹, e foi obtida a concentração de surfactina nas amostras. Para determinar a concentração total de surfactina produzida no processo fermentativo foi determinada a massa total obtida no extrato orgânico seco e, em seguida foi feita a relação da quantidade de surfactina obtida com aquela calculada pela equação de regressão. A fim de determinar o rendimento da surfactina em mg g⁻¹ de sólido seco, a massa de surfactina obtida foi dividida pela massa de substrato sólido utilizado.

4.10 OUTRAS DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

4.10.1 Determinação do pH (inicial e final)

O pH dos ELC e controle dos cultivos foram determinados por método potenciométrico.

4.10.2 Determinação das Proteínas Totais

Para a determinação quantitativa das proteínas totais foi utilizado o método descrito por Hartree (1972), utilizando o padrão de soroalbumina bovina (200 µg mL⁻¹). A curva analítica foi construída com base nas leituras espectrofotométricas a 595 nm, na faixa linear de trabalho de 20 a 200 µg mL⁻¹.

4.10.3 Determinação dos Açúcares Totais

O método fenol-ácido sulfúrico descrito por Dubois et al. (1956) foi empregado para a determinação quantitativa dos açúcares totais. Para a construção da curva analítica, glicose (100 µg mL⁻¹) foi utilizada como padrão, e a curva foi realizada com base nas leituras espectrofotométricas a 490 nm, na faixa linear de

trabalho de 20 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.10.4 Determinação dos Açúcares Redutores

O método descrito por Somogyi (1945) e Nelson (1944) foi utilizado para a determinação quantitativa dos açúcares redutores. Para a construção da curva analítica, glicose ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi utilizada como padrão, e a curva foi realizada com base nas leituras espectrofotométricas a 540 nm, na faixa linear de trabalho de 20 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO POR *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b NA MISTURA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (BC), FARELO DE SOJA (FS) E CASCA DE ARROZ (CA)

Os cultivos de FES foram desenvolvidos em Erlenmeyers de 50 mL contendo a mistura de BC, FS e CA (0,5 g de cada resíduo), umedecida com MSM (CAMILIOS NETO, 2008) e acrescido de glicose 0,2 % (m/v).

A Figura 3 apresenta o aspecto dos meios de cultivo e o crescimento do microrganismo. Em A estão presentes o frasco controle e os frascos cultivos referentes às 6 horas de cultivo, em B, os frascos cultivo referentes às 18 horas de cultivo; em C estão presentes os frascos cultivos referentes às 48 horas e em D estão representados os frascos cultivo das 72 horas de cultivo. As setas indicam as regiões onde houve maior crescimento do microrganismo, evidenciadas pela coloração esbranquiçada.

Os cultivos foram realizados em, 6, 9, 12, 18, 24, 48 e 72 horas e após a interrupção foram obtidos sobrenadantes denominados extrato livre de células (ELC) utilizados para as determinações de pH inicial (frasco controle) e final (dos frascos cultivo), proteínas totais, açúcares totais e redutores e do sólido fermentado (Tabela 10).

O pH final do ELC foi de 6,6 a 8,5 após 72 horas de fermentação, indicando que houve uma mudança no meio após o fim do cultivo. A produção de biomassa foi crescente até 134×10^8 UFC mL⁻¹ após 18 horas, e com redução até 7×10^8 UFC mL⁻¹ após 72 horas de cultivo.

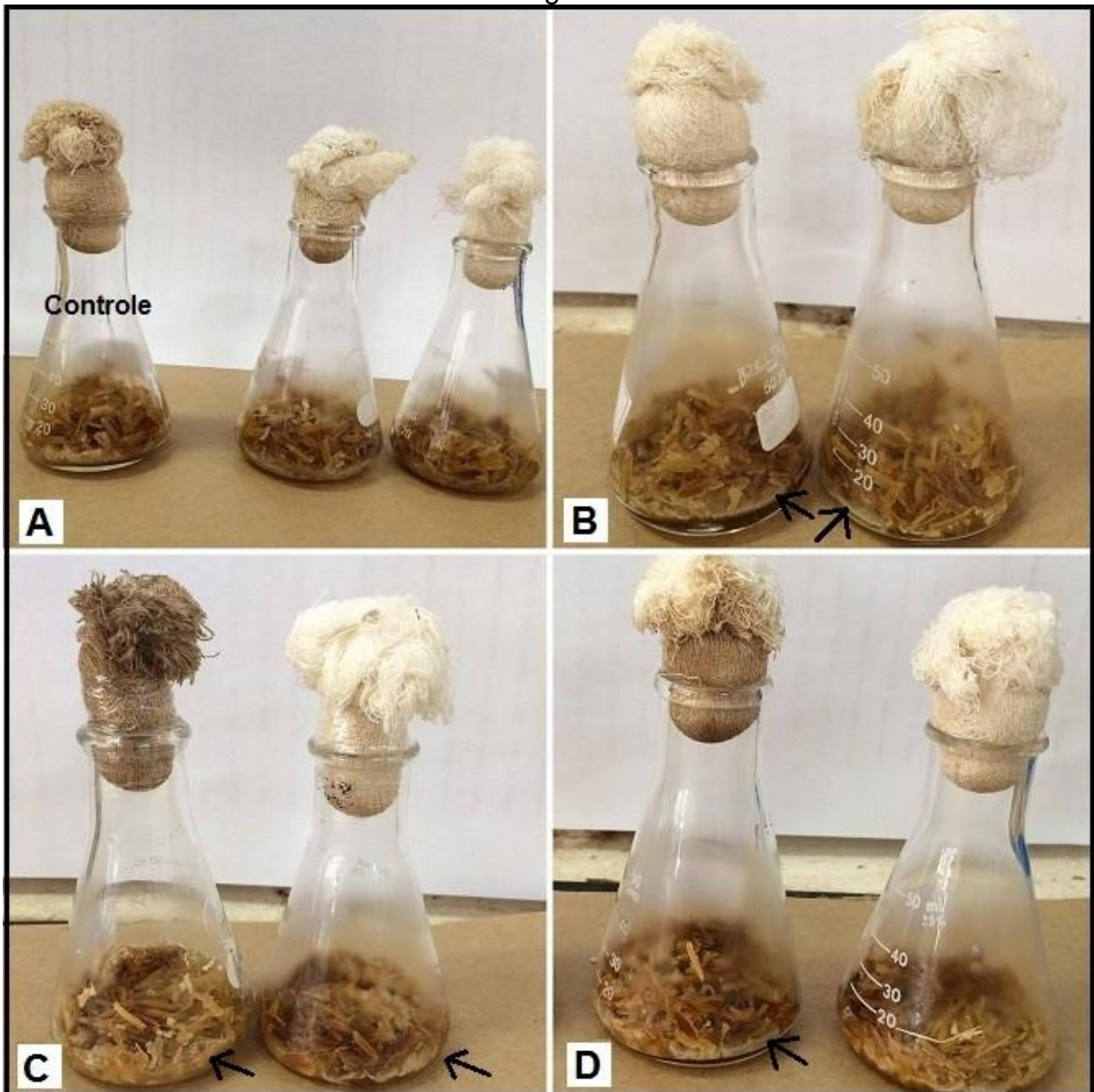
O teor de açúcares totais e redutores reduziu em 45,6 % e 67, 1 % após 72 horas de fermentação em relação aos controles, sendo de 5,61 mg mL⁻¹ (0 h) e 3,05 mg mL⁻¹ (72 h) e 2,37 mg mL⁻¹ (0 h) e 0,78 mg mL⁻¹ (72 h), respectivamente.

O teor médio de proteínas apresentou oscilações durante o período de tempo estudado, com aumento de 23,7 % do início do cultivo até as 12 horas, e com redução de 25,8 % a partir das 12 horas até as 24 horas de cultivo, e por fim, com aumento de 6,2 % a partir das 24 horas até o fim do cultivo.

Quanto ao material sólido fermentado, verificou-se redução de 23, 8 % do peso seco, sendo este de 1,22 g (0 horas) até 0,93 g (72 horas). Este resultado

mostra que após 72 horas de cultivo o microrganismo hidrolisou aproximadamente 25 % do total dos resíduos agroindustriais utilizados como substratos.

Figura 3 - Aspecto dos meios cultivos para FES de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b cultivado nos resíduos bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja, casca de arroz. Em A, o aspecto do controle e dos frascos cultivo de 6 horas; em B, os frascos cultivo de 18 horas; em C, o aspecto dos frascos cultivo de 48 horas; em D, os frascos cultivo de 72 horas, incubados a 37 ± 2 °C. As setas indicam as regiões onde houve maior crescimento dos microrganismos



Fonte: o próprio autor (2017)

Tabela 10 - Avaliação da capacidade de hidrólise da mistura de resíduos lignocelulósicos farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz por *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b cultivado por 72 horas a 37 ± 2 °C

Tempo (horas)	pH	Biomassa ($\times 10^8$ UFC mL ⁻¹)	Proteína Total (mg mL ⁻¹)	Açúcar Total (mg mL ⁻¹)	Açúcar Redutor (mg mL ⁻¹)	Sólido Fermentado Residual (g)
0	6,6	0,0	9,80	5,61	2,37	1,22
6	6,4	1,0	10,99 \pm 0,50	4,09 \pm 0,03	1,47 \pm 0,22	1,17 \pm 0,004
9	6,7	1,2	11,30 \pm 0,00	3,68 \pm 0,20	0,23 \pm 0,03	1,11 \pm 0,001
12	7,3	14,0	12,12 \pm 0,50	4,14 \pm 0,05	1,13 \pm 0,12	1,03 \pm 0,014
18	7,6	134,0	8,94 \pm 0,55	2,82 \pm 0,23	0,82 \pm 0,09	1,08 \pm 0,013
24	8,2	10,0	8,99 \pm 1,41	2,29 \pm 0,03	0,62 \pm 0,05	1,05 \pm 0,012
48	8,6	8,0	9,30 \pm 0,45	3,54 \pm 0,10	0,59 \pm 0,07	0,94 \pm 0,002
72	8,5	7,0	9,55 \pm 0,20	3,05 \pm 0,02	0,78 \pm 0,09	0,93 \pm 0,000

Fonte: o próprio autor (2017)

Papi (2013) avaliou o crescimento celular do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em cultivo com MSM (CAMILIOS NETO, 2008), acrescido de 0,2 % (p/v), seguido de incubação a 28 ± 2 °C e 180 rpm, nos períodos de tempo de 3, 6, 9, 12, 18 e 24 horas. Diluições seriadas dos cultivos foram realizadas, e 20 μ L dessas diluições foram plaqueadas em meio sólido e incubadas por 24 horas a 28 ± 2 °C. Resultados do crescimento celular indicaram que o período de maior proliferação celular foi a partir de 12 até 18 horas, com aproximadamente 5×10^7 a $3,75 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, sendo que de 18 a 24 horas o número de células se manteve constante.

Massi (2014), ao avaliar o perfil de crescimento do *B. amyloliquefaciens* MO.04b em FES utilizando as misturas de farelo de soja e casca de arroz e de farelo de milho e casca de arroz, ao longo de 48 horas de cultivo, com intervalos de 6 horas de fermentação, verificou que houve um pico de crescimento de 1×10^8 UFC gSS⁻¹ (unidades formadoras de colônias por grama de substrato seco) em 12 horas, e a partir deste tempo, houve um desenvolvimento constante até 48 horas, semelhante ao verificado por Papi (2013).

Santos (2015) avaliou o crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em FS, onde os cultivos foram preparados com MSM (CAMILIOS NETO, 2008), contendo 0,2 % (m/v) de glicose. A incubação ocorreu a 37 ± 2 °C e 180 rpm, durante os intervalos de tempo 0, 3, 6, 9, 12, 21 e 24 horas, seguida das diluições seriadas dos cultivos (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000), e 200 μ L dessas diluições foram plaqueadas em meio sólido de DYGS e incubadas por 24 horas a 37 ± 2 °C, sendo então determinadas as unidades formadoras de colônias. Verificou-se que a

partir de 10 até 18 horas de cultivo a concentração celular ocorreu de maneira mais expressiva, de $1,4 \times 10^7$ a $6,6 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, depois de 18 horas houve a fase de morte celular.

O resultado referente ao pico de crescimento celular deste trabalho foi similar aos apresentados por Papi (2013), Massi (2014) e Santos (2015), uma vez que o crescimento máximo de células se deu até 18 horas de fermentação, com 134×10^8 UFC mL⁻¹.

5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DAS ENZIMAS EXTRACELULARES POR *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b EM FES NA MISTURA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR, FARELO DE SOJA E CASCA DE ARROZ

As atividades de celulase, xilanase, protease e lacase foram testadas nos ELC obtidos dos cultivos de FES pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b na mistura de BC, FS e CA, de modo a se relacionar o perfil de hidrólise dos resíduos com a atividade enzimática, e os resultados estão apresentados a seguir.

5.2.1 Atividade de Protease

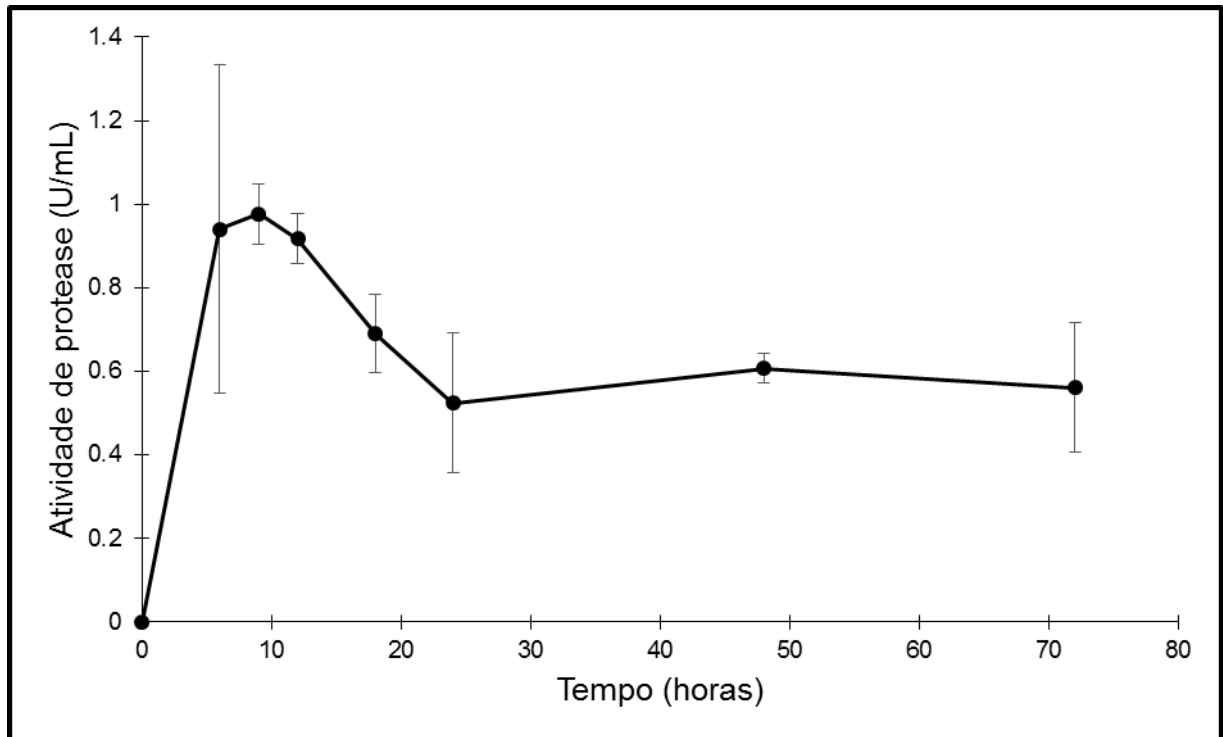
A Figura 4 mostra a curva de atividades de protease em função do tempo de cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b em FES utilizando resíduos agrícolas como substratos. Foram verificadas maiores atividades entre 6 e 12 horas de cultivo, e decréscimo da atividade a partir das 12 horas até o fim do cultivo, com redução de 61,1 %.

Santos (2012) determinou a atividade de protease produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em FES nos resíduos agroindustriais bagaço de cana-de-açúcar, casca de arroz, torta de soja e torta de milho. O melhor substrato para a produção de protease foi a torta de soja, com atividade proteolítica de 180 U mL⁻¹.

Santos (2015) avaliou a produção de protease por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em farelo de soja (FS) e farelo de milho (FM). A atividade da protease no extrato de FS foi de 146,08 U mL⁻¹ e no extrato de FM foi de 63,41 U mL⁻¹, utilizando extratos sem diálise (ESD). O melhor tempo de cultivo foi 9 horas em FS para protease (11,7 U mL⁻¹), usando em extratos dialisados (ED), em FM não foi produzida protease. A condição ótima de produção de protease foi obtida na mistura

de substratos farelo de soja (FS), bagaço de cana-de-açúcar (BC) e casca de arroz (CA), atingindo atividade de $20,32 \text{ U mL}^{-1}$.

Figura 4 - Curva de atividade de protease produzida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b em FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz como substrato durante 0, 6, 9, 12, 18, 24, 48 e 72 horas de cultivo, a $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$



Fonte: o próprio autor (2017)

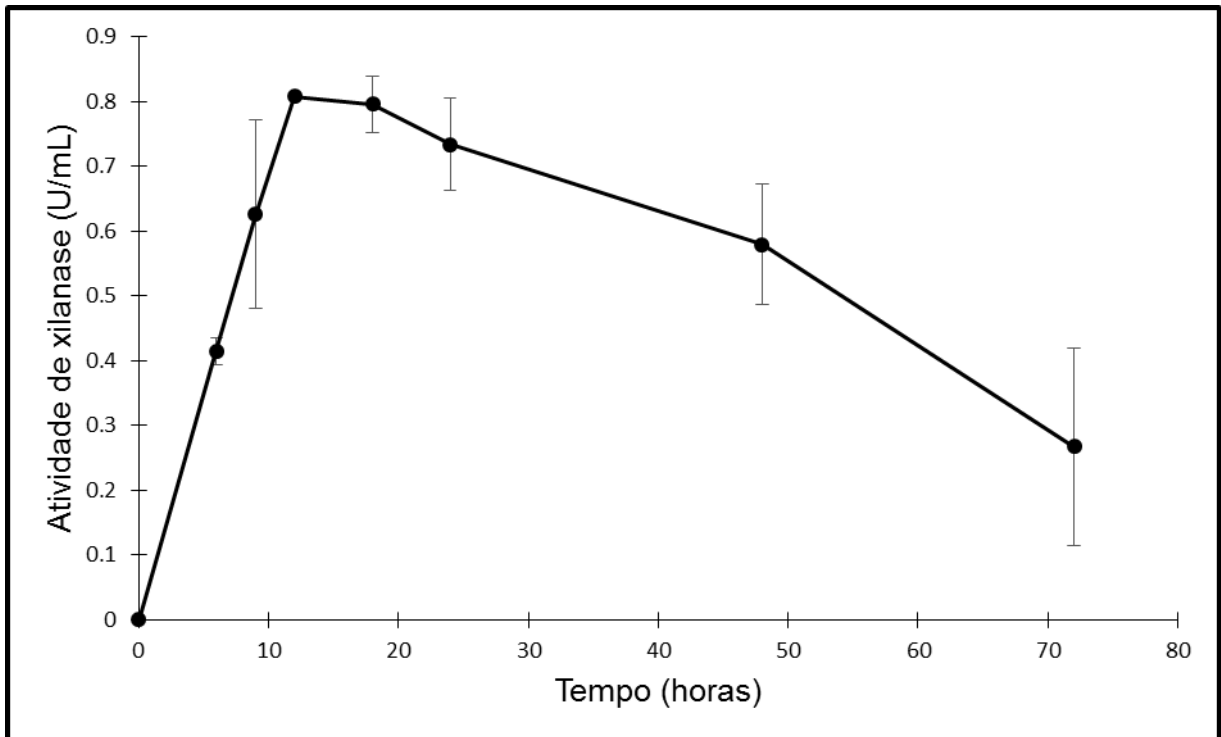
A atividade máxima de protease ($20,32 \text{ U mL}^{-1}$) encontrada por Santos (2015) correspondeu a 9 horas de cultivo, assim como foi verificado por Santos (2012) e por este trabalho. Ao relacionar o percentual de hidrólise do material seco fermentado (Tabela 10) com a atividade de protease, é possível perceber que a redução do material sólido fermentado em 9 horas de cultivo foi de aproximadamente 10 %, sendo que em 72 horas de cultivo a redução foi de aproximadamente 25 %, o que mostra que nos períodos de maior atividade da protease, entre 6 e 9 horas, ocorreu redução mais acentuada dos resíduos.

5.2.2 Atividade de Xilanase

A Figura 5 mostra a curva de atividades de xilanase em relação ao tempo de cultivo do *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b em FES utilizando resíduos agrícolas

como substratos. Observa-se os ELC dos cultivos apresentaram atividade de xilanase, sendo a produção máxima obtida de $0,81 \text{ U mL}^{-1}$ após 12 horas de cultivo.

Figura 5 - Curva de atividade de xilanase produzida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b em FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz como substrato durante 0, 6, 9, 12, 18, 24, 48 e 72 horas de cultivo, a $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$



Fonte: o próprio autor (2017)

Relacionando a redução do material sólido fermentado com a atividade de xilanase, é possível notar que houve diminuição de aproximadamente 15 % do resíduo (Tabela 10) em 12 horas de cultivo, período no qual a xilanase apresentou atividade máxima. Em apenas 12 horas de cultivo a redução do resíduo foi superior à redução encontrada no restante do período de cultivo, fato que pode estar relacionada à maior atividade de protease e xilanase entre as 9 e 12 horas de cultivo.

Amore et al. (2014) realizaram fermentações com o *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A, através da transferência de culturas puras do microrganismo em meio sólido (NaNO_3 $1,0 \text{ g L}^{-1}$, K_2HPO_4 $1,0 \text{ g L}^{-1}$, KCl $1,0 \text{ g L}^{-1}$, MgSO_4 $0,5 \text{ g L}^{-1}$, extrato de levedura $0,5 \text{ g L}^{-1}$, glicose $1,0 \text{ g L}^{-1}$, ágar $17,0 \text{ g L}^{-1}$) contendo $5,0 \text{ g L}^{-1}$ de xilana (Sigma), e avaliaram a atividade de xilanase de $10,5 \text{ U mL}^{-1}$.

Ladeira (2013) estudou a produção desta enzima por duas espécies de microrganismos termofílicos do gênero *Bacillus sp.*, utilizando-se resíduos agroindustriais como matéria-prima. A melhor produção de xilanase ($1,35 \text{ U mL}^{-1}$) foi obtida em meio de crescimento contendo dreche cervejeiro 1 % (m/v), sendo que a atividade xilanolítica também foi observada quando o farelo de trigo ($1,32 \text{ U mL}^{-1}$), bagaço de cana-de-açúcar ($0,80 \text{ U mL}^{-1}$), tupinambo ($0,32 \text{ U mL}^{-1}$), sabugo de milho ($0,30 \text{ U mL}^{-1}$) e xilana industrial ($0,21 \text{ U mL}^{-1}$) foram utilizados como substratos. A xilanase de *Bacillus sp.* 3M foi caracterizada em termos de perfil de temperatura e pH. A melhor atividade da enzima foi observada na temperatura de 60°C e no pH de 5,3. A enzima manteve 100 % da sua atividade original depois de 96 horas a 60°C e pH 7,0.

A atividade máxima de xilanase de $0,81 \text{ U mL}^{-1}$ produzida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b neste trabalho, empregando a mistura de BC, FS e CA como substrato estão em concordância com o valor obtido por Ladeira (2013) empregando o BC ($0,80 \text{ U mL}^{-1}$), e sugere que estudos de otimização da produção e caracterização da enzima sejam desenvolvidos visto que a produção da mesma é mais frequente nos fungos filamentosos.

5.2.3 Atividade de Celulase e Lacase

Os ELC não apresentaram atividade de celulase e lacase, embora o gênero *Bacillus* possa produzi-las em condições específicas.

De Marco (2012) empregou um isolado de *Bacillus* e analisou sua capacidade de produção de celulase em meio de cultivo acrescido de quatro diferentes substratos: carboximetilcelulose, celulose microcristalina, palha de trigo e casca de arroz. O meio de cultivo acrescido de carboximetilcelulose induziu a maior atividade após 6 horas de incubação, com $0,12 \text{ U mL}^{-1}$.

Padilha et al. (2012) realizou a produção de celulase (CMCase) termofílica pelo *Bacillus sp.* C1AC5507, utilizando bagaço de cana-de-açúcar. Os resultados mostraram uma maior atividade celulolítica entre pH 4,2 – 5,5 e temperatura de $67 - 70^\circ \text{C}$, com máxima atividade de $0,37 \text{ U mL}^{-1}$ em pH 4,2 e temperatura de 70°C .

Muthukumarasamy, et al. (2015) estudaram a bactéria produtora de lacase, *Bacillus subtilis* MTCC 2414, em substratos agroindustriais. Os maiores rendimentos de lacase foram farelo de arroz e farelo de trigo. Ao variar, separadamente, alguns

parâmetros (temperatura, pH, tempo de incubação e fontes de carbono e nitrogênio), os autores detectaram produções máximas de: 270 U mL⁻¹ (30 °C), 345 U mL⁻¹ (pH 7,0) e 267 U mL⁻¹ (96 horas de incubação). As fontes de carbono e nitrogênio resultaram em altas rendimentos de enzima, com 3 % de sucrose (275 U mL⁻¹) e 3 % de peptona (352,2 mL) para farelo de arroz, e 3 % de sucrose (247,4 U mL⁻¹) e 3 % de peptona (328 U mL⁻¹) para o farelo de trigo, respectivamente.

Os resultados, observados na literatura indicam que a espécie de *Bacillus* é capaz de produzir a lacase, ao contrário do observado nas condições deste trabalho.

5.3 FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO POR *Bacillus Amylolyquefaciens* MO.04b NA MISTURA DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR (BC), FARELO DE SOJA (FS) E CASCA DE ARROZ (CA) PARA A OBTENÇÃO DE SURFACTINA

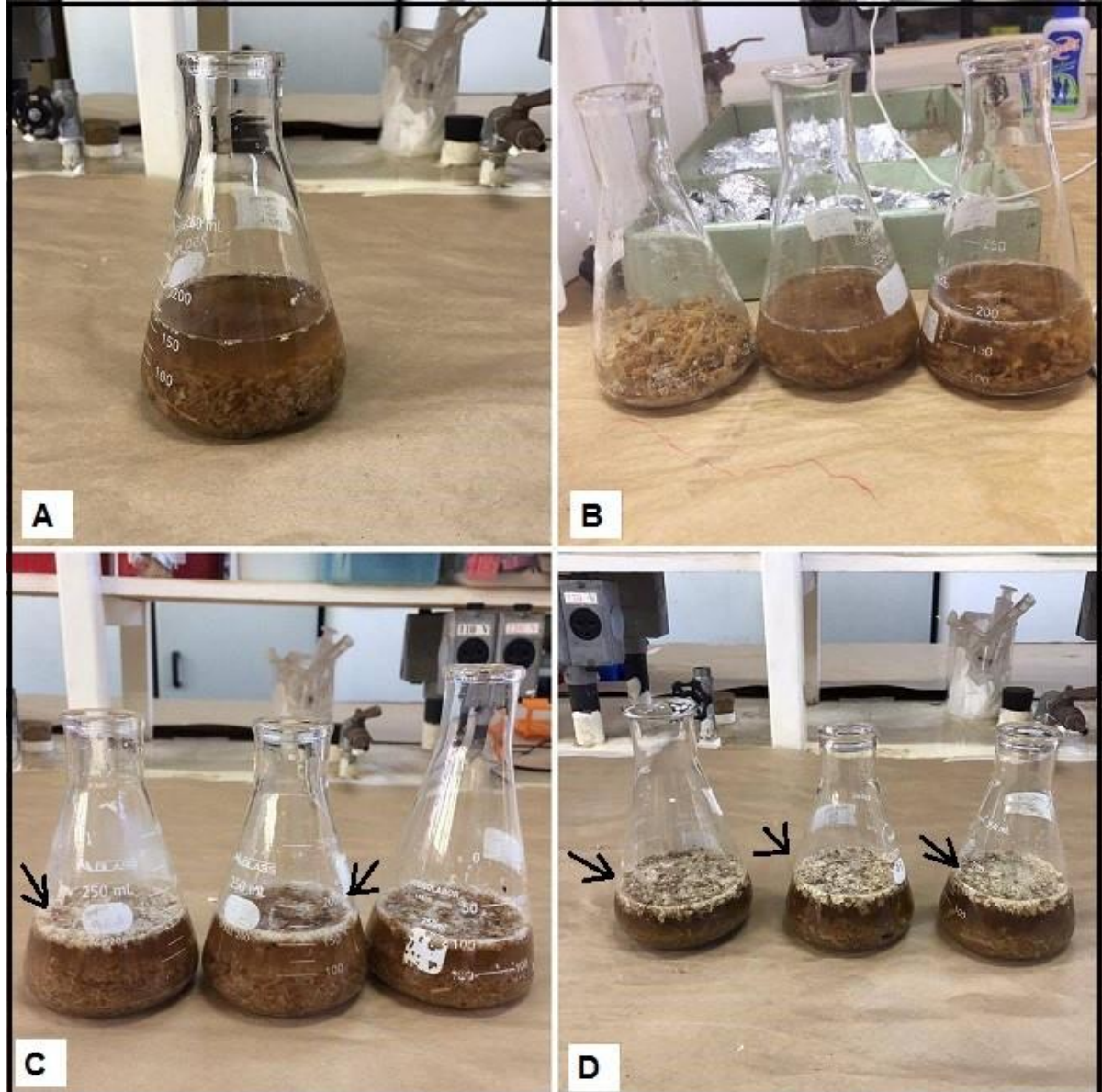
Os cultivos de FES em maior escala, para a obtenção de surfactina, foram desenvolvidos em Erlenmeyers de 250 mL contendo a mistura de BC, FS e CA (2,5 g de cada resíduo), umedecida com MSM (CAMILIOS NETO, 2008) e acrescido de glicose 0,2 % (m/v).

A Figura 6 apresenta o aspecto dos meios de cultivo e crescimento do microrganismo após adição de 100 mL de água para interrupção do cultivo. Devido a adição de água os microrganismos, que antes estavam aderidos aos resíduos, se desprenderam e subiram para o topo, flutuando sobre o líquido, o que proporcionou melhor visão de seu crescimento.

Em A é apresentado o frasco controle, em B os frascos cultivo referentes às 12 horas de cultivo, em C estão apresentados os frascos referentes às 24 horas e em D estão apresentados os frascos referentes 48 horas de cultivo. As setas indicam as regiões esbranquiçadas, evidenciando o crescimento do microrganismo.

Em 12 horas de cultivo o crescimento do microrganismo ainda era reduzido ao ser comparado com o crescimento em 24 horas e 48 horas de cultivo. evidenciados na Figura 6.

Figura 6 - Aspecto dos meios cultivados para FES de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b cultivado nos resíduos bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja, casca de arroz. Em A aspecto do frasco controle, e em B os frascos cultivo de 12 horas, em C os frascos cultivo de 24 horas e em D os frascos cultivo de 48 horas, incubados a $37 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$



Fonte: o próprio autor (2017)

5.4 IDENTIFICAÇÃO DA SURFACTINA POR CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD)

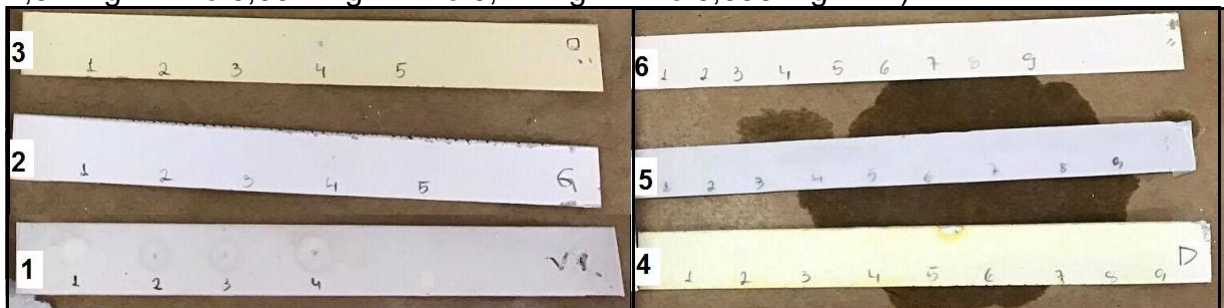
Após a precipitação e extração de lipopeptídeos, aplicou-se a cromatografia de camada delgada (CCD), de modo a identificar a surfactina. A CCD ocorreu com a aplicação de $10 \mu\text{L}$ das amostras, padrão de surfactina (Sigma-Aldrich) nas concentrações de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$, e amostras do cultivo de 18 horas nas concentrações $0,92 \text{ mg mL}^{-1}$, $1,04 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,72 \text{ mg mL}^{-1}$, diluídas em metanol.

A corrida cromatográfica ocorreu em clorofórmio:metanol:água (65:25:1, v/v/v) (NAM et al., 2016). A placa cromatográfica foi revelada com vanilina sulfúrica. Esta placa não apresentou nenhuma mancha referente ao material aplicado; dessa forma, novas concentrações do padrão e da amostra de 18 horas de cultivo foram testadas com outros reveladores.

A fim de verificar a eficácia dos reveladores as amostras foram aplicadas nas placas seguida da aplicação dos reveladores, sem a realização da corrida cromatográfica em fase móvel. Seis diferentes reveladores foram utilizados: 1) vanilina-sulfúrica, aplicada no padrão de surfactina (2 mg mL^{-1}) e na amostra ($0,92 \text{ mg mL}^{-1}$, $1,04 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,72 \text{ mg mL}^{-1}$); 2) p-anisaldeído e orcinol-sulfúrico, no padrão de surfactina (2 mg mL^{-1} , $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$) e na amostra ($0,72 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,036 \text{ mg mL}^{-1}$); Dragendorff, ácido sulfúrico 5 % e ninidrina, no padrão (2 mg mL^{-1} , $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$) e na amostra ($0,92 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,046 \text{ mg mL}^{-1}$, $1,04 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,052 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,72 \text{ mg mL}^{-1}$, $0,036 \text{ mg mL}^{-1}$).

A Figura 7 apresenta o resultado dos testes com os diferentes reveladores citados e é possível perceber que não houve o aparecimento de manchas em nenhuma das placas, com exceção da placa submetida à revelação com vanilina sulfúrica, na qual foi visualizada uma sutil mancha branca no ponto onde foi aplicado o padrão de surfactina de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$.

Figura 7 - Aplicação de diferentes reveladores de Cromatografia de Camada Delgada (CCD). Em 1, revelação com vanilina-sulfúrica, com padrão de surfactina (2 mg mL^{-1}) e amostras ($0,92 \text{ mg mL}^{-1}$, $1,04 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,72 \text{ mg mL}^{-1}$); em 2 e 3, p-anisaldeído e orcinol sulfúrico, respectivamente, ambos com padrão de surfactina (2 mg mL^{-1} , $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$) e amostra ($0,72 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,036 \text{ mg mL}^{-1}$); em 4, 5, e 6, Dragendorff, ácido sulfúrico 5 % e ninidrina, com padrão de surfactina (2 mg mL^{-1} , $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,01 \text{ mg mL}^{-1}$) e amostras ($0,92 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,046 \text{ mg mL}^{-1}$, $1,04 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,052 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,72 \text{ mg mL}^{-1}$ e $0,036 \text{ mg mL}^{-1}$)

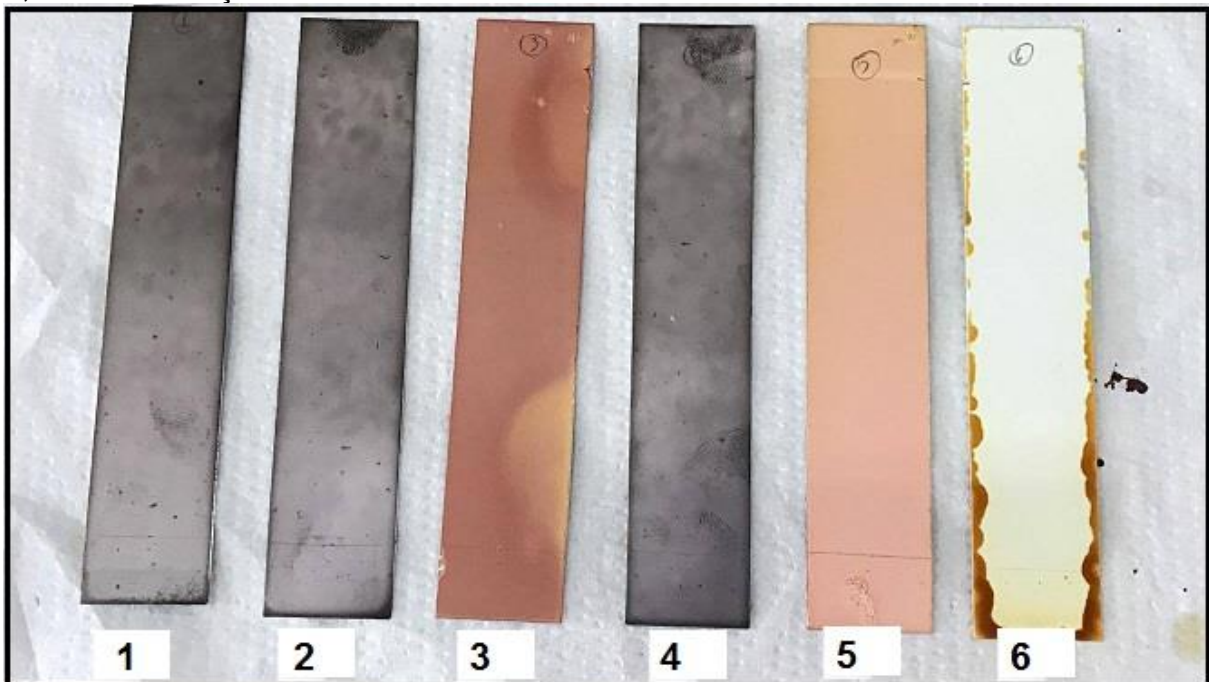


Fonte: o próprio autor (2017)

Sendo assim, esta amostra foi aplicada em duas placas, as quais foram submetidas a corrida cromatográfica empregando a mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético $3,8 \text{ mmol L}^{-1}$ (80:20, v/v) como fase móvel, e reveladas com vanilina sulfúrica e água destilada, seguida de aquecimento a $100 \text{ }^\circ\text{C}$, e assim como testes anteriores, não foram identificadas manchas.

Como as manchas não apareceram como esperado, foram realizados outros seis testes, em diferentes condições, descritas em 4.9.2. Em todas as placas foram aplicados $10 \text{ } \mu\text{L}$ de padrão de surfactina 2 mg mL^{-1} , uma amostra a $0,72 \text{ mg mL}^{-1}$ e creatina $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ e submetidas a aquecimento a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ para a revelação das manchas (Figura 8).

Figura 8 - Placas cromatográficas (sílica gel) após corrida cromatográfica em fase móvel de clorofórmio:metanol:água (65:25:1, v/v/v) e revelação com diferentes reveladores. Em 1 NH_4OH foi dissipado dentro da cuba durante a corrida cromatográfica; em 2 e 3 as placas foram saturadas com NH_4OH ; em 4 e 5 as placas foram borrifadas com NH_4OH 0,1 molar; em 6 a placa foi encubada durante dez minutos com iodo para revelação das manchas. Revelação com vanilina sulfúrica: 1,2 e 4. Revelação com ninidrina: 3 e 5



Fonte: o próprio autor (2017)

Em nenhuma das placas foram visualizadas manchas, nem sequer a mancha branca visualizada anteriormente na Figura 7, revelada com vanilina sulfúrica e nem mesmo a creatina, também diluída em metanol, que foi testada a fim

de verificar se a não visualização das manchas tinha relação com o padrão ou amostras utilizadas e suas concentrações.

Faria et al. (2011) produziram surfactina utilizando o *Bacillus subtilis* LSFM-05, em fermentador de bancada de 15 L e empregando o glicerol bruto obtido do biodiesel como única fonte de carbono. Sobre os biossurfactantes extraídos foi aplicada a CCD utilizando clorofórmio, metanol e solução aquosa de 28 % de hidróxido de amônio (65:35:5, v/v/v) como fase móvel. Os compostos foram revelados com água destilada, seguido de aquecimento a 100 °C. Segundo os autores, a presença do biossurfactante foi detectada pela formação de pontos brancos e o Fator de Retenção (R_f) do surfactante purificado foi idêntico ao do padrão de surfactina disponível comercialmente (Sigma-Aldrich).

Nam et al. (2016) empregaram o *Bacillus amyloliquefaciens* KB3 para produzir surfactina e a química dos surfactantes obtidos foi investigada por CCD. O *B. amyloliquefaciens* KB3 foi incubado durante 2 dias a 30 °C em agitador orbital a 180 rpm em meio King B (KB). Após extração, os materiais secos foram dissolvidos em clorofórmio e metanol (65:15, v/v) e aplicados em placas de CCD com clorofórmio:metanol:água (65:25:1, v/v/v) como o solvente da fase móvel. Foram aplicados padrões de surfactina em concentrações de 100 e 10 ppm. Para a revelação, água destilada foi aplicada sobre as placas, seguido de aquecimento a 110 °C durante 5 minutos. Tanto o padrão de surfactina quanto as amostras produziram um ponto branco com R_f de 0,55.

Ponte Rocha (2007) avaliou a produção de surfactina por *B. subtilis* LAMI007, empregando os açúcares provenientes do suco de caju clarificado como fonte de carbono. Após extração e purificação da surfactina, foi aplicada a CCD. As amostras e padrão de surfactina (Sigma-Aldrich) foram dissolvidos em clorofórmio/metanol (65:15, v/v), e 5 gotas foram aplicadas na placa de sílica gel para CCD. A mistura de clorofórmio:metanol:água (65:15:1, v/v/v) foi usada como eluente. Após a eluição, foi esperado 2 minutos para a revelação das placas com água destilada e aquecimento a 110 °C por 15 minutos. O biossurfactante produzido apresentou uma pequena mancha com R_f de 0,52 enquanto o padrão de surfactina apresentou uma mancha com R_f de 0,54.

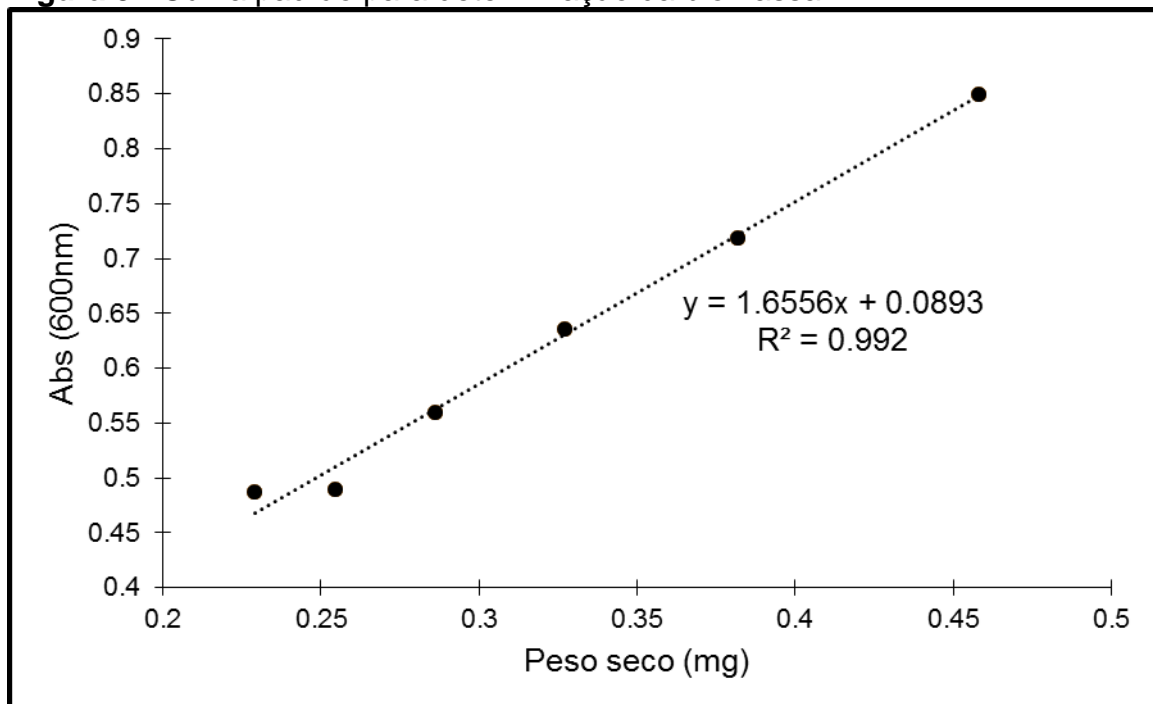
Oliveira (2006) empregou o *Bacillus subtilis* R14 para a produção de surfactina. Após extração, o material foi aplicado em placa de sílica para a CCD, utilizando dois sistemas eluentes: clorofórmio:metanol:água (65:24:4, v/v/v) e

metanol:clorofórmio (60:40, v/v). A revelação das manchas foi feita com aplicação de vapor de iodo sobre as placas e visualização em luz UV. Foram observadas duas manchas na fase metanólica e nenhuma mancha na fase clorofórmica. Os R_f das manchas foram de 0,49 e 0,87 e o R_f da mancha da surfactina comercial (Sigma-Aldrich) foi de 0,87, indicando a presença da surfactina na amostra com o mesmo valor de R_f .

5.5 CURVA PADRÃO PARA DETERMINAÇÃO DE BIOMASSA POR ESPECTROFOTOMETRIA

Para determinação da biomassa nos ELC provenientes da FES foi construída uma curva padrão para a determinação da biomassa por espectrofotometria. Esta é uma metodologia de fácil execução em relação a determinação por plaqueamento e determinação das unidades formadoras de colônias por mL, por isso o seu emprego neste trabalho. A Figura 9 apresenta a curva obtida com a respectiva equação da reta, cujo R^2 foi de 0,992.

Figura 9 - Curva padrão para determinação da biomassa



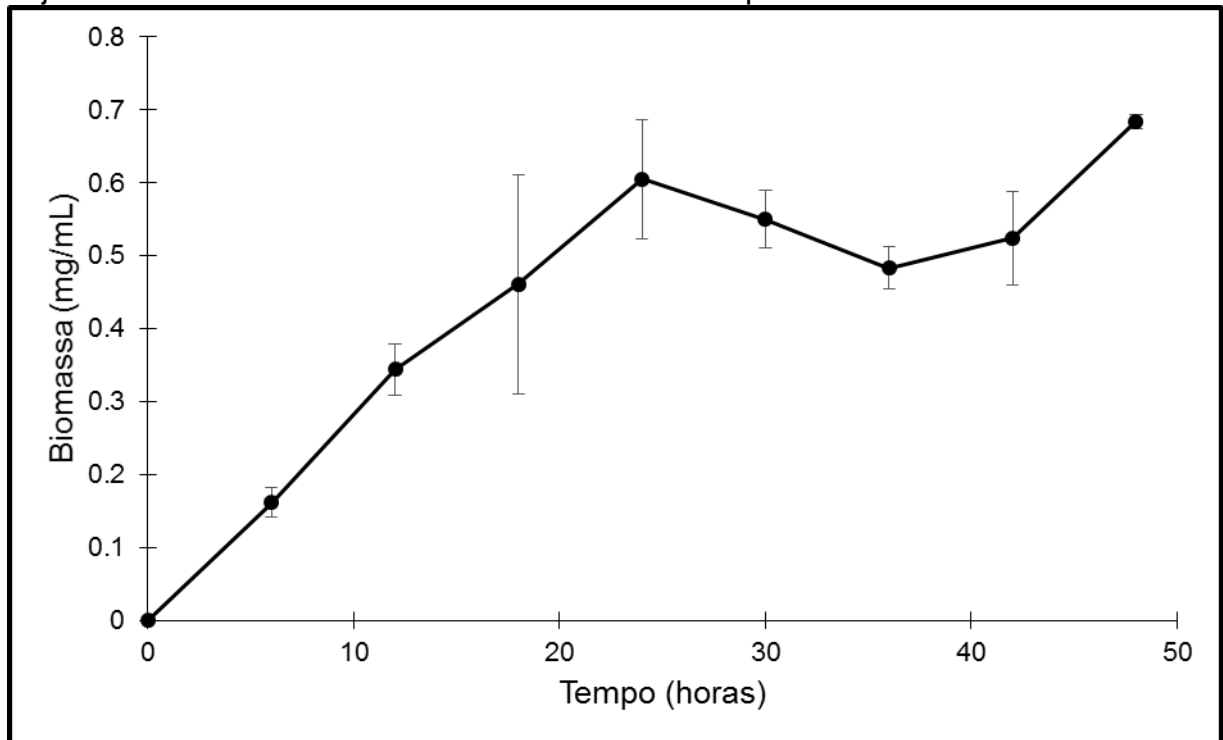
Fonte: o próprio autor (2017)

A biomassa foi medida com a suspensão do material retirado dos cultivos, e a partir desta suspensão foram realizadas as determinações através da turbidimetria

a 600 nm, em seguida foi quantificada através da curva padrão de biomassa, em mg mL⁻¹. A Figura 10 apresenta a curva de biomassa dos cultivos de *Bacillus amyloliquefaciens* MO-0b em FES contendo 7,5 g de uma mistura de BC, FS e CA a 37 ± 2 °C, em diferentes períodos de cultivo.

Observa-se que houve aumento de biomassa nas primeiras 24 horas de cultivo. Nas primeiras 6 horas a biomassa correspondia a 162 µg mL⁻¹, atingindo o pico em 24 horas, com 605 µg mL⁻¹. Após esse período a biomassa diminuiu até as 36 horas, atingindo 483 µg mL⁻¹, e voltou a se elevar até as 48 horas, atingindo o máximo, com 684 µg mL⁻¹.

Figura 10 - Biomassa da suspensão obtida do cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b em FES em 7,5 g da mistura contendo bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz a 37 ± 2 °C em diferentes tempos de cultivo



Fonte: o próprio autor (2017)

Nos cultivos realizados neste estudo com 1,5 g da mistura de resíduos agroindustriais (BC + FS + CA), a 37 ± 2 °C, nos intervalos de tempo 6, 9, 12, 18, 24, 48, 72 horas, a biomassa foi medida por contagem de unidades formadoras de colônias. Neste caso a biomassa passou de 1 x 10⁸ UFC mL⁻¹, em 6 horas de cultivo, para 134 x 10⁸ UFC mL⁻¹, em 18 horas de cultivo. A partir das 18 horas de

cultivo houve decréscimo da biomassa, atingindo 7×10^8 UFC mL⁻¹ em 72 horas de cultivo.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DA SURFACTINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

A CLAE foi empregada para a identificação e quantificação da surfactina produzida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b, cultivado em FES com a mistura de BC, FS e CA contendo 2,5 g de cada resíduo, como substrato. O microrganismo foi cultivado a 37 °C durante 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas.

O padrão de surfactina (100 µg mL⁻¹) e os extratos foram dissolvidos, em diferentes concentrações, na fase móvel do sistema, contendo acetonitrila e ácido trifluoroacético 3,8 mmol L⁻¹ (80:20, v/v). Foram injetados 20 µL na coluna cromatográfica em uma corrida de 45 minutos, com vazão de 1,0 mL min⁻¹.

A Figura 11 apresenta o cromatograma do padrão de surfactina na concentração de 100 µg mL⁻¹. O perfil cromatográfico apresenta 7 picos com tempos de retenção de 8,392 minutos, 9,725 minutos, 10,325 minutos, 12,208 minutos, 13,067, 14,100 minutos e 15,508 minutos. Porém, em nenhuma das amostras os picos 1 e 6 estavam presentes assim como os demais picos evidenciados na Figura 11. Sendo assim, foram considerados 5 picos (picos 2, 3, 4, 5 e 7), dos 7 apresentados na Figura 11, como sendo os homólogos da surfactina.

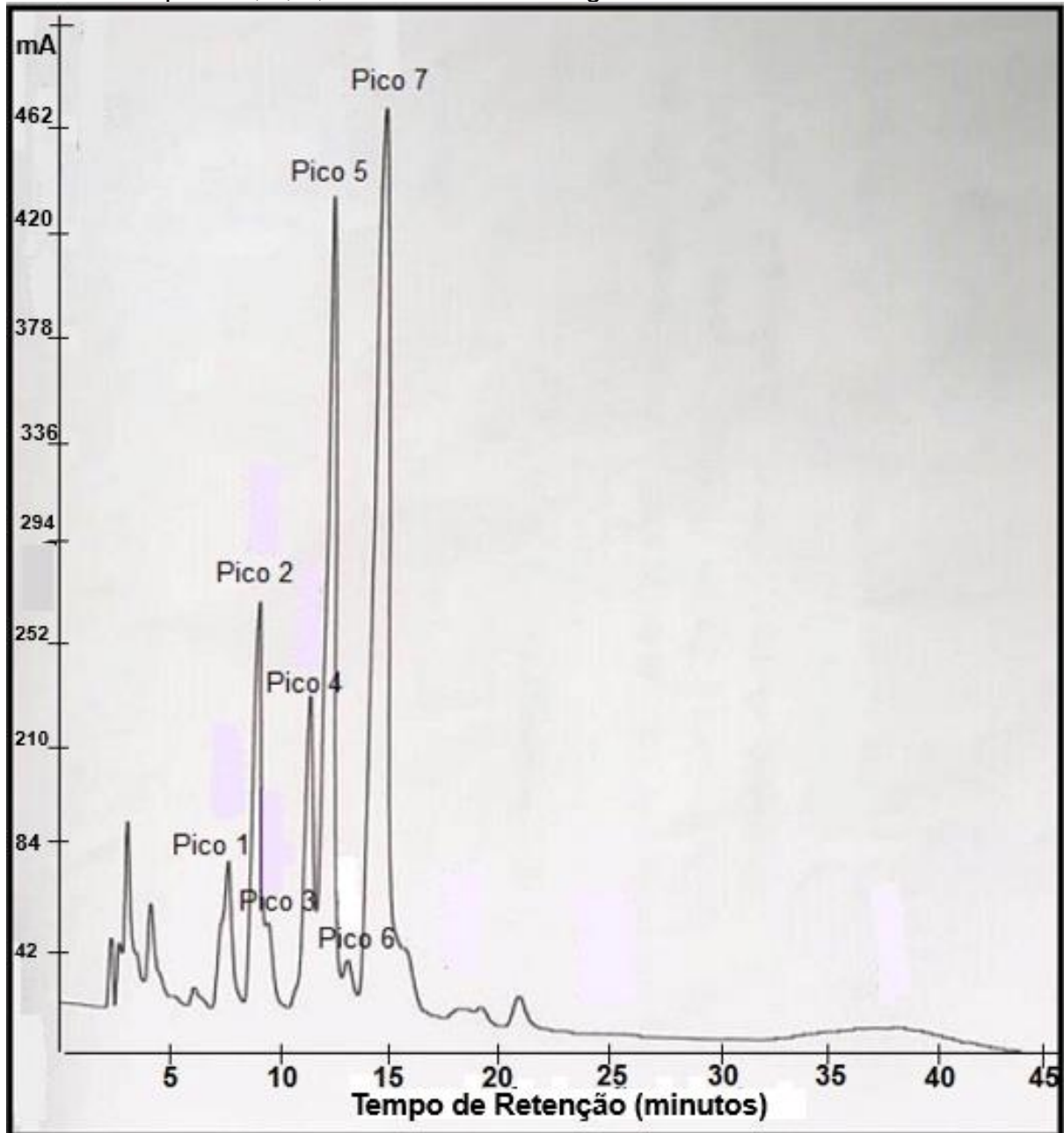
Os extratos liofilizados referentes a cada período de cultivo foram misturados e pesados, e o peso total de extratos sólidos referentes aos diferentes tempos de cultivo foram dissolvidos em mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 3,8 mmol L⁻¹ (80:20, v/v) em diferentes concentrações (Tabela 11), para serem analisados no sistema de CLAE.

Para determinar a concentração de surfactina presente em cada amostra foi feita a integração da área dos picos dos homólogos, e em seguida a área obtida foi aplicada na equação de regressão calculada através da curva analítica (Figura 12), construída em faixa de concentração de surfactina de 20 µg mL⁻¹ a 100 µg mL⁻¹.

Para determinar a quantidade de surfactina presente em todo o extrato obtido do processo fermentativo determinou-se a massa total do extrato orgânico seco (Tabela 11) e então relacionou-se a quantidade de surfactina obtida com aquela calculada pela equação de regressão.

Por fim, para o rendimento da surfactina em mg g^{-1} de substrato seco (mg gSS^{-1}), a massa de surfactina obtida foi dividida pela massa de substrato sólido utilizado. Todas estas determinações estão apresentadas na Tabela 11.

Figura 11 – Cromatograma do padrão de surfactina (Sigma-Aldrich) a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando os 7 picos, cujos tempos de retenção foram de 8,392 minutos, 9,725 minutos, 10,325 minutos, 12,208 minutos, 13,067 minutos, 14,100 minutos e 15,508 minutos. Os picos 2, 3, 4, 5 e 7 são os homólogos da surfactina



Fonte: o próprio autor (2017)

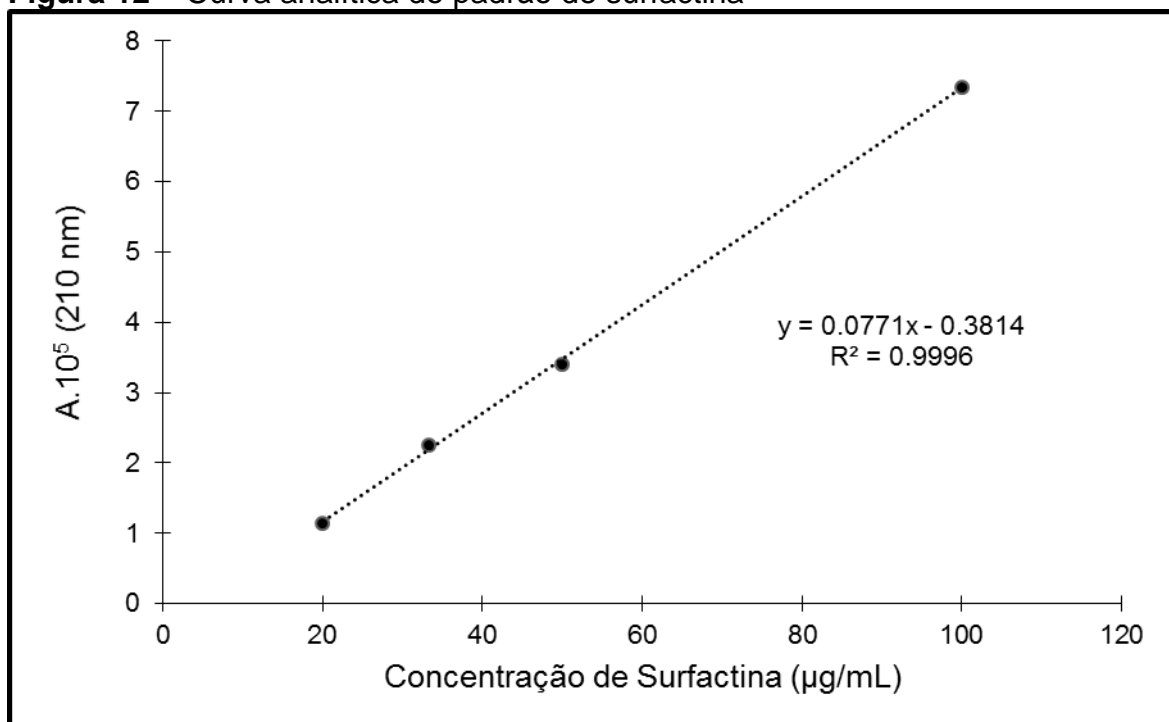
Tabela 11 - Massa de extrato seco obtido do processo fermentativo, em mg; concentração das amostras aplicadas no sistema de CLAE, em mg mL⁻¹; concentração de surfactina determinada pela equação de regressão linear proveniente da curva analítica, em µg mL⁻¹; concentração total de surfactina em relação à massa total de extrato seco, em mg mL⁻¹; rendimento de surfactina, em mg por grama de substrato seco

Tempo (horas)	Peso do extrato seco (mg)	Concentração das amostras (mg mL ⁻¹)	Surfactina (mg mL ⁻¹)	Rendimento de surfactina (mg gSS ^{-1*})
6	16,7	1,04	5,76	0,77
12	16,1	0,80	13,21	1,76
18	13,4	0,89	64,16	8,55
24	1,3	0,75	1,69	0,23
30	2,5	1,25	1,31	0,17
36	3,4	1,13	4,62	0,62
42	3,2	1,00	5,02	0,67
48	1,0	1,00	0,34	0,05

Fonte: o próprio autor (2017)

Mg gSS^{-1*}: miligramas por grama de substrato seco

Figura 12 – Curva analítica do padrão de surfactina



Fonte: o próprio autor (2017)

É possível verificar que houve pico na produção de surfactina em 18 horas de cultivo, atingindo 8,55 mg gSS⁻¹, mesmo período em que houve pico no crescimento celular (134×10^8 UFC mL⁻¹) nos cultivos com 1,5 g da mistura de BC, FS e CA. Já, a FES contendo 7,5 g da mistura de resíduos apresentou pico de biomassa em 24 horas de cultivo ($605 \mu\text{g mL}^{-1}$) seguido de decréscimo e aumento

novamente as 48 horas de cultivo, atingindo o máximo de $684 \mu\text{g mL}^{-1}$. Esta variação pode ter sido em função do aumento da quantidade de substrato disponível. A produção do biossurfactante em 6 horas de cultivo era de $0,77 \text{ mg gSS}^{-1}$, atingiu seu máximo de produção em 18 horas, com $8,55 \text{ mg gSS}^{-1}$, seguido de diminuição até as 30 horas de cultivo, atingindo $0,14 \text{ mg gSS}^{-1}$, aumentando até 42 horas, com $0,67 \text{ mg gSS}^{-1}$, e novamente decrescendo até as 48 horas de cultivo, atingindo $0,05 \text{ mg gSS}^{-1}$.

Heryani e Putra (2017) cultivaram as linhagens de *Bacillus sp.* BMN 14 e BMN 27 em processos fermentativos a 37°C e 140 rpm em agitador de banho térmico. O meio de fermentação consistiu de 10 % de um meio de propagação esterilizado e 90 % de meio de substrato. Este meio de substrato continha a mesma composição mineral do meio de propagação, porém não continha células. De modo a observar a performance dos microrganismos, 4 % (m/v) de glicose foi utilizada nos meios. Os tempos analisados foram de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 horas de cultivo. O biossurfactante produzido foi a surfactina e para quantificá-la os autores utilizaram a CLAE, acetonitrila com ácido acético 1 % como fase móvel, vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ e coluna mantida a 40°C .

Os autores analisaram a biomassa e produção de surfactina ao longo do tempo e observaram que houve aumento da massa celular até as 18 horas nas linhagens BMN 14 e BMN 27, atingindo aproximadamente $0,50 \text{ g L}^{-1}$ e $0,36 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, seguido pela produção do biossurfactante, que continuou a crescer até o fim do processo. Os autores acreditam que essa diminuição no crescimento após as 18 horas tenha se dado em função da produção do biossurfactante. Ainda, Jones e Greenfield (1984) afirmam que a inibição do crescimento de massa celular em alta concentração de produto é um fenômeno comum em processos fermentativo. Esta pode ser a explicação para o que ocorreu no presente trabalho, o qual apresentou pico de crescimento celular as 18 horas de cultivo, apresentando também pico de produção de surfactina neste período. Uma produção de aproximadamente $1,42 \text{ g L}^{-1}$ de surfactina foi obtida em 24 horas de cultivo da linhagem BMN 14. Em contrapartida, a linhagem BMN 27 produziu aproximadamente $0,62 \text{ g L}^{-1}$ no mesmo período. Isto implica que a produção de biossurfactante pela linhagem BMN 27 mostrou maior dependência pelo crescimento celular que a linhagem BMN 14. Conseqüentemente, a linhagem BMN 14 foi mais capaz de produzir o biossurfactante com glicose como substrato. Este resultado é

sustentado pelo maior aumento na tensão superficial com a linhagem BMN 14 (até $27,2 \text{ mN m}^{-1}$) que com a linhagem BMN 27 (até $34,3 \text{ mN m}^{-1}$). Os autores não observaram nenhuma mudança nos valores de tensão superficial em ambas as linhagens após as 18 horas. Segundo os autores, tal fato pode estar ligado à formação de outros produtos metabólicos, e conseqüentemente estes produtos metabólicos não afetaram a tensão superficial. Além disso, uma mudança na tensão superficial pode ter sido causada pela saturação de interface com as moléculas do surfactante (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008b).

Jajor et al. (2016) estudaram a biossíntese dos análogos estruturais da surfactina por *Bacillus subtilis*, KB1 e #309. As culturas foram incubadas ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 24 horas, 180 rpm) em meio Landy (LANDY et al., 1948). A curva de crescimento foi realizada com cultivo das cepas durante 12 horas em meio Luria-Bertani (LB) a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ com agitação a 150 rpm. Testes de atividade enzimática de protease e celulase foram realizados. Uma FES foi realizada em tubos de vidro contendo bolo de colza (couve-nabiça) misturada com solução bacteriana em razão de volume de bolo de colza e ar de 1:1, contendo 6,6 g de bolo de colza. Após 24 horas de fermentação uma amostra de 1,0 g foi coletada, suspensa em 8,0 mL de metanol, e extraída após 2 horas de incubação ($28 \text{ }^\circ\text{C}$, 180 rpm). A CLAE-UV utilizada em seguida. A fase móvel foi a mesma deste trabalho, com mudanças de gradiente durante o experimento, vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e detecção por UV a 210 nm para permitir a detecção dos homólogos da surfactina (sinal do grupo ácido da porção hidrofóbica).

As taxas de crescimento das duas cepas foram comparadas. Ambas as cepas atingiram a fase estacionária ao mesmo tempo (24 horas de cultivo). A cepa #309 atingiu densidade óptica maior e mostrou crescimento diáuxico (retomou o crescimento após 48 horas), perfil de crescimento semelhante ao encontrado neste trabalho nos cultivos da segunda FES (pico de crescimento em 24 horas, com retomada de crescimento em 48 horas de cultivo). Assim, em contraste à KB1, a cepa #309 passou por reprogramação metabólica, mostrando diferenças substanciais entre as cepas. Ambas cepas exibiram atividade enzimática extracelular semelhantes. *B. subtilis* KB1 e #309 produziram proteases e celulasas, enzimas avaliadas no atual trabalho. As cepas #309 e KB1 produziram 1,452 UA (unidades de atividade) e 1,436 UA de protease, e 1,60 UA e 1,70 UA de celulase, respectivamente, em 24 horas de cultivo. No atual trabalho, o microrganismo não produziu celulase, mas apresentou produção de protease, atingindo $0,524 \text{ U mL}^{-1}$

desta enzima em 24 horas de cultivo, o que equivale a aproximadamente um terço da atividade produzida pelos microrganismos referenciados no mesmo período de tempo.

Em relação à produção de surfactina, as cepas #309 e KB1 produziram 7,4 mg gSS⁻¹ e 10,9 mg gSS⁻¹, respectivamente. No atual trabalho, em 24 horas de cultivo, a produção de surfactina por grama de substrato seco foi de 0,23 mg gSS⁻¹, enquanto Jajor et al. (2016) produziu 7,4 mg gSS⁻¹ (#309) e 10,9 mg gSS⁻¹ (KB1) neste período. Porém, em 18 horas de cultivo, no atual trabalho foram produzidos 8,55 mg gSS⁻¹, resultado intermediário entre os produzidos pelas duas cepas em 24 horas.

Bugay (2009) cultivou o *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em quatro diferentes condições: FS durante 12 horas, FS com Okara em 24 horas de cultivo, FES com Okara em 36 horas de cultivo e FES com Okara e espuma de poliuretano em 48 horas de cultivo, todos utilizando glicerol como fonte de carbono para produção de surfactina. Para quantificar o biossurfactante produzido foi utilizada a CLAE, em equipamento acoplado a detectores SPA-10 UV/Vis a 210 nm e ESI-MS. Foi empregada mesma fase móvel deste trabalho em vazão de 0,6 mL min⁻¹. Assim como neste trabalho, foram visualizados cinco homólogos, denominados C₁₂, C₁₃, C₁₄, C₁₅ e C₁₆. O rendimento de biossurfactante por kg de substrato seco foi de 1,728 mg kgSS⁻¹ (FS com Okara, 24 horas), 410,4 mg kgSS⁻¹ (FES, com Okara, 36 horas) e 356,8 mg kgSS⁻¹ (FES, Okara/Espuma, 48 horas).

Geissler et al. (2017) cultivaram *B. subtilis* DSM 10T, *B. amyloliquefaciens* DSM 7Te *B. methylotrophicus* DSM 23117 e a análise cromatográfica do padrão apresentou tempos de retenção de 4,6 minutos, 5,4 minutos, 6,9 minutos, 7,4 minutos e 8,9 minutos. As quantidades de surfactina obtidas foram de 54,9 µg mL⁻¹ em 24 horas (*B. subtilis* DSM 10T), 2,1 µg mL⁻¹ em 48 horas (*B. amyloliquefaciens* DSM 7T) e 4,5 µg mL⁻¹ em 48 horas (*B. methylotrophicus* DSM 23117). Ao comparar a quantidade de surfactina produzida pelo *B. amyloliquefaciens* DSM 7T com o *B. amyloliquefaciens* MO-04B utilizado neste trabalho, ambos cultivados em 48 horas, tem-se que a cepa deste trabalho produziu 0,34 mg mL⁻¹ e a cepa DSM 7T, 2,1 µg mL⁻¹, ou 0,0021 mg mL⁻¹, quantidade inferior ao deste estudo.

Slivinski (2012) cultivou o *B. pumilus* UFPEDA 448 em FES utilizando bagaço de cana-de-açúcar e okara como substrato, em 48 horas de cultivo. O rendimento de surfactina por litro de solução umedecedora utilizando bagaço de

cana-de-açúcar e okara (1:1) em FES em 48 horas de cultivo a 37 °C em estufa bacteriológica foi de 0,484 g LSU⁻¹.

Bacillus DSM 10^T, DSM 3256, DSM 3258, DSM 1090, ATCC 21332 e LM43a50°C foram as linhagens empregadas por Willenbacher et al. (2014), os quais foram cultivados em biorreator. A surfactina obtida foi quantificada por CLAE-UV/vis. A solução padrão foi de 5 mM, e 11 amostras de surfactina em soluções de 0,01 a 5 mM foram preparadas. A fase móvel foi a mesma deste trabalho, em uma corrida de 25 minutos. Foram encontrados 6 picos para o padrão de surfactina entre os tempos de retenção de 6 e 13 minutos. As cepas DSM 1090, ATCC 21332, DSM 3258, DSM 10^T, LM43a50°C e DSM 3256 produziram 0,8 g, 1,33, 1,36 g, 0,8 g, 0,53 g e 0,08 g de surfactina.

Hsieh et al. (2004) cultivaram diferentes cepas de *Bacillus*, dentre elas o *B. amyloliquefaciens* B128^d, incubadas a 30 °C durante 120 horas. CLAE-UV/vis foi utilizada a uma vazão de 1,0 mL min⁻¹ e a mesma fase móvel deste trabalho, comprimento de onda de 210 nm. Foram encontrados seis picos representando os homólogos do padrão de surfactina. O *B. amyloliquefaciens* B128^d foi capaz de produzir 0,452 g L⁻¹ de surfactina, resultado superior aos encontrados neste trabalho.

B. subtilis ATCC 21332 foi incubado sob agitação de 200 rpm a 30 °C, durante 96 horas. Aplicou-se CLAE-UV/vis com mesma fase móvel deste trabalho, vazão de 2,2 mL min⁻¹, injeção de 30 µL e comprimento de onda de 205 nm. A concentração do padrão aplicado foi de 800 mg L⁻¹ e os picos obtidos tiveram tempos de retenção de 2,13 minutos, 2,57 minutos, 2,78 minutos, 3,43 minutos, 3,70 minutos, 4,14 minutos, 4,65 minutos, 5,06 minutos, 6,27 minutos, 6,46 minutos e 7,18 minutos. A curva padrão de surfactina foi construída em faixa de concentração de 10 e 1000 mg mL⁻¹. A concentração de surfactina produzida pelo microrganismo foi de 168,28 mg mL⁻¹ (MUBARAK et al., 2015).

6 CONCLUSÕES

- O *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b é capaz crescer em mistura de resíduos de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz e hidrolisar aproximadamente 25 % (m/m) do total da mistura de resíduos agroindustriais utilizados como substratos em 72 horas de cultivo em FES a 37 ± 2 °C ;
- Quanto à atividade enzimática, o *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b cultivado em 1,5 g da mistura de resíduos contendo bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz, incubado em diferentes tempos de cultivo, a 37 ± 2 °C, foi capaz de produzir as enzimas protease e xilanase, não produziu lacase e celulase, embora o gênero *Bacillus* já tenha sido relatado como produtos destas enzimas em condições específicas;
- O crescimento máximo do *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b cultivado em FES em mistura de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz contendo a mesma proporção de cada resíduo, a 37 ± 2 °C, se dá em torno de 18 a 24 horas de cultivo, sendo que entre 12 e 18 horas de cultivo foi o período em que houve maior produção de xilanase;
- A análise em cromatografia em camada delgada (CCD) não se mostrou eficiente para identificação e separação da surfactina produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b cultivado em FES em mistura de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz, a 37 ± 2 °C, em até 48 horas de cultivo;
- O *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b cultivado em FES em 7,5 g da mistura de resíduos bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz, a 37 ± 2 °C, em até 48 horas de cultivo, é capaz de produzir surfactina, tendo máxima produção em 18 horas de cultivo;

REFERÊNCIAS

ACMITE MARKET INTELLIGENCE. **Global Surfactant Market**. Market Report. Ratingen. 4 ed, 605 p, abr. 2016.

ABDALLAH, D. B.; FRIKHA-GARGOURI, O.; TOUNSI, S. *Bacillus amyloliquefaciens* strain 32a as a source of lipopeptides for biocontrol of *Agrobacterium tumefaciens* strains. **Journal of Applied Microbiology**, Sfax, v. 119, n. 1, p. 196 – 207, mar. 2015.

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A. H. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Cairo, v. 150, n.3, p. 305–325, setemb. 2008a.

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWAFI, M. M.; HASSOUNA, N. A. H.. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Cairo, v. 150, n. 3, p. 289 – 303, abr. 2008b.

ACIOLY, L. M. L. **Produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* UCP 0999 EM substratos não convencionais e de baixo custo**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Pernambuco, 2009.

AGRIFANUAL 2015. **Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP – Consultoria & Agroinformativos, p. 409 – 444, 2015.

AL-AJLANI, M.M.; SHEIKH, M.A.; AHMAD, Z.; HASNAIN, S. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium, **Microbial Cell Factories**, Lahore, v. 6, n. 17, p. 01 – 08, jun. 2007.

ALVAREZ, F.; CASTRO, M.; PRÍNCIPE, A.; BORIOLI, G.; FISCHER, S.; MORI, G.; JOFRÉ, E. The plant-associated *Bacillus amyloliquefaciens* strains MEP2 18 and ARP2 3 capable of producing the cyclic lipopeptides iturin or surfactin and fengycin are effective in biocontrol of sclerotinia stem rot disease, **Journal of Applied Microbiology**, Córdoba, v. 112, n. 1, p. 159 – 174, jan. 2012.

ALVAREZ, V. M.; JURELEVICIUS, D.; MARQUES, J. M.; SOUZA, P. M.; ARAÚJO, L. V.; BARROS, T. G.; SOUZA, R. O. M. A.; FREIRE, D. M. G.; SELDIN, L. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Rio de Janeiro, v. 136, n. 1, p. 14 – 21, dez. 2015.

ALVES, P. D. **Avaliação cromatográfica e atividade antimicrobiana de produtos preparados com nim (*Azadirachta indica* A. Juss., *Meliaceae*)**. 2007. 62 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2007.

AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Sultan Qaboos, v. 114, n. 1, p. 324 – 333, fev. 2014.

AMORE, A.; PARAMESWARAN, B. KUMAR, R.; BIROLO, L.; VINCIGUERRA, R.; MARCOLONGO, L.; IONATA, E.; LA CARA, F.; PANDEY, A.; FARACO, V. Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Napoli, v. 90, n. 3, p. 573 – 581, nov. 2014.

ARGUELLES-ARIAS, A.; ONGENA, M.; HALIMI, B.; LARA, Y.; BRANS, A.; JORIS, B.; FICKERS, P. *Bacillus amyloliquefaciens* GA1 as a source of potent antibiotics and other secondary metabolites for biocontrol of plant pathogens. **Microbial Cell Factories**, Liege, v. 8, n. 63, p. 1 – 12, nov. 2009.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide-lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*, isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Tóquio, v. 31, n. 3, p. 488 – 494, mai. 1968.

AYED, H.B.; HMIDET, N.; BÉCHET, M.; CHOLLET, M.; CHATAIGNÉ, G.; LECLÈRE, V.; JACQUES, P.; NASRI, M. Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21, **Process Biochemistry**, Sfax, v. 49, n. 10, p. 1699 – 1707, out. 2014.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. International testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, Espoo, v. 23, n. 3, p. 257 – 270, mai. 1992.

BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, n. 2, p. 427 – 444, abr. 2010.

BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; KURTBÖKE, I.; HARY, G. E. S. Vertryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on

the polymeric dye Poly R-478. **Letters in Applied microbiology**, Murdoch, v. 23, n. 2, p. 93 - 96, ago. 1996.

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

BARROS, F. F. C. ; DE QUADROS, C. P.; PASTORE, G. M. Studies of emulsifying properties and stability of the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cassava wastewater. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 979 – 985, out. 2008.

BAUMGART, F.; KLUGE, B.; ULLRICH, C.; VATER, J.; ZIESSOW, D. Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Berlim, v. 177, n. 3, p. 998 – 1005, jun. 1991.

BECHARD, J.; EASTWELL, K.C.; SHOLBERG; MAZZA, G.; SKURA, B. Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, British Columbia, v. 46, n. 12, p. 5355 – 5361, nov. 1998.

BUGAY, C. **Biossurfactantes produzidos por *Bacillus sp.*: estudos de produção e caracterização**. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2009.

CAGRI-MEHMETOGLU, A.; KUSAKLI, S.; VAN DE VENTER, M. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. **Journal of Dairy Science**, Sakarya, v. 95, n.7, p. 3643 – 3649, jul. 2012.

CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S.; KAUR, J.; MEHTA, S. K. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 672, p. 261 – 280, 2010.

CAMILIOS NETO, D.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Otimização da produção de rhamnolípids por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Curitiba, v. 81, n. 3, p. 441 – 448, out. 2008.

CAO, X.H.; LIAO, Z.Y.; WANG, C.L.; CAI, P.; YANG, W.Y.; LU, M.F.; HUANG, G.W. Purification and antitumour activity of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus natto* TK. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, Tianjin, v. 52, n. 2, p. 97 – 106, fev. 2009a.

CAO, X.H.; WANG, A.H.; JIAO, R.Z.; WANG, C.L.; MAO, D.Z.; YAN, L.; ZENG, B. Surfactin induces apoptosis and G(2)/M arrest in human reast cancer MCF-7 cells through cell cycle factor regulation. **Cell Biochemistry and Biophysics**, Tianjin, v. 55, n. p. 163 – 171, dez. 2009b.

CAWOY, H.; MARIUTTO, M.; HENRY, G.; FISHER, C.; VASILYEVA, N.; THONART, P.; DOMMES, J.; ONGENA, M. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Gembloux, v. 27, n. 2, p. 87 – 100, out. 2014.

CHA, M.; LEE, N.; KIM, M.; KIM, M.; LEE, S. Heterologous production of *Pseudomonas aeruginosa* EMS1 biosurfactant in *Pseudomonas putida*. **Bioresource Technology**, Seoul, v. 99, n. 7, p. 2192 – 2199, mai. 2008.

CHANG, C.C.; CHEN, M.C.; HO, T.F.; WU, H.S.; WEI, Y.H. Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Taoyuan, v. 111, n. 5, p. 501 – 511, mai. 2011.

CHEN, H. L.; CHEN, Y. S.; JUANG, R. S. Recovery of surfactin from fermentation broths by a hybrid salting-out and membrane filtration process. **Separation and Purification Technology**, Chang Gung, v. 59, n. 3, p. 244 – 252, mar. 2008.

CHEN, H.L.; JUANG, R.S. Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction. **Biochemical Engineering Journal**, Chang Gung, v. 38, n. 1, p. 39 – 46, jan. 2008.

CHEN, W. C.; JUANG, R. S.; WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, Chang Gung, v. 103, p. 158 – 169, nov. 2015.

CHI, Z.; RONG, Y. J.; LI, Y.; TANG, M. J.; CHI, Z. M. Biosurfactins production by *Bacillus amyloliquefaciens* R3 and their antibacterial activity against multi-drug resistant pathogenic *E. coli*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Qingdao, v. 38, n. 5, p. 853 – 861, mai. 2015.

COMPAORÉ, C. S.; NIELSEN, D. S.; OUOBA, L. I. I.; BERNER, T. S.; NIELSEN, K. F.; SAWADOGO-LINGANI, H.; DIAWARA, B.; OUÉDRAOGO, G. A.; JAKOBSEN, M.; THORSEN, L. Co-production of surfactin and a novel bacteriocin by *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* H4 isolated from Bikalga, an African alkaline Hibiscus sabdariffa seed fermented condiment. **International Journal of Food Microbiology**, Ouagadougou, v. 162, n. 3, p. 297 – 307, jan. 2013.

COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF, S.J.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, Ontario, v. 42, n. 3, p. 408 – 412, jun. 1981.

DAE, K.S.; CHO, J.Y.; PARK, H.J.; LIM, C.R.; LIM, J.H. ; YUN, H.I.; PARK, S.C.; KIM, S.K.; RHEE, M.H. A comparison of the anti-inflammatory activity of surfactin A, B C and D from *B. subtilis*, **Journal of Microbiology and Biotechnology**, Chuncheon, v. 16, n. 10, p. 1656 – 1659, jun. 2006.

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21,332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, Londres, v. 25, n. 3 – 5, p. 322 – 329, ago. 1999.

DE MARCO, É. G. **Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de *Bacillus sp.*** 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

DEBOIS, D.; FERNANDEZ, O.; FRANZIL, L.; JOURDAN, E.; DE BROGNIEZ, A.; WILLEMS, L.; CLÉMENT, C.; DOREY, S.; DE PAUW, E.; ONGENA, M. Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. **Environmental Microbiology Reports**, Liège, v. 7, n. 3, p. 570 – 582, jun. 2015.

DECESARO, A.; RIGON, M.R. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. **Química Nova**, Paso Fundo, v. 36, n. 7, p. 947 – 954, abr. 2013.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 3, p.350 – 356, mai.1956.

ELAZZAZY, A. M.; ABDELMONEIM, T.S.; ALMAGHRABI, O.A. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Jeddah, v. 22, n. 4, p. 466 – 475, jul. 2015.

FAHIM, S.; DIMITROV, K.; VAUCHEL, P.; GANCEL, F.; DELAPLACE, G.; JACQUES, P.; NIKOV, I. Oxygen transfer in three phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. **Biochemical Engineering Journal**, Lausanne, v. 76, p. 70 – 76, 2013.

FARIA, A. F.; TEODORO-MARTINEZ, D. S.; BARBOSA, G. N. O.; VAZ, B. G.; SILVA, I. S.; GARCIA, J. S.; TÓTOLA, M. R. T; EBERLIN, M. N. E.; GROSSMAN, M. ALVES, O. L.; DURRANT, L. R. Production and structural characterization of surfactin (C₁₄/Leu₇) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, Campinas, v. 46, n. 10, p. 1951 – 1957, out. 2011.

FERNANDES, P. A. V.; ARRUDA, I. R. D.; SANTOS, A. F. A. B. D.; ARAÚJO, A. A. D.; MAIOR, A. M. S.; XIMENES, E. A. Antimicrobial Activity of surfactants produced by *Bacillus subtilis* R14 against multidrug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 704 – 709, 2007.

FONSECA, R.R.; SILVA, A.J. ; DE FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L.; SÉRVULO, E.F. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain, **Appl. Biochem. Biotechnol.** 137–140, 471–486, out. 2007.

FONTANA, J. D; GEBARA, M.; BLUMEL, M.; SCHNEIDER, H.; MACKENZIE, C. R.; JHNSON, K. G. α -4-O-methyl-D-glucuronidase componente xylanolytic complexes. **Methods in Enzymology**, v. 160, p. 560 – 571, 1988.

FRANÇA, I. W. L.; LIMA, A. P.; LEMOS, J. A. M.; LEMOS, C. G. F.; MELO, V. M.; SANT'ANA, H. B.; GONÇALVES, L. R. B. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis Today**, Fortaleza, v. 255, n. 15, p. 10 – 15, out. 2015.

GAUTAM, K.K.; TYAGI, V.K. Microbial surfactants: A Review **Journal of Oleo science**, Kanpur, v. 55, n. 4, p.155 – 166, 2006.

GEISSLER, M.; OELLIG, C.; MOSS, K.; SCHWACK, W.; HENKEL, M.; HAUSMANN, R. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) for the simultaneous quantification of the cyclic lipopeptides Surfactin, Iturin A and Fengycin in culture samples of *Bacillus* species. **Journal of Chromatography. B**,

Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, Stuttgart, v. 1044 – 1045, p. 214 – 224, fev. 2017.

GHRIBI, D.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. **Biotechnology Research International**, Sfax, v. 2011, ID 653654, 6 páginas, jul. 2011.

GIRO, M.E.; MARTINS, J.J.; ROCHA, M.V.; MELO, V.M.; GONÇALVES, L.R. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor, **Biotechnology Journal**, Fortaleza, v. 4, n. 5, p. 738 – 747, mai. 2009.

GRANZOTTO, G.; MARCELINO, P. R. F.; BARBOSA, A. M.; RODRIGUES, E. P.; REZENDE.M. I.; OLIVEIRA, A. L. M. Culturable bacterial pool from aged petroleum-contaminated soil: identification of oil-eating *Bacillus* strains. **Annals Microbiology**, v. 62, n. 4, p.1681 – 1690, fev. 2012.

GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, E. C.; RODRIGUES, A. I.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture médium. **Frontiers in Microbiology**, Braga, v. 6, p. 59, fev. 2015.

GUEZ, J.S.; MÜLLER, C.H.; DANZE, P.M.; BÜCHS, J.; JACQUES, P. Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC6633, **Journal of Biotechnology**, Villeneuve d'Ascq, v. 134, n. 1 – 2, p. 121 – 126, mar. 2008.

GURJAR, J. SENGUPTA, B. Production of surfactin from rice mill polishing residue by submerged fermentation using *Bacillus subtilis* MTCC 2423. **Bioresource Technology**, Vadodara, v. 189, p. 243 – 249, ago. 2015.

HADDAD, N.I.; WANG, J.; MU, B. Identification of a biosurfactant producing strain: *Bacillus subtilis* HOB2, **Protein & Peptide Letters**, Shanghai, v. 16, n. 1, p. 7 – 13, 2009.

HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 48, n. 2, p. 422 – 427, set. 1972.

HAZRA, C.; KUNDU, D.; CHAUDHARI, A. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus clausii* BS02 using sunflower oil soapstock: evaluation of high throughput screening methods, production, purification, characterization and its insecticidal activity. **RSC Advances**, Jalgaon, v. 5, p. 2974 – 2982, 2015.

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes. **Biophysical Journal**, Basel, v. 81, n. 3, p. 1547 – 1554, set. 2001.

HEERKLOTZ, H.; WIEPRECHT, T.; SEELIG, J. Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by Deuterium NMR, **The Journal of Physical Chemistry**, Basel, v. 108, n. 15, p. 4909 – 4915, mar. 2004.

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. **European Biophysics Journal**, Basel, v. 36, n. 4 – 5, p. 305 – 314, mai. 2007.

HERYANI, H.; PUTRA, M. D. Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. **Electronic Journal of Biotechnology**, Kalimantan Selatan, v. 27, p. 49 – 54, mai. 2017.

HIRADATE, S.; YOSHIDA, S.; SUGIE, H.; YADA, H.; FUJII, Y. Mulberry anthracnose antagonists (iturins) produced by *Bacillus amyloliquefaciens* RC-2. **Phytochemistry**, Ibaraki, v. 61, n. 6, p. 693 – 698, nov. 2002.

HOSONO, K.; SUZUKI, H. Acylpeptides the inhibitors of cyclic adenosine 3'5'-monophosphate phosphodiesterase. III. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase, **The Journal of Antibiotics**, Tóquio, v. 36, n. 6, p. 679 – 683, 1983.

HSIEH, F.C.; LI, M.C.; LIN, T.C.; KAO, S.S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. **Current Microbiology**, Taichung Hsien, v. 49, n. 3, p.186 – 191, set. 2004.

IGLESIAS-FERNÁNDEZ, J.; DARRÉ, L.; KOHLMAYER, A.; THOMAS, R. K.; SHEN, H.; DOMENE, C. Surfactin at the Water/Air Interface and in Solution. **Langmuir**, Londres, v. 31, n. 40, p. 11097 – 11104, set. 2015.

INÈS, M.; DHOUHA, G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, Tunísia, v. 71, p. 100 – 112, set. 2015.

JAJOR, P.; PILAKOWSKA-PIETRAS, D.; KRASOWSKA, A.; LUKASZEWICZ, M. Surfactin analogues produced by *Bacillus subtilis* strains grown on rapeseed cake. **Journal of Molecular Structure**, v. 1126, Wroclaw, p, 141 – 146, fev. 2016.

JONES, R. P.; GREENFIELD, P. F. A review of yeast ionic nutrition. I. Growth and fermentation requirements. **Process Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 48 – 60, abr. 1984.

JORK, H. H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WIMMER, H. **Thin-Layer Chromatography Reagents and Detection Methods**, v. 1: Physical and Chemical Detection Methods: Fundamentals, Reagents, VHC, Weinheim, Germany, 1990.

KAKINUMA, A.; HORI, M.; ISONO, M.; TAMURA, G. Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, n. 12, p. 971 – 972, 1969.

KHEDHER, S. B.; BOUKEDI, H.; KILANI-FEKI, O.; CHAIB, I.; LAARIF, A.; ABDELKEFI-MESRATI, L.; TOUNSI, S. *Bacillus amyloliquefaciens* AG1 biosurfactant: Putative receptor diversity and histopathological effects on *Tuta absoluta* midgut. **Journal of Invertebrate Pathology**, Sfax, v. 132, p. 42 – 47, ago. 2015.

KHIRE, J.M. Bacterial Biosurfactants, and Their Role in Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). In **Biosurfactants**; Sen, R., Ed.; Springer New York: New York, NY, USA, v. 672; p. 146 – 157, 2010.

KHOPADE, A.; BIAO, R.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiosis sp.* B4, **Desalination**, Pune, v. 285, n. 31, p. 198 – 204, jan. 2012.

KIM, K.; JUNG, S.Y.; LEE, D.K.; JUNG, J.K.; PARK, J.K.; KIM, D.K.; LEE, C.H. Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A2. **Biochemical Pharmacology**, Kyonggi-Do, v. 55, n. 7, p. 975 – 985, abr. 1998.

KIM, S.Y.; KIM, J.Y.; KIM, S.H.; BAE, H.J.; YI, H.; YOON, S.H.; KOO, B.S.; KWON M.; CHO, J.Y.; LEE, C.E.; HONG, S. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. **FEBS Letters**, Suwon, v. 581, n. 5, p. 865 – 871, mar. 2007.

KONISHI, M.; YOSHIDA, Y.; HORIUCHI, J. I. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corn cob hydrolysate medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Hokkaido, v. 119, n. 3, p. 317– 322, 2015.

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* okb 105. **Journal of Colloid and Interface Science**, Berlim, v. 204, n. 1, p. 1 – 8, ago. 1998.

KRACHT, M.; ROKOS, H; OZEL, M.; KOWALL, M.; PAULI, G.; VATER, J. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. **The Journal of Antibiotics**, v. 52, n. 7, p. 613 – 619, jul. 1999.

LADEIRA, S. A. **Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulasas e xilanas por espécies de *bacillus sp.*** 2013. 139 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, 2013.

LAI, C.C.; HUANG, Y.C.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil, **Journal of Hazardous Materials**, Tainan, v. 167, n. 1 – 3, p. 609 – 614, ago. 2009.

LANDY, M. WARREN, G. H.; ROSENMAN, S. B.; COLIO, L. G. Bacillomycin; an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 67, n. 4, p. 539 – 541, abr. 1948.

LIMA, C. J. B. **Produção de biossurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* empregando óleo de soja residual.** 2007. 168 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2007.

LIU, X. Y.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Molecular structures of microbial lipopeptides. **Biotechnology Bulletin**, v. 4, p. 18 – 26, jan. 2005.

LIU, X.Y.; HADDAD, N.I.A.; YANG, S.Z.; MU, B.Z. Structural characterization of eight cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* HSO121. **Protein & Peptide Letters**, Shanghai, v. 14, n. 8, p. 766 – 773, fev. 2007.

LIU, X.Y.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Isolation and characterization of a C12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. **Journal of Peptide Science**, Shanghai, v. 14, n. 7, p. 864 – 875, fev. 2008.

LIU, X.Y.; YANG, S.Z.; MU, B.Z. Production and characterization of a C15-surfactin-O-methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1144 – 1151, out. 2009.

LIU, X.Y.; TAO, X.; ZOU, A.; YANG, S.; ZHANG, L.; MU, B. Effect of the microbial lipopeptide on tumor cell lines: apoptosis induced by disturbing the fatty acid composition of cell membrane. **Protein Cell**, Shanghai, v. 1, n. 6, p. 584 – 594, mai. 2010.

LIU, X.; REN, B.; GAO, H.; LIU, M.; DAI, H.; SONG, F.; YU, Z.; WANG, S.; HU, J.; KOKARE, C. R.; ZHANG, L. Optimization for the Production of Surfactin with a New Synergistic Antifungal Activity. **PLoS ONE**, Beijing, v. 7, n. 5, p. 1 – 9, mai. 2012.

LIU, J. F.; MBADINGA, S. M.; YANG, S. Z.; GU, J. D.; MU, B. Z. Chemical Structure, Property and Potential Applications of Biosurfactants Produced by *Bacillus subtilis* in Petroleum Recovery and Spill Mitigation. **International Journal of Molecular Sciences**, Shanghai, v. 16, n. 3, p. 4814 - 4837, mar. 2015.

LOISEAU, C.; SCHLUSSELHUBER, M.; BIGOT, R.; BERTAUX, R.; BERJEAUD, J. M.; VERDON, J. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays an unexpected anti-Legionella activity. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Poitiers Cedex, v. 99, n. 12, p. 5083 – 5093, jun. 2015.

MA, Z.; HU, J. Production and Characterization of Surfactin-Type Lipopeptides as Bioemulsifiers Produced by a *Pinctada martensii*-Derived *Bacillus mojavensis* B0621A. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Shenyang, v. 177, n. 7, p. 1520 – 1529, dez. 2015.

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

MANDELS, M., ANDREOTTI, R., ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. **Biotechnology and bioengineering symposium**, v. 16, n. 6, p. 21 – 33, fev. 1976.

MARCHANT, R., BANAT, I. M., Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology Letters**, Northern Ireland, v. 34, n. 9, p. 1597 – 1605, set. 2012.

MARIN, C. P.; KASCHUK, J. J.; FROLLINI, E.; NITSCHKE, M. Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production. **Industrial Crops and Products**, São Paulo, v. 66, p. 239 – 245, abr. 2015.

MARTI, M.E.; COLONNA, W.J.; PATRA, P.; ZHANG, H.; GREEN, C.; REZNIK, G.; PYNN, M.; JARRELL, K.; NYMAN, J.A.; SOMASUNDARAN, P. Production and characterization of microbial biosurfactants for potential use in oil-spill remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, Ames, v. 55, p. 31 – 39, fev. 2014.

MARTI, M. E.; COLONNA, W. J.; GABRIEL REZNIK, G.; PYNN, M.; JARRELL, K.; LAMSAL, B.; GLATZ, C. E. Production of fatty-acyl-glutamate biosurfactant by *Bacillus subtilis* on soybean co-products. **Biochemical Engineering Journal**, Ames, v. 95, p. 48 – 55, mar. 2015.

MASSI, J.B. **Farelo de soja e casca de arroz para a produção de lipopetideos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b**. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, 2014.

MILLER G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Massachusetts, v. 31, n. 3, p. 426 – 428, mar. 1959.

MIRELES II, J.R.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R.M. *Salmonella* enterica serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, Texas, v. 183, n. 20, p. 5848 – 5854, out. 2001.

MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation. v.1, ed. 1, **Heidelberg: Springer**, 450 p., 2006.

MUBARAK, M. Q. E.; HASSAN, A. R.; HAMID, A. A.; KHALIL, S.; ISA, M. H. M. A Simple and Effective Isocratic HPLC Method for Fast Identification and Quantification of Surfactin. **Sains Malaysiana**, Malásia, v. 44, n. 1, p. 115 – 120, fev. 2015.

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

MUTHUKUMARASAMY, N. P.; JACKSON, B.; RAJ, A. J.; SEVANAN, M. Production of Extracellular Laccase from *Bacillus subtilis* MTCC 2414 Using Agroresidues as a Potential Substrate. **Biochemistry Research International**, Coimbatore, v. 2015, n. 2015, 9 p., set. 2015.

NAM, J.; JUNG, M. Y.; KIM, P. I.; LEE, H. B.; KIM, S. W.; LEE, C. W. Structural Characterization and Temperature-dependent Production of C17-Fengycin B Derived from *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* BC32-1. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, Gwangju, v. 20, n. 4, p. 708 – 713, ago. 2015.

NAM, H. S.; YANG, H. J.; OH, B. J.; ANDERSON, A. J.; KIM, Y. C. Biological Control Potential of *Bacillus amyloliquefaciens* KB3 Isolated from the Feces of *Allomyrina dichotoma* Larvae. **The Plant Pathology Journal**, Gokseong, v. 32, n. 3, p. 273 – 280, fev. 2016.

NELSON, N. A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biochemistry**, Cincinnati, v.153, n. 3, p. 376 – 380, fev. 1944.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater, **Bioresource Technology**, Campinas, v. 97, n. 2, p. 336 – 341, jan. 2006.

NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Structure and Applications of a Rhamnolipid Surfactant Produced in Soybean Oil Waste. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, São Carlos, v. 160, n. 7, p. 2066 – 2074, abr. 2010.

NOAH, K.S.; BRUHN, D.F.; BALA, G.A. Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Idaho, v. 122, n. 1, p. 465 – 473, mar. 2005.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Production of a lipopeptide antibiotic surfactin with recombinant *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Letters**, Tóquio, v. 14, n.12, p. 1165 – 1168, out. 1992.

OHNO, A.; ANO, T.; SHODA, M. Effect of Temperature on Production of Lipopeptide Antibiotics, Iturin A and Surfactin by a Dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid-State Fermentation. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Tóquio, v. 80, n. 5, p. 517 – 519, dez. 1995.

OLIVEIRA, F. H. P. C. Fisiologia de *Bacillus subtilis* R14: Crescimento e produção de lipopeptídeos em cultivos descontínuos. 2006. 68 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

PADILHA, I.Q.M.; CARVALHO, L.C.T.; DIAS, P.V.S.; GRISI, T.C.S.L.; SILVA, F.L.H.; SANTOS, S.F.M.; ARAÚJO, D.A.M. **Produção e caracterização parcial de**

celulase termofílica de *Bacillus sp.* utilizando bagaço de cana. 52^o Congresso Brasileiro de Química. Recife, 2012.

PAPI, M. C. **Biossurfactantes de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b: Produção, otimização e caracterização molecular.** 2013. 113 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

PARTOVI, M.; LOTFABAD, T. B.; ROOSTAAZAD, R.; BAHMAEI, M.; TAYYEBI, S. Management of soybean oil refinery wastes through recycling them for producing biosurfactant using *Pseudomonas aeruginosa* MR01. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Tehran, v. 29, n. 6, p. 1039 – 1047, jan. 2013.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Villeurbanne, v. 51, n. 5, p. 553 – 563, mai. 1999.

PONTE ROCHA, M.V. Produção de biossurfactantes por fermentação submersa usando substrato não convencional. 2007. 124 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2007.

PONTE ROCHA, M.V.; GOMES BARRETO, R.V.; MELO, V.M.; BARROS GONÇALVES, L.R. Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI008, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Fortaleza, v. 155, n. 1, p. 366 – 378, mai. 2009.

RAJPUT, S.; RAJPUT, S.; KUMAR, B. N. P.; SARKAR, S.; DAS, S.; AZAB, B.; SANTHEKADUR, P. K.; DAS, S. K.; EMDAD, L.; SARKAR, D.; FISHER, P. B.; MANDAL, M. Targeted apoptotic effects of thymoquinone and tamoxifen on XIAP mediated Akt regulation in breast cancer. **PLOS ONE**, West Bengal, v. 8, n. 4, p. 1 – 13, abr. 2013.

RAMÍREZ, I. M.; TSAOUSI, K.; RUDDEN, M.; MARCHANT, R.; ALAMEDA, E. J.; ROMÁN, M. G.; BANAT, I. M. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. **Bioresource Technology**, Granada, v. 198, p. 231 – 236, dez. 2015.

RIVERA, O. M. P.; MOLDES, A. B.; TORRADO, A. M.; DOMÍNGUEZ, J. M. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. **Process Biochemistry**, San Luis Potosí, v. 42, n. 6, p. 1010 – 1020, mar. 2007.

RODRIGUES NETO, J.; MALAVOLTA JÚNIOR, V. A.; VICTOR, O. Meio simples para o isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. **Summa Phytopathologica**, São Paulo, v. 12, n. 1 – 2, p. 16, 1986.

ROONGSAWANG, N.; THANİYAVARN, J.; THANİYAVARN, S.; KAMEYAMA, T.; HARUKI, M.; IMANAKA, T.; MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Isolation and characterization of a halotolerant *Bacillus subtilis* BBK-1 which produces three kinds of lipopeptides: bacillomycin L, plipastatin, and surfactin. **Extremophiles**, Osaka, v 6, n. 6, p. 499 – 506, dez. 2002.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Tel Aviv, v. 52, n. 2, p. 154 – 162, set. 1999.

SABATÉ, D. C.; AUDISIO, M. C. Inhibitory activity of surfactin, produced by different *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* strains, against *Listeria monocytogenes* sensitive and bacteriocin-resistant strains. **Microbiological Research**, Salta, v. 168, n. 3, p. 125 – 129, mar. 2013.

SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S. Action of biosurfactant producing thermophilic *Bacillus subtilis* on waxy crude oil and long chain paraffins. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Chennai, v. 105, p. 168 – 177, nov. 2015.

SAMAD, A.; ZHANG, J.; CHEN, D.; LIANG, Y. Sophorolipid Production from Biomass Hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Illinois, v. 175, n. 4, p. 2246 – 2257, fev. 2015.

SANTOS, L. M. **Perfil de Enzimas Extracelulares Produzidas por *Bacillus amyloquefaciens* MO.04b sob Condição de Fermentação em Estado Sólido**. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

SANTOS, L. M. **Farelo de soja e farelo de milho como substratos na produção de amilase e protease por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b**. 2015. 113 f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, 2015.

SCHALLER, K.D.; FOX, S.; BRUHN, D.; NOAH, K.; BALA, G. Characterization of surfactin from *Bacillus subtilis* for application as an agent for enhanced oil recovery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Idaho, v. 115, n. 1, p. 827 – 836, mar. 2004.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin, **Process Biochemistry**, West Bengal, v. 40, n. 9, p. 2953 – 2958, set. 2005.

SEN, R.; BACK, N.; COHEN, I. R.; LAJTHA, A.; LAMBRIS, J. D.; PAOLETTI, R. Surfactin: Biosynthesis, Genetics and Potential Applications. In: Ramkrishna Sen. (Org.). *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **Biosurfactants**. New York: Springer Science+Business media, LCC, Landes Bioscience, v. 672, p. 316-323, 2010.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications, **Central European Journal of Medicine**, Prague, v. 3, n. 2, p. 123 – 133, jun. 2008.

SHALIGRAM, N.S.; SINGHAL, R.S. Surfactin—a review on biosynthesis fermentation, purification and applications, **Food Technology and Biotechnology**, Croácia, v. 48, n. 2, p. 119 – 134, abr. 2010.

SHEPPARD, J.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Montreal, v. 27, n. 2, p. 110 – 116, nov. 1987.

SHEPPARD, J.D.; JUMARIE, C.; COOPER, D.G.; LAPRADE, R. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Montreal, v. 1064, n 1, p. 13 – 23, abr. 1991.

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

SLIVINSKI, C. T. **Produção de surfactina por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana e okara como substrato**. 2012. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SOARES, D.W.F. **Produção e caracterização de biossurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus sp.* isoladas de estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais** (Ceará – Brasil). 2014, 202 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de Granada, Fortaleza, 2014.

SOMOGYI, M.A. A new reagent for determination of sugars. **Journal of Biological Chemistry**, v. 160, p. 61 – 68, mai. 1945.

SOUSA, M.; MELO, V. M. M.; RODRIGUES, S.; SANT'ANA, H. B.; GONÇALVES, L. R. B. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, Fortaleza, v. 35, n. 6, p. 897 – 906, ago. 2012.

SOUSA, M.; DANTAS, I. T.; FELIX, A. K. N; SANT'ANA, H. B.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Crude Glycerol from Biodiesel Industry as Substrate for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Fortaleza, v. 57, n. 2, p. 295 – 301, mar. 2014.

TENDULKAR, S.R.; SAIKUMARI, Y.K.; PATEL, V.; RAGHOTAMA, S.; MUNSHI, T.K.; BALARAM, P.; CHATTOO, B.B. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen magnaporthe grisea. **Journal of Applied Microbiology**, Berlim, 103, 2331–2339, 2007.

THOMPSON, D. N.; FOX, S. L.; BALA, G. A. The effect of pretreatments on surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Idaho, v. 91, n. 1, p. 487 – 501, mar. 2001.

VATER, P.J.; KABLITZ, B.; WILDE, C.; FRANKE, P.; MEHTA, N.; CAMEOTRA, S.S. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry of lipopeptide biosurfactants in whole cells and culture filtrates of *Bacillus subtilis* C-1 isolated from petroleum sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 12, p. 6210-6219, 2002.

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. Production of surfactin by *bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 175 - 180, abr. 2011.

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*, **Applied and Environmental Microbiology**, Berlim, v. 63, n. 1, p. 44 – 49, jan. 1997.

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**, Tainan, v. 42, p. 40 – 45, jan. 2007.

- WHANG, L.M.; LIU, P.W.; MA, C.C.; CHENG, S.S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil, **Journal of Hazardous Materials**, Taiwan, v. 151, n. 1, p. 155 – 163, fev. 2008.
- WILLENBACHER, J.; ZWICK, M.; MOHR, T.; SCHMID, F.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Evaluation of different *Bacillus* strains in respect of their ability to produce Surfactin in a model fermentation process with integrated foam fractionation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Karlsruhe, v. 98, n. 23, p. 9623 – 9632, dez. 2014.
- WILLENBACHER, J.; YEREMCHUK, W.; MOHR, T.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Enhancement of Surfactin yield by improving the medium composition and fermentation process. **AMB Express**, Karlsruhe, v. 5, n. 1, p. 57, ago. 2015.
- XU, H. M.; RONG, Y. J.; ZHAO, M. X.; SONG, B.; CHI, Z. M. Antibacterial activity of the lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* M1 against multidrug-resistant *Vibrio* spp. isolated from diseased marine animals. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Qingdao, v. 98, n. 1, p. 127 – 136, jan. 2014.
- YAMAMOTO, S.; SHIRAIISHI, S.; SUZUKI, S. Are cyclic lipopeptides produced by *Bacillus amyloliquefaciens* S13-3 responsible for the plant defence response in strawberry against *Colletotrichum gloeosporioides*? **Letters in Applied Microbiology**, Shizuoka, v. 60, n. 4, p. 379 – 386, abr. 2015.
- YANG, S.Z.; WEI, D.Z.; MU, B.Z. Determination of the amino acid sequence in a cyclic lipopeptide using MS with DHT mechanism. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, Shanghai, v. 68, n. 1, p. 69 – 74, jul. 2006.
- YANG, H.; YU, H.; SHEN, Z. A novel high-throughput and quantitative method based on visible color shifts for screening *Bacillus subtilis* THY-15 for surfactin production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Beijing, v. 42, n. 8, p. 1139 – 1147, ago. 2015.
- YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress**, Tainan, v. 21, n. 4, p. 1329 – 1334, jul. 2005.
- ZHU, Z.; ZHANG, F.; WEI, Z.; RAN, W.; SHEN, Q. The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid-state fermentation. **Journal of Environmental Management**, Nanjing, v. 127, p. 96 – 102, set. 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Primeira versão do artigo científico de revisão a ser submetido à revista
Biotechnology Journal

Surfactina: estrutura, aplicações e fatores envolvidos na produção

Mariana Munhoz Larini¹, Maria Inês Rezende², Fabiana Guillen Moreira Gasparin³, Mara Lúcia Luiz Ribeiro⁴

^{1,2,3,4}Departamento de Bioquímica e Biotecnologia na Universidade Estadual de Londrina idade Estadual de Londrina; Rodovia Celso Garcia Cid | Pr 445 Km 380, Caixa Postal 6001 – CEP 86051-990, Londrina – PR – Brasil; mirezende@uel.br.

Resumo

A surfactina é um poderoso lipopeptídeo da classe dos biosurfactantes, mais comumente produzido por *Bacillus subtilis*, uma bactéria Gram-positiva. A estrutura química da surfactina é composta por sete aminoácidos que estão ligados a grupos carboxil e hidrocarboxil, em longas cadeias de ácidos graxos. As potenciais áreas de aplicação da surfactina são ambientais e terapêuticas. Diversos fatores, influenciam na produção de surfactina, dentre eles os físicos, os químicos e a linhagem, o tamanho e a idade do microrganismo empregado para a produção. O pH, temperatura, velocidade de agitação, grau de aeração, formação de espuma, concentração de oxigênio dissolvido são alguns dos fatores físicos envolvidos na produção de surfactina, enquanto as fontes de carbono, de nitrogênio e elementos traços são os fatores que influenciam a produção de surfactina. Este trabalho tem como objetivo elucidar as principais questões envolvidas no processo de produção de surfactina por microrganismos, abordar as áreas de aplicação da surfactina e informar quais microrganismos são capazes de produzir este lipopeptídeo.

Palavras-chave: Aplicações, Estrutura, Microrganismos Produção, Surfactina.

Surfactin: structure, applications and factors involved in production

Abstract

Surfactin is a powerful lipopeptide of the biosurfactant class, most commonly produced by *Bacillus subtilis*, a Gram-positive bacterium. The chemical structure of surfactin is composed of seven amino acids that are bound to carboxyl and hydrocarboxyl groups in long chains of fatty acids. The potential areas of application of surfactin are environmental and therapeutic. Several factors influence the production of surfactin, including the physical, chemical and lineage, size and age of the microorganism used for production. The pH, temperature, stirring speed, aeration degree, foaming, dissolved oxygen concentration are some of the physical factors involved in the production of surfactin, while carbon, nitrogen and trace element sources are the factors that influence production Of surfactin. This work aims to elucidate the main issues involved in the process of production of surfactin by microorganisms, to approach the areas of application of surfactin and to inform which microorganisms are capable of producing this lipopeptide.

Keywords: Applications, Structure, Microorganisms Production, Surfactin.

1. Introdução

Os surfactantes são constituídos de porções hidrofóbicas e hidrofílicas, sendo capazes de reduzir a tensão superficial e interfacial entre moléculas individuais na superfície e interface (MULLIGAN, 2009). Em 2010, o aumento anual na produção de surfactantes era de 2 – 4 % (CAMEOTRA et al., 2010). Nos últimos anos o mercado mundial de surfactantes tem passado por um crescimento constante, avaliado em aproximadamente US\$ 30,65 bilhões em 2015. Crescendo 4,4% ao ano nos próximos anos, espera-se que o mercado atinja US\$ 39,69 bilhões em 2021 e se aproxime de US\$ 45,16 bilhões até 2024 (ACMITE MARKET INTELLIGENCE, 2016).

Os biossurfactantes tem substituído os surfactantes químicos por produção biotecnológica com síntese enzimática ou microbiana. Estes compostos anfipáticos reduzem a tensão superficial do meio ao qual estão sendo produzidos, propriedade que os confere aplicabilidade na indústria, agricultura, mineração e recuperação de petróleo, atuando como agentes molhantes, espumantes e emulsionantes em produtos farmacêuticos e cosméticos (GAUTAM; TYAGI, 2006). Porém, o alto custo associado à produção de biossurfactantes tem se tornado um problema para a indústria e prejudicou seu desenvolvimento. Apesar de os biossurfactantes terem que competir com surfactantes sintéticos em termos de custo, os biossurfactantes devem continuar sendo utilizados em alguns produtos de alto custo, como em cosméticos e medicamentos (CHEN; JUANG; WEI, 2015).

Apesar da questão de custo envolvida em sua produção, os biossurfactantes apresentam algumas vantagens sobre os surfactantes obtidos a partir do petróleo, tais como biodegradabilidade, produção a partir de substratos renováveis, baixa toxicidade, biocompatibilidade, digestibilidade, diversidade de estrutura química e propriedades, efetividade mesmo em condições extremas de temperatura, pH e salinidade (FRANÇA et al., 2015). Por estas razões os biossurfactantes são uma alternativa real aos surfactantes produzidos por processos químicos e já estão sendo usados como substitutos daqueles (MARCHANT; BANAT, 2012).

Os biossurfactantes são classificados conforme a estrutura química em glicolipídeos, lipopeptídeos, lipoproteínas, fosfolipídeos, ácidos graxos, lipídios neutros e compostos poliméricos (KHOPADE et al., 2012). Os lipopeptídeos contém peptídeos hidrofílicos que diferem na composição de aminoácidos e sequência (de sete a dez aminoácidos) ligados a um ácido graxo hidrofóbico com diferentes comprimentos de cadeia. Eles estão entre os

biossurfactantes mais isolados e caracterizados e os produzidos por numerosos *Bacillus spp.* são classificados em três famílias devido as suas sequências de aminoácidos: iturinas, fengicinas e surfactinas (AYED et al., 2014).

A surfactina foi relatada pela primeira vez por Arima, Kakinuma e Tamura (1968), que tentavam encontrar um inibidor da formação do coágulo de fibrina. A partir de cultivo de *Bacillus subtilis* foi isolado um lipopeptídeo cristalino, com potente ação inibidora da formação de coágulo sanguíneo e também um poderoso agente tensoativo de superfície. A concentrações tão baixas quanto 0,005% em água destilada, este composto ativo de superfície, então denominado surfactina, revelou-se capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 mN m⁻¹ para 27 mN m⁻¹ e mostrou possuir atividade de superfície melhor que o lauril sulfato de sódio, um surfactante sintético (SEN et al., 2010). Além disso, a surfactina promove a redução da tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 mN m⁻¹ a valores menores que 1 mN m⁻¹ com uma concentração micelar crítica (CMC) de 10⁻⁵ M. A CMC indica a máxima concentração de surfactante com propriedades tensoativas onde, a partir dessa concentração, inicia-se a formação de micelas que conferirá as propriedades de detergência e solubilização do composto (SLIVINSKI, 2012; BARROS et al., 2007; LIU et al., 2015).

A estrutura primária da surfactina foi determinada por Kakinuma et al. (1969). É composta por uma cadeia peptídica formada por sete α -aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β -hidroxi com comprimento de cadeia que varia de 12 a 16 átomos de carbono, para formar um lipopeptídeo cíclico (LIU; YANG; MU, 2005; IGLESIAS-FERNÁNDEZ, 2015; BARROS et al., 2007; KAKINUMA et al., 1969).

As diferenças nas sequências de aminoácidos e no número de átomos de carbono no ácido graxo indica que as surfactinas apresentam uma variedade de análogos estruturais ou isoformas (KAKINUMA et al., 1969; LIU et al., 2005). A principal isoforma, surfactina A, possui em sua porção peptídica a sequência de resíduos de aminoácidos N-L-Glu-L-Leu-D-Leu-L-Val-L-Asp-D-Leu-L-Leu-C. As isoformas da surfactina A, B e C variam na posição do sétimo aminoácido, entre Leu, Val e Ile (VATER et al., 2002; BARROS et al., 2007; LIU; YANG; MU, 2008). O padrão de aminoácidos e de ácidos graxos β -hidróxi na molécula depende das cepas bacterianas que produzem a surfactina e do tipo das condições de cultura (SEYDLOVÁ et al., 2011).

Três compostos de surfactina foram produzidos pelas linhagens de *B. subtilis* ATCC 21332 e OKB 105, dois dos quais foram diferentes da estrutura básica no aminoácido Leu⁷, o qual foi substituído por Val e Ile, respectivamente, indicando que foram encontradas as surfactinas B e C (BAUMGART et al., 1991). Liu et al. (2007) utilizaram os métodos de

análise de sequência de aminoácido descrita por Yang, Wei e MU (2006) e de análise de ácido graxo ligado à cadeia peptídica (WEI; LAI; CHANG, 2007) identificou as surfactinas produzidas por *B. subtilis* quando incubado com o mesmo meio de cultura e encontrou três tipos de surfactina com diferentes porções peptídicas. A primeira delas foi uma surfactina com a sequência de aminoácido N-Asp-Leu-Leu-Val-Glu-Leu-Leu-C; a segunda, N-Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu-C e o terceiro tipo de surfactina identificado apresentou uma cadeia peptídica metil esterificada. Os ácidos graxos dessas surfactinas foram diversos, incluindo ácidos graxos β -hidróxi iso C₁₂, iso C₁₃, anteiso C₁₃, iso C₁₄, iso C₁₅, anteiso C₁₅, n C₁₅, anteiso C₁₆, e anteiso C₁₇.

Ao empregar a linhagem de *B. subtilis* HSO121, Liu, Yang e Mu (2008) isolou e identificou uma nova molécula de surfactina, o lipopeptídeo C12, que possui o menor comprimento de cadeia entre os lipopeptídeos produzidos por *B. subtilis*. Liu, Yang e Mu (2009), ao empregar a mesma linhagem do microrganismo, identificou o C15-surfactina-*O*-metil éster, que é um tipo de lipopeptídeo esterificado. As porções de ácido graxo do C15-surfactina-*O*-metil éster foram identificadas como sendo ácidos graxos β -hidróxi iso C₁₅ e anteiso C₁₅. O anel peptídico foi analisado e a sequência de aminoácido de N-Glu(OMe)-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu-C foi identificada.

O *B. subtilis* produziu um total de 44 compostos de surfactinas e seus metil e dimetil ésteres, incluindo a conhecida variante de surfactina com L-Leu, L-Val, ou L-Ile na posição 7 do anel peptídico e variantes desconhecidas com resíduos de leucina na posição 2 e/ou 7 substituída por L-Val and L-Ile (KOWALL et al., 1998).

Yang, Yu e Shen (2015) identificaram 4 isoformas de surfactina produzidas por *B. subtilis* THY-15. As isoformas de surfactina nas frações 1, 2 e 4 tiveram a mesma sequência peptídica de Glu-Leu-Leu-Val-Asp-Leu-Leu, mas diferentes cadeias de ácidos graxos iso-C₁₃, C₁₄ e C₁₅, enquanto a isoforma na fração 3 possuía uma sequência peptídica especial de Glu-Val-Leu-Leu-Asp-Leu-Val.

Segundo Liu et al. (2015), diferentes linhagens bacterianas podem produzir o mesmo composto de surfactina e mesmas linhagens mostram-se capazes de produzir lipopeptídeos pertencentes a diferentes famílias.

2. Microrganismos Produtores

A síntese de surfactina em *Bacillus subtilis* tem sido amplamente estudada. *B. subtilis* é o microrganismo mais importante na produção de surfactina (SEN et al., 2010;

IGLESIAS-FERNÁNDEZ et al., 2015; INÈS; DHOUHA, 2015; WILLENBACHER et al., 2015; GUDIÑA et al., 2015; MARIN et al., 2015; SAKTHIPRIYA; DOBLE; SANGWAI, 2015). As células de *B. subtilis* são bastonetes, Gram-positivos, naturalmente encontradas em solo e vegetação. Crescem na faixa de temperatura de 25 – 37 °C. Esta bactéria tem desenvolvido uma série de estratégias que permitem sua sobrevivência em condições extremas tais como de estresse ambiental e falta de alimento (CHEN; JUANG; WEI, 2015).

Alguns autores investigaram a melhoria no rendimento de produção de surfactina, tais como Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011), que utilizaram o *Bacillus subtilis* SPB1, e obtiveram a máxima produção de surfactina em meio contendo 40 g L⁻¹ de glicose como fonte de carbono, 5 g L⁻¹ de uréia como fonte de nitrogênio orgânico e aplicando uma razão C/N de 7 com cloreto de amônio como fonte de nitrogênio inorgânico e 2 % de querosene, alcançando 4,920 g L⁻¹ de surfactina. Enquanto Willenbacher et al. (2015) constataram o melhor rendimento avaliando os efeitos de diferentes concentrações de glicose, seguida da introdução de um agente quelante e fonte de nitrogênio. A utilização de 8 g L⁻¹ de glicose, 0,008 mM de citrato de sódio e 50 mM de (NH₄)₂SO₄ elevaram a produção de surfactina de 0,700 a 1,100 g L⁻¹ durante os experimentos em frascos de agitação aplicando a linhagem de *Bacillus subtilis* DSM10.

Outros autores avaliaram a produção de surfactina ao empregar o glicerol como fonte de carbono. Faria et al. (2011) utilizaram o *Bacillus subtilis* LSFM-05 para produzir surfactina, utilizando glicerol bruto obtido do biodiesel como única fonte de carbono. A produção de surfactina foi realizada em um fermentador de bancada de 15 L e a surfactina foi obtida a partir da espuma produzida, sendo que a produtividade da surfactina purificada foi de 0,230 g de surfactina por litro de espuma coletada. Sousa et al. (2012) empregaram as cepas de *Bacillus subtilis* LAMI005 e LAMI009, e obtiveram 0,441 g L⁻¹ e 0,267 g L⁻¹ de surfactina, respectivamente. Sousa et al. (2014), ao empregarem o glicerol (2 %, v/v) obtido do processo de produção de biodiesel como a principal fonte de carbono para a produção de surfactina pelo *Bacillus subtilis* ATCC 6633, tiveram como resultado que após 48 horas de cultivo houve um aumento na produção de surfactina, alcançando uma concentração de 0,158 g L⁻¹ após 72 horas de fermentação.

Outros estudos centraram-se no uso de resíduos como substratos para a produção de surfactina, tais como Nitschke e Pastore (2006), que empregaram a manipueira para a produção de surfactina, e obtiveram 3,000 g L⁻¹ de surfactina usando *Bacillus subtilis* LB5a. Gudiña et al. (2015) avaliaram a produção de surfactina pelo *Bacillus subtilis* #573 usando milho-cina como meio de cultura. Os melhores resultados foram obtidos em um meio de

cultura contendo 10 % (v/v) de milhocina, com uma produção de surfactina de aproximadamente 1,300 g L⁻¹. Gurjar e Sengupta (2015), empregaram o resíduo de arroz como substrato para o crescimento microbiano do *Bacillus subtilis* MTCC 2423 por FS para produzir surfactina, obtendo um rendimento de 4,170 g kg⁻¹ de resíduo. Ramírez et al. (2015) avaliaram a produção de surfactina pelo *Bacillus subtilis* N1, utilizando resíduos moídos da azeitona como única fonte de carbono e obtiveram concentração máxima de 0,312 g L⁻¹ de surfactina com 2 % m/v do substrato no meio. Outros autores utilizaram diferentes cepas de *Bacillus subtilis* para a produção de surfactina, dentre eles Loiseau et al. (2015), os quais obtiveram surfactina ao empregar a cepa de *Bacillus subtilis* AM1, enquanto Hsieh et al. (2004) ao empregaram o *B. subtilis* ATCC 21332 e *B. subtilis* S15, obtiveram como resultado o acúmulo de 0,110 g L⁻¹ e 0,126 g L⁻¹ de surfactina, respectivamente. A Tabela 1 apresenta demais cepas de *B. subtilis* empregadas para a obtenção de surfactina.

Tabela 1 - Diferentes cepas de *Bacillus subtilis* produtoras de surfactina, o substrato utilizado e a quantidade de surfactina produzida

Cepas de <i>Bacillus subtilis</i>	Substrato	Surfactina	Referência
SPB1	Glicose, ureia, cloreto de amônio e querosene	4,920 g L ⁻¹	(GHRIBI; ELLOUZE-CHAABOUNI, 2011)
DSM10	Glicose, Na ₃ trissódico e (NH ₄) ₂ S ₀ ₄	1,100 g L ⁻¹	(WILLENBACHER et al., 2015)
LSFM-05	Glicerol	0,230 g LE ⁻¹ *	(FARIA et al., 2011)
ATCC 6633	Glicerol	0,158 g L ⁻¹	(SOUSA et al. (2014)
LAMI005	Glicerol	0,441 g L ⁻¹	(SOUSA et al., 2012)
LAMI009		0,267 g L ⁻¹	
LB5a	Manipueira	3,000 g L ⁻¹	(NITSCHKE; PASTORE, 2006)
#573	Milhocina	1,300	(GUDIÑA et al. (2015)
MTCC 2423	Resíduo de arroz	4,170 g kgR ⁻¹ *	(GURJAR; SENGUPTA, 2015)
N1	Resíduos moídos da azeitona	0,312 g L ⁻¹	(RAMÍREZ et al., 2015)
ATCC 21332	Não informado	0,110 g L ⁻¹	(HSIEH et al., 2004)
S15		0,126 g L ⁻¹	
ATCC21332	Turfa hidrolisada	7,700 g L ⁻¹	(SHEPPARD; MULLIGAN, 1987)
BS5	Melaços	1,100 g L ⁻¹	(ABDEL-MAWGOUD; ABOULWafa; HASSOUNA, 2008a)
MTCC 2423	Glicose	2,100 g gs ⁻¹ *	(VEDARAMAN; VENKATESH, 2011)
	Resíduo de óleo de girassol	1,490 g gs ⁻¹ *	
	Resíduo de óleo de farelo de arroz	1,100 g gs ⁻¹ *	
BS-37	Meio LB	0,413 g L ⁻¹	(LIU et al., 2015)
	Meio de glicose	0,585 g L ⁻¹	

g LE⁻¹*: gramas por litro de espuma; g KgR⁻¹*: grama por kilograma de resíduo; gs⁻¹*: grama por grama de

substrato

Além do *B. subtilis*, outros microrganismos foram relatados como produtores de surfactina, tais como o *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 (SLIVINSKI, 2012), o *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8 (ALVAREZ et al., 2015), o *Bacillus mojavensis* B0621A [61], o *Virgibacillus salarius* (ELAZZAZY; ABDELMONEIM; ALMAGHRABI, 2015), dentre outros.

As diferenças nas propriedades físico-químicas em séries homólogas e isoformas de biosurfactantes podem afetar a aplicação e a efetividade dessas biomoléculas, então é necessário avaliar suas propriedades funcionais, toxicidade e adequação para aplicação industrial (FRANÇA et al., 2015).

3. Aplicações

3.1 Aplicações ambientais

As atividades de superfície e emulsificação da surfactina a conduz a aplicações ambientais, tais como biorremediação e melhoramento em recuperação de petróleo (CHEN; JUANG 2008).

A recuperação microbiológica avançada de petróleo – do inglês MEOR (Microbial enhanced oil recovery) – é considerada uma tecnologia de recuperação de petróleo terciária que usa microrganismos e seus metabólitos para mobilizar petróleo residual em reserva de petróleo, o qual está preso nos poros de rochas por força capilar (KHIRE, 2010). Possuindo vantagens extremamente eficazes, incluindo baixa toxicidade, maior biodegradabilidade e efetividade em temperaturas, salinidade e condições de pH extremas, bem como alta atividade interfacial aliada a baixa CMC, a surfactina é um candidato bastante promissor em MEOR (BANAT et al., 2010).

As surfactinas podem manter atividade sob condições severas e recuperar petróleo preso a areia. Al-wahaibi et al. (2014) relataram que a surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis* B30 se mostrou estável dentro de ampla faixa de temperatura, de 50 – 80 oC, de pH, de 6 – 12, e de salinidade, com até 5 % de NaCl. A surfactina obtida elevou a recuperação de petróleo leve e pesado em 17 – 26 % e 31 %, respectivamente. Schaller et al. (2004) usaram a surfactina produzida pelo *Bacillus subtilis* ATCC 21332 para verificar o efeito de alterar a concentração de NaCl de 0 – 10 %, o pH de 3 – 10 e a temperatura de 21 – 70 °C na atividade da surfactiva, medida pelas reduções na tensão superficial. Os autores concluíram ue cada um

desses parâmetros, assim como a combinação deles, resultaram em mudanças discretas na atividade da surfactina, indicando que a surfactina estudada deve ser explorada como um agente em MEOR. Makkar e Cameotra (1999) observaram que a surfactina produzida por *B. subtilis* em altas temperaturas apresentou CMC de 35, 90 % de Índice de Emulsificação (IE24) com óleo diesel e recuperou 62 % do petróleo retido em areia. Estes resultados mostram que a surfactina produzida por diferentes microrganismos são estáveis frente a diferentes condições e apresentam potencial em MEOR, ao forçarem o deslocamento e facilitarem o transporte do óleo das formações geológicas.

Derramamentos de petróleo nos ambientes marinhos são uma das maiores causas de poluição. Devido a toxicidade e persistência, surfactantes sintetizados quimicamente não são favorecidos como agentes de remediação (LIU et al, 2015). Vários biossurfactantes apresentam sucesso em biorremediação, dentre eles a surfactina (ROSENBERG; RON, 1999; CAVALCANTE BARROS; DE QUADROSI; PASTORE, 2008). Métodos de avaliação da efetividade de descontaminação por biossurfactantes tem sido estabelecidos. A efetividade de dispersão de surfactinas foi avaliada através da medição de CMC e da razão de dispersante/petróleo. Para surfactinas, os valores de CMC em água destilada deionizada foram mais baixos ($0,015 \text{ g L}^{-1}$) que na solução de sal marinho ($0,020 \text{ g L}^{-1}$), o que tem sido parcialmente atribuído às mudanças conformacionais induzidas pela salina em espécies iônicas solvatadas de biossurfactantes. A razão dispersante/petróleo para a surfactina foi 1:96 em água, muito mais alta que aquela com 12 ppt de sal marinho, de 1:30, sugerindo uma redução na eficiência de dispersante de petróleo de surfactante em salina (MARTI et al., 2014). Sakthipriya, Doble e Sangwai (2015), ao produzir surfactina pelo *B. subtilis*, demonstraram o potencial deste lipopetídeo na recuperação avançada de petróleo no combate a derramamento de petróleo.

A surfactina produzida por *B. subtilis* (WHANG et al., 2008; LAI et al., 2009) é eficiente em transportar petróleo. Whang et al. (2008) examinaram a biodegradação de diesel, avaliando dois biossurfactantes, a surfactina e ramnolipídio. Encontraram que $0,04 \text{ g L}^{-1}$ de surfactina promove a produção de biomassa e biodegradação de diesel para mais que o dobro daquelas alcançadas em experimentos em batelada sem adição de surfactina. A surfactina reportada por Lai et al. (2009) acelera a biodegradação de hidrocarbonetos. Os autores observaram que dois biossurfactantes (ramnolipídio e surfactina) podem remover Hidrocarbonetos Totais de Petróleo (TPH) do solo e compararam sua efetividade com surfactantes sintéticos. Seus resultados indicaram que os ramnolipídios e a surfactina exibiram eficiência de remoção de 63 % e 62 % de TPH em solo contaminado com $9.000 \text{ mg TPH kg}^{-1}$ de solo seco, respectivamente. Estes resultados foram superiores à eficiência de remoção de

petróleo por surfactantes sintéticos.

A atividade de biocontrole exercida pela surfactina compreende outra das aplicações ambientais deste biosurfactante, o qual exibe principalmente atividade bactericida e age de modo a desestabilizar a membrana fosfolipídica do fitopatógeno alvo, resultando em lise da célula. O mecanismo de lise celular sugere que a surfactina será efetiva contra um amplo espectro de fitopatógenos, incluindo aqueles que tem desenvolvido uma resistência a agentes antimicrobianos específicos. Debois et al. (2015) mostraram que a imunidade induzida por surfactina prepara a planta para resistir melhor ao ingresso do patógeno e envolve apenas expressão limitada de eventos moleculares relacionados à defesa e não provoca inibição de crescimento das mudas. Cawoy et al. (2014) mostraram que linhagens de *Bacillus* associadas a plantas produzem resistência sistêmica no hospedeiro, por exemplo, surfactina, a qual contribui ao seu efeito protetivo contra fitopatógenos. Os resultados destes relatos mostraram que a surfactina é efetiva a específicos patógenos, eficaz em uma ampla gama de ambientes físicos e químicos.

3.2 Aplicações terapêuticas

Aplicações terapêuticas da surfactina são antimicoplasma, antibacteriana e antiviral, anti-adesiva e antitumoral, e são descritas a seguir.

Mycoplasma é um gênero de bactérias da família Mycoplasmataceae que causa inflamação respiratória e doenças do trato urogenital. Antibióticos são ineficazes no tratamento dessas infecções pois não podem penetrar sua membrana citoplasmática. Vollenbroich et al. (1997) revelaram que esta bactéria poderia ser tratada e completamente desintegrada pela surfactina.

Kracht et al. (1999) revelaram que a surfactina (C₁₅) com carga negativa exibiu a atividade antiviral mais forte. A função da efetividade da surfactina é atribuída a sua habilidade em formar canais condutores de íons em membranas de bicamada lipídica bacterianas através da sua ação do tipo detergente (HOSONO; SUZUKI, 1983; HEERKLOTZ; SEELIG, 2001; HEERKLOTZ, WIEPRECHT; SEELIG, 2004; HEERKLOTZ; SEELIG, 2007). Esta ação detergente torna a surfactina um potente inibidor da enzima adenosina 3, 5-monofosfato fosfodiesterase cíclica, facilitando a ação quelante dos grupos carboxil livres do ácido glutâmico e resíduos de ácido aspártico da surfactina (CHEN; JUANG, 2008).

A surfactina de *B. subtilis* possui atividade antibiótica mais potente (PEYPOUX;

BONMATIN; WALLACH, 1999) e aquela obtida de *B. licheniformis* inibe a germinação de *Mycoplasma grisea* (TENDULKAR et al., 2007). Bechard et al. (1998) demonstraram que o lipopeptídeo de *B. subtilis* possuía um largo espectro de atividade contra bactérias Gram-negativas e pequena atividade contra microrganismos Gram-positivos. Levando em conta a natureza anfipática da surfactina, acredita-se que as atividades mencionadas são uma direta consequência da interação do lipopeptídeo com sua membrana alvo e da alteração das propriedades da bicamada lipídica (LIU et al., 2015).

As características estruturais anfipáticas da surfactina possibilitam a sua interação com membranas celulares em macromoléculas, tais como enzimas e lipopolissacarídeos (LPSs) (CHANG et al., 2011). Muitos investigadores tem estabelecido que a surfactina inibe o efeito inflamatório da interação direta de LPS com as células (KIM et al., 1998; DAE et al., 2006; SINGH; VAN HAMME; WARD, 2007; SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008). Pode também inibir a expressão induzida por LPS da óxido nítrico-sintase induzida (iNOS). Além disso, reduz os níveis de endotoxinas no plasma, fator de necrose tumoral em ratos que tem sofrido choque séptico e também suprime a interação do lipídio A com LBP (proteína de ligação ao lipopolissacarídeo) (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008).

O biosurfactante possui propriedades anti-adesivas que inibem a produção de biofilme e a adesão de bactérias em locais de infecção (MIRELES II; TOGUCHI; HARSHEY, 2001; SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008; SEN et al., 2010). A surfactina inibe a formação de biofilmes pela *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008). Este efeito pode ter aplicações biomédicas, particularmente em dispositivos cirúrgicos e implantes.

A atividade antitumoral da surfactina tem sido associada com a natureza hidrofóbica do ácido graxo que interage com a cadeia acil do fosfolipídio ligado à membrana. Simultaneamente, suas frações peptídicas interagem fortemente com as cabeças polares dos lipídeos de membrana em células cancerosas. A surfactina, tendo uma longa cadeia de ácido graxo, penetra mais eficientemente em membranas de células cancerosas.

Liu et al. (2010) constatou que a surfactina causou inibição das vias de sinalização fosfatidilinositol-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt) e proteína quinase ativada (MAPK) em células MCF-7. Ela também reduziu a insaturação da composição de ácido graxo na membrana da célula que conduz a apoptose celular em células de câncer de mama Bcap-37. A surfactina purificada do *Bacillus natto* foi relatada pela primeira vez por possuir efeitos antitumorais em células do carcinoma de Ehrlich e a surfactina purificada a partir da linhagem TK-1 inibiu células do câncer de mama MCF-7. A surfactina causou indução de apoptose e o

círculo celular parou na fase G₂/M em células de câncer de mama MCF-7 como um resultado da clivagem da caspase-3 em células MCF-7 (CAO et al., 2009a). Isso foi confirmado pelo uso de inibidores de caspase ZVAD-fmk e Z-DEVC-fmk que reverteram o efeito da apoptose induzida por surfactina em células MCF-7. Caspases são um grupo de proteases baseadas em cisteína. A ativação sequencial de caspases apresenta uma parte crucial em eventos de apoptoses ou morte celular programada (RAJPUT et al., 2013).

Cao et al. (2009b) demonstraram que a surfactina causou acúmulo intracelular de Ca²⁺ o qual possui papel crucial na indução de apoptose em células MCF-7. Os autores também relataram que a surfactina provoca mudanças na expressão de várias proteínas reguladoras do ciclo celular. A p53 é uma proteína que induz a apoptose e a parada do ciclo celular através da ativação de outra proteína: p21. Foi relatada também como indutora da parada do ciclo celular na fase G₂/M pelo aumento da expressão de p53 e p21 e pelo aumento da expressão de ciclina B1 e p34^{cdc2}.

Kim et al. (2007) relataram o efeito da surfactina na proliferação de células LoVo causadoras de carcinomas no cólon. Ela fortemente bloqueou a proliferação destas células através da indução de atividade pro-ap e parada do ciclo celular. A propriedade anticâncer da surfactina foi devida à fragmentação de DNA, clivagem de PARP, ativação de caspase-3 e expressão alterada de muitas proteínas com o p21^{WAF1/Cip1}, p53, quinase dependente de ciclina (CDK)2 e ciclina E. A atividade antiproliferativa da surfactina também foi mediada pela inibição da proteína cinase regulada por sinais extracelulares (ERK) e PI3K/Akt (KIM et al., 2007). A Tabela 2 apresenta aplicações terapêuticas e ambientais da surfactina.

Tabela 2 - Aplicações ambientais e terapêuticas da surfactina

Aplicações terapêuticas		
Atividade	Mecanismos	Referências
Antimicoplasma Antiviral	Induz a formação de canais iônicos em membranas de bicamada lipídica	(VOLLENBROICH et al., 1997) (KRACHT et al., 1999) (SHEPPARD et al., 1991)
Antibacteriana		
Antiinflamatória	Inibição da fosfolipase citosólica plaquetária	(HEERKLOTZ; SEELIG 2001)
Antiadesiva	Inibição da formação de biofilme	(HEERKLOTZ, WIEPRECHT; SEELIG, 2004)
Aplicações ambientais		
Biorremediação ambiental	Atividades de superfície e emulsificantes	(MULLIGAN, 2009)
Biodegradação de hidrocarbonetos		(WHANG et al., 2008)
Biocontrole		(MULLIGAN, 2009)

Fonte: Adaptado de Chen; Juang e Wei (2015)

4. Produção de Surfactina

Para elucidar o processo pelo qual os microrganismos produzem surfactina, esta seção apresenta vários aspectos da produção de surfactina, incluindo as condições de cultivo e composição dos meios utilizados. Dentre os fatores que afetam a produção de surfactina, tem-se as condições físicas e nutricionais e os tipos de substratos envolvidos na produção.

4.1 Condições Físicas

As condições de cultivo pH, temperatura, concentrações de oxigênio dissolvido e grau de aeração afetam a produção de biossurfactante por ter relação com o crescimento celular. A surfactina é secretada em grande quantidade a temperaturas de 25 °C a 37 °C (SEM; SWAMINATHAN, 2005; YEH; WEI; CHANG, 2005; ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008).

Investigações mostraram que a temperatura afeta a composição do biossurfactante gerado. Sen e Swaminathan (2005) verificaram que a temperatura ótima para a produção de surfactina pelo *B. subtilis* DSM 3256 é de 37,4 °C. Haddad, Wang e Mu (2009) mostraram que várias espécies de *Bacillus* produziram surfactina a temperaturas acima de 40 °C sem nenhum efeito em sua função de superfície.

A eficiência do oxigênio dissolvido e da transferência de massa afeta a produção de surfactina em *B. subtilis* (YEH; WEI; CHANG, 2005; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010). Um sistema de monitoramento de atividade de respiração foi usado para examinar a influência da taxa de transferência de oxigênio na síntese de lipopeptídeo por *B. subtilis* ATCC6633. Os resultados experimentais obtidos revelaram que a regulação de oxigênio atuou em diferentes níveis, sugerindo um sistema complexo para regulação da síntese de lipopeptídeo NRPS em linhagens naturais de *B. subtilis* ATCC6633 (GUEZ et al., 2008).

Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011) encontraram que em meio saturado com 30 % de oxigênio dissolvido, a produção de surfactina atingiu 4,92 g L⁻¹. Yeh, Wei e Chang (2005) e Fonseca et al. (2007) mostraram que o aumento da concentração de oxigênio dissolvido através da agitação rápida influenciou positivamente a produção de surfactina por *B. subtilis*.

A velocidade de agitação também afetou a produção, de modo que o melhor rendimento foi obtido em uma velocidade de agitação de 200 rpm a 250 rpm (YEH; WEI; CHANG, 2005). Porém, velocidades de agitação superior a 350 rpm reduziu a produção de surfactina por *B. subtilis* pelo acúmulo de espuma (SHALIGRAM; SINGHAL, 2010).

O acúmulo de espuma é outro fator crítico que afeta a produção de surfactina e seu efeito está relacionado a aeração (SHALIGRAM; SINGHAL, 2010). Yeh, Wei e Chang (2005) mostraram que uma velocidade superior a 250 rpm resultou em acúmulo de espuma e diminuiu a transferência de oxigênio e de rendimento de surfactina. O acúmulo de espuma reduz a biomassa e a produção de biossurfactante pela redução do período de fermentação (DAVIS; LYNCH; VARLEY, 1999).

O coeficiente volumétrico de transferência de massa, kLa , afeta a produção de biossurfactante significativamente. Quatro principais parâmetros teriam influência em valores de kLa , por exemplo, velocidades superficial do líquido e do gás, tensão superficial do meio líquido e a presença de partículas sólidas (CHEN; JUANG; WEI, 2015).

Fahim et al. (2013) utilizaram o biorreator trifásico de fase reversa de leito fluidizado para discutir o efeito do kLa na produção de surfactina pelo *B. subtilis*. A transferência de oxigênio aumentou de 175 % e de 24 % com o aumento das velocidades superficial do gás e do líquido, respectivamente. A transferência de oxigênio obtida no biorreator trifásico de fase reversa de leito fluidizado foi maior que aquela que ocorreu nos outros biorreatores usados para a produção de biossurfactante, portanto, uma diminuição significativa de kLa (até 27 %) foi medida durante o processo de fermentação. Foi mostrado que essa diminuição de kLa foi um resultado de diminuição da tensão superficial devido a produção de biossurfactantes, porém, a transferência de oxigênio permitiu um fornecimento adequado de oxigênio para as linhagens de *B. subtilis* aeróbicas.

A condição do pH afeta de maneira substancial a produção de surfactina em *B. subtilis* (YEH; WEI; CHANG, 2005; SHALIGRAM; SINGHAL, 2010). Sen e Swaminathan (2005) empregaram o *B. subtilis* DSM3256 e estudaram os efeitos das condições do processo de fermentação de pH, temperatura, taxa de agitação e grau de aeração na produção de surfactina, usando a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). Seus resultados revelaram que 37,4 °C, um pH de 6,75, uma taxa de agitação de 140 rpm e um grau de aeração de 0,75 vvm maximizaram a produção de surfactina, atingindo a produção de 1,1 g L⁻¹.

Outras condições de cultivo, como tamanho e idade do inóculo, também influenciam na produção de biossurfactantes. Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011) mostraram que um OD₆₀₀ inicial inferior ou superior a 0,15 resultou em baixa produção de surfactina, sendo que a produção de biossurfactantes foi otimizada pelo cultivo do *B. subtilis* SPB1 com uma OD₆₀₀ inicial de 0,15. Este resultado revelou que a idade e o tamanho do inóculo estão positivamente correlacionados com a produção de surfactina por afetar o período da fase lag, a taxa de crescimento específica, a biomassa e a esporulação.

4.2 Condições Nutricionais

A produção comercial de surfactina geralmente depende de substratos caros (AL-AJLANI et al., 2007). Arima, Kakinuma e Tamura (1968) mostraram que o meio complexo, tais como LB (Luria Bertani) e caldo nutriente, renderam apenas $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de produção de surfactina, o que é um valor baixo quando comparado a outros valores da literatura. Al-Ajlani et al. (2007) testaram uma série de meios, incluindo os meios definido, semi-definido e complexo na produção de surfactina. Seus resultados experimentais revelaram que o meio complexo sem qualquer suplemento proporcionou rendimento de $0,2 \text{ g L}^{-1}$.

A razão carbono/nitrogênio influencia a produção de surfactina. Fonseca et al. (2007) e Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011) aumentaram a produção de surfactina através do ajuste da razão carbono/nitrogênio e encontraram que a razão carbono/nitrogênio acima de sete reduz a quantidade de biosurfactantes que foram sintetizados pelo *B. subtilis*.

Elazzazy, Abdelmoneim e Almaghrabi (2015) avaliaram a influência da razão carbono/nitrogênio usando uma ampla faixa de razão C/N (10:1 – 70:1) com óleo de fritura e uréia como fonte de carbono e nitrogênio, respectivamente, na produção de surfactina pelo *Virgibacillus salarius*. A máxima atividade emulsificante (85 %) e a mínima tensão superficial (29 mN m^{-1}) foram atingidas a uma razão C/N de 30:1. Aumento na razão C/N não apresentou efeito na produção de surfactina ou biomassa pelo *Virgibacillus salarius*.

A importância da glicose e suas concentrações na produção de surfactina foi estudada por Yeh, Wei e Chang (2005). O *B. subtilis* ATCC 21332 foi crescido em meio líquido contendo 40 g L^{-1} de glicose com adição de 133 g L^{-1} de carvão ativado. Um declínio na concentração de surfactina foi observada após depleção de glicose, de forma que as células podem ter utilizado a surfactina como fonte de carbono para seus crescimentos. Isto indicou que a fermentação em batelada para produção de surfactina pode ser finalizada em tempo apropriado, de modo a evitar a utilização de surfactina como fonte de carbono e também sugeriu que o fornecimento de glicose é crítico, já que ela age como fonte principal de carbono. Concentrações mais altas de glicose ($50 - 60 \text{ g L}^{-1}$) levou ao acúmulo de glicose no meio, causando diminuição do pH e diminuição resultante na produção de surfactina. Isto mostrou que a regulação do pH é importante na produção de surfactina. Um pH ótimo para produção foi na faixa de 6,3 a 6,7.

Davis, Lynch e Varley (1999) relataram o efeito das limitações de carbono e nitrogênio, em condições aeróbicas e deficientes de oxigênio. A cultura usada foi o *B. subtilis* ATCC 21332 em meio suplementado com glicose, nitrato de amônio e sulfato ferroso. A

produção de surfactina foi maior em um meio definido com nitrato de amônio como fonte de nitrogênio. Isso foi devido à utilização de nitrato, resultando em crescimento limitado por nitrato. A utilização do nitrato ocorreu em dois casos, tanto sob condições de crescimento aeróbica, ou quando houve depleção de amônia. Baixos rendimentos de surfactina resultaram em culturas sem nenhuma utilização de nitrato e tais culturas tiveram baixa quantidade de carbono, ou continham apenas amônia, mas sem nitrato. Propôs-se que o nitrato age como um acceptor de elétron terminal sob condições anaeróbicas. O nitrato foi usado mesmo quando a amônia estava presente na cultura. Durante o crescimento aeróbico, o íon amônio foi utilizado preferencialmente sobre nitrato. O estudo indicou que através da implementação da abordagem de batelada alimentada e do fornecimento de amônia durante a fase de crescimento e nitrato na alimentação, a utilização de nitrato pode ser prolongada e a produção de surfactina aumentada.

4.2.1 Fontes de carbono

Fontes de carbono, como glicose, manitol e sacarose tem sido utilizadas na produção de biossurfactantes e, dentre eles, a surfactina. Al-Ajlani et al. (2007) testaram uma série de meios baseados em carboidratos com *B. subtilis* MZ-7, incluindo a glicose, sacarose e manitol. Os resultados experimentais revelaram que a sacarose foi a fonte de carbono ótima, já que ela possibilitou a máxima produção de surfactina pelo *B. subtilis*.

Yeh, Wei e Chang (2005) realizaram um estudo com glicose como fonte de carbono e revelaram que altas concentrações de glicose ($50 - 60 \text{ g L}^{-1}$) podem resultar no acúmulo de glicose no meio de cultivo, levando a baixo pH e correspondente queda na produção de surfactina.

Outras fontes de carbono como glicose, sacarose, amido e glicerol foram testados para a produção de surfactina pelo *B. subtilis* SPB1, que foi capaz de usar todos estes substratos, mas o uso de glicose como fonte de carbono para produzir surfactina foi mais eficaz (GHRIBI; ELLOUZE-CHAABOUNI, 2011).

Elazzazy, Abdelmoneim e Almaghrabi (2015) empregaram a bactéria *Virgibacillus salarius* que produziu um biossurfactante similar à surfactina e avaliaram os efeitos de vários óleos comestíveis (óleo de canola, óleo de algodão e resíduo de fritura de óleo de girassol) e não comestíveis (oleo de jatropha, óleo rícino, e óleo de jojoba) derivados de plantas como fontes de carboidratos. O resíduo de fritura de óleo de girassol foi a melhor fonte de carbono para a síntese de biossurfactantes.

4.2.2 Fontes de nitrogênio

As fontes de nitrogênio que são usualmente utilizadas em produção de surfactina são classificadas em orgânicas (incluindo uréia, triptona, digerido pancreático de caseína, hidrolisado de caseína, extrato de carne e extrato de levedura) ou inorgânicas (incluindo NH_4Cl , NaNO_3 , e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$).

Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Hassouna (2008) testaram fontes de nitrogênio, incluindo fontes orgânicas (oxalato de amônio, uréia, extrato de levedura, peptona, triptona e milhocina) e fontes inorgânicas (nitrato de sódio, nitrato de potássio, nitrato de amônio, cloreto de amônio, brometo de amônio, carbonato de amônio e sulfato de amônio). Os resultados dos experimentos revelaram que o nitrato de sódio produziu a maior quantidade de surfactina que qualquer outra fonte, tanto orgânica quanto inorgânica.

Elazzazy, Abdelmoneim e Almaghrabi (2015) avaliaram diferentes fontes de nitrogênio (nitrato de amônio, nitrato de sódio, cloreto de amônio, sulfato de amônio, fenilalanina, extrato de malte e uréia) para a produção de surfactina pela bactéria *Virgibacillus salarius*. Os resultados obtidos indicaram que uréia e nitrato de amônio foram as fontes de nitrogênio mais eficientes para a produção de surfactina.

Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011) avaliaram o efeito das fontes de nitrogênio, incluindo uréia, digerido pancreático de caseína, extrato de carne, extrato de levedura e hidrolisado de caseína, na produção de surfactina. Os resultados mostraram que a produção mais elevada de surfactina ($0,72 \text{ g L}^{-1}$) foi obtida quando do uso de uréia como uma fonte de nitrogênio orgânica.

4.2.3 Elementos traços

Quatro elementos traços Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} e Fe^{2+} são particularmente úteis na biossíntese de surfactina por *B. subtilis*. Os elementos traços podem afetar a biossíntese de surfactina por sua atuação como cofatores principais em sistemas multi enzimáticos que estão envolvidos na via de biossintética da surfactina (CHEN; JUANG; WEI, 2015).

Wei, Lai e Chang (2007) encontraram os elementos traços, Mg^{2+} , K^+ , Fe^{2+} e Mn^{2+} são fatores significativos na produção de surfactina pelo *B. subtilis* ATCC 21332. Na ausência de Mg^{2+} ou K^+ , o rendimento da produção de surfactina diminuiu para $0,4 \text{ g L}^{-1}$, o que foi apenas 25 % do valor obtido do controle. Quando Mn^{2+} e Fe^{2+} estiveram ausentes, o rendimento de produção de surfactina caiu para $0,6 \text{ g L}^{-1}$, aproximadamente um terço do valor

do controle. Porém, quando apenas um dos dois íons metálicos (Fe^{2+} ou Mn^{2+}) estiveram ausentes, o *B. subtilis* ATCC 21332 permaneceu acima de 80 % produtividade original de surfactina. Foi aplicado, então, o método estatístico de Taguchi para revelar os efeitos interativos de Mg^{2+} , K^+ , Mn^{2+} , Fe^{2+} na produção de surfactina. Os resultados mostram que a interação de Mg^{2+} e K^+ atingiu um nível significativo.

A otimização das concentrações de Mg^{2+} e K^+ no meio aumentou a produção de surfactina para $3,34 \text{ g L}^{-1}$, aproximadamente o dobro do rendimento obtido do controle original. Cooper et al. (1981) tentaram melhorar os rendimentos de fermentação com adição de elementos traços FeSO_4 , MnSO_4 , MgSO_4 , CaCl_2 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaNO_3 , ZrOCl_2 , ZnSO_4 , CuSO_4 , NiSO_4 e CoSO_4 . Destes, FeSO_4 e MnSO_4 demonstraram efeito significativo tanto na produção de surfactina quanto na biomassa, enquanto MgSO_4 , CaCl_2 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaNO_3 e ZrOCl_2 não apresentaram influência na produção. Já os ZnSO_4 , CuSO_4 , NiSO_4 e CoSO_4 inibiram o crescimento do *B. subtilis*.

Gudiña et al. (2015) empregaram o *Bacillus subtilis* #573 para a produção de surfactina usando milhocina como substrato e avaliaram o efeito de diferentes metais (ferro, manganésio e manganês) na produção de surfactina. Todos os metais testados aumentaram a produção de surfactina (até 4,1 , 4,4 e 3,5 g L^{-1} para ferro, magnésio e manganês, respectivamente. Os melhores resultados foram obtidos em um meio de cultura consistindo de 10 % (v/v) de milhocina, com uma produção de surfactina de $1,3 \text{ g L}^{-1}$. quando o meio de cultura foi suplementado com a concentração ótima dos três metais simultaneamente, a produção de surfactina foi aumentada para $4,8 \text{ g L}^{-1}$.

4.3 Substratos Complexos

A adição de hidrocarbonetos ao meio de cultura aumenta a produção de biossurfactantes, pois os biossurfactantes auxiliam na degradação de compostos aromáticos como fontes de nutrientes (ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008).

Ghribi e Ellouze-Chaabouni (2011) adicionaram diferentes óleos (azeite de oliva, óleo de girassol, óleo de milho) e hidrocarbonetos (parafina, querosene, óleo diesel, benzeno, e heptano) para melhorar a produção de biossurfactantes pelo *B. subtilis* SPB1. A produção mais significativa foi obtida usando o querosene, de $1,74 \text{ g L}^{-1}$. Os autores também estudaram o efeito de diferentes óleos e hidrocarbonetos (óleo de soja, azeite de oliva, hexadecano e óleo de parafina) na produção de surfactina. Diferentes autores encontraram que óleos vegetais e hidrocarbonetos tiveram efeito inibitório na produção de surfactina. A Tabela 3 indica um

resumo dos resultados obtidos nos estudos citados.

Tabela 3 - Óleos e hidrocarbonetos acrescidos em Meios de Sais Minerais para a produção de surfactina por cepas de *Bacillus subtilis*

Microrganismo	Fonte de carbono	Surfactina (g L ⁻¹)	Referência	
<i>B. subtilis</i>	2 % óleo de girassol	0,38	(ABDEL-MAWGOUD; ABOULWAFI; HASSOUNA, 2008)	
	2 % azeite de oliva	0,31		
	2 % glicerol	0,25		
	2 % hexadecano	0,37		
	2 % óleo de parafina	0,37		
	<hr/>			
	2 % azeite de oliva	1,00		(GHRIBI e ELLOUZE- CHAABOUNI, 2011)
	2% óleo de milho	1,10		
	2 % óleo de girassol	1,10		
	2 % querosene	1,74		
	2 % parafina	1,30		
	2 % diesel	1,50		
	2 % benzeno	1,00		
	2 % heptano	1,20		

Fonte: Adaptado de Chen; Juang e Wei (2015)

Devido ao fato de aminoácidos como a L-asparagina, D,L-leucina, ácido glutâmico e L-valina fazerem parte da estrutura química da surfactina, acredita-se que estes aminoácidos sejam nutrientes na produção de surfactina por *B. subtilis* (CHEN; JUANG; WEI, 2015).

Mas, no trabalho de Abdel-Mawgoud, Aboulwafa e Hassouna (2008), ao serem adicionados estes aminoácidos, a produção de surfactina foi baixa. Porém, tais adições não elevaram a produção de surfactina quando eles foram adicionados ao meio que continha sais minerais ou quando foram usados no lugar do nitrato de sódio naquele meio.

Alguns resíduos, tais como águas residuais e restos de alimentos, são usados como substratos na produção de bioprodutos microbianos, de modo a diminuir os custos de produção. A Tabela 4 apresenta um resumo da produção de surfactina, os substratos utilizados e a quantidade de surfactina produzida.

Além destes substratos (Tabela 4), ainda tem sido relatados usos de diferentes materiais hidrolisados como substrato para a obtenção de biossurfactantes por diferentes microrganismos (Tabela 5).

Tabela 4 - Resíduos da agroindústria e outros substratos utilizados na produção de surfactina por *Bacillus*

Microrganismo produtor	Substrato	Surfactina (g L⁻¹)	Referência
<i>B. subtilis</i> #573	Milhocina	1,300	(GUDIÑA et al., 2015)
<i>B. subtilis</i> LB5a	Manipueira	3,000	(NITSCHKE e PASTORE, 2006)
<i>B. subtilis</i> LB5a		2,600	(BARROS et al., 2008)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Glicerol	0,158	(SOUSA et al., 2014)
<i>B. subtilis</i> LFSM-05		0,230	(FARIA et al., 2011)
<i>B. subtilis</i> LAMI005 e		0,441	
LAMI009		0,267	
<i>B. subtilis</i> N1	Resíduos moídos da azeitona	0,003	(RAMÍREZ et al., 2015)
<i>B. subtilis</i> LAMI008	Suco de caju	0,003	(PONTE ROCHA et al. 2009)
<i>B. subtilis</i> LAMI005	Suco de caju	0,123	(GIRO et al., 2009)
<i>B. subtilis</i>	Efluente do processamento de batata	0,900	(NOAH; BRUHN; BALA, 2005)
<i>B. subtilis</i>		0,400	(THOMPSON; FOX; BALA, 2001)
<i>B. subtilis</i> UCP0999	Farelo de arroz	8,600	(ACIOLY, 2009)
<i>B. subtilis</i> MTCC 2423	Resíduos de Óleo de fritura	0,983	(VEDARAMAN; VENKATESH, 2011)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	Soro de leite em pó desidratado	0,290	(CAGRI-MEHMETOGLU et al., 2012)
<i>B. clausi</i> BS02	Borra de óleo de girassol	2,600	(HAZRA; KUNDU; CHAUDHARI, 2015)

Tabela 5 - Materiais hidrolisados utilizados como substrato para a produção de biossurfactantes por diferentes microrganismos

Microrganismo produtor	Hidrolisado como produtor	Biossurfactante (g L⁻¹)	Referência
<i>Starmerella bombicola</i> NBRC 10243	Hidrolisado de espiga de milho	Soforolipídeos 49,2	(KONISHI; YOSHIDA; HORIUCHI, 2015)
<i>B. subtilis</i> ATCC 21332	Hidrolisado de celulose do sisal	Surfactina Não informado	(MARIN et al., 2015)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Hidrolisado do bagaço de uva	Surfactina 4,8 x 10 ⁻³	(RIVERA et al., 2007)
<i>Candida bombicola</i> ATCC 22214	Hidrolisado de fibra de milho	Soforolipídeo 1,0	(SAMAD et al., 2015)
	Hidrolisado de bagaço de sorgo doce	3,6	

5. Conclusão

A estrutura da molécula de surfactina é composta por uma porção hidrofílica (polar) e hidrofóbica (apolar), o que a confere a capacidade de alterar as propriedades interfaciais e superficiais de um líquido. Tal propriedade propicia a ação da surfactina em vastas aplicações terapêuticas e ambientais, tais como biorremediação, em tratamentos antibacterianos e outros. Porém, o alto custo de produção e recuperação da surfactina limita sua gama de aplicações.

Todavia, estratégias de fermentação podem ser empregadas para a síntese de surfactina por microrganismos, auxiliando na elevação do rendimento de surfactina e na redução dos custos de produção. Os resíduos agroindustriais são materiais de alto valor agregado e que podem ser utilizados em processos fermentativos para a produção de surfactina, além de contribuir com a reutilização de material já processado. Além de resíduos agroindustriais, diferentes fontes de carbono e nitrogênio e elementos traços também são empregado em fermentações em estado sólido para a produção de surfactina. Assim, técnicas fermentativas devem ser exploradas para a produção de surfactina em larga industrial.

Referências

ACMITE MARKET INTELLIGENCE. **Global Surfactant Market**. Market Report. Ratingen. 4 ed, 605 p, 2016.

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWafa, M. M.; HASSOUNA, N. A. H. Optimization of Surfactin Production by *Bacillus subtilis* Isolate BS5. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2008, 150, 3, 305–325.

ACIOLY, L. M. L. **Produção de biosurfactantes por *Bacillus subtilis* UCP 0999 EM substratos não convencionais e de baixo custo**. 2009. 79 f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de Processos Ambientais) – Universidade Católica de Pernambuco, Pernambuco, 2009.

AL-AJLANI, M.M.; SHEIKH, M.A.; AHMAD, Z.; HASNAIN, S. Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmamedia commercial medium, **Microbial Cell Factories**, 2007, 6, 17, 01 – 08.

ALVAREZ, V. M.; JURELEVICIUS, D.; MARQUES, J. M.; SOUZA, P. M.; ARAÚJO, L. V.; BARROS, T. G.; SOUZA, R. O. M. A.; FREIRE, D. M. G.; SELDIN, L. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2015, 136, 1, 14 – 21.

AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEMANI, A.; SHIBULAL, B. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 2014, 114, 1, 324 – 333.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide-lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*, isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1968, 31, 3, 488 – 494.

AYED, H.B.; HMIDET, N.; BÉCHET, M.; CHOLLET, M.; CHATAIGNÉ, G.; LECLÈRE, V.; JACQUES, P.; NASRI, M. Identification and biochemical characteristics of lipopeptides from *Bacillus mojavensis* A21, **Process Biochemistry**, 2014, 49, 10, 1699 – 1707.

- BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010, 7, 2, 427 – 444.
- BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; JÚNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, 2007, 30, 2, 409 – 414.
- BARROS, F. F. C. ; DE QUADROSI, C. P.; PASTORE, G. M. Studies of emulsifying properties and stability of the biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cassava wastewater. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 979 – 985, out. 2008.
- BAUMGART, F.; KLUGE, B.; ULLRICH, C.; VATER, J.; ZIESSOW, D. Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1991, 177, 3, 998 – 1005.
- BECHARD, J.; EASTWELL, K.C.; SHOLBERG; MAZZA, G.; SKURA, B. Isolation and partial chemical characterization of an antimicrobial peptide produced by a strain of *Bacillus subtilis*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1998, 46, 12, 5355 – 5361.
- CAGRI-MEHMETOGLU, A.; KUSAKLI, S.; VAN DE VENTER, M. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. **Journal of Dairy Science**, 2012, 95, 7, 3643 – 3649.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S.; KAUR, J.; MEHTA, S. K. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2010, 672, 261 – 280.
- CAO, X.H.; LIAO, Z.Y.; WANG, C.L.; CAI, P.; YANG, W.Y.; LU, M.F.; HUANG, G.W. Purification and antitumour activity of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus natto* TK. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 2009a, 52, 2, 97 – 106.
- CAO, X.H.; WANG, A.H.; JIAO, R.Z.; WANG, C.L.; MAO, D.Z.; YAN, L.; ZENG, B. Surfactin induces apoptosis and G(2)/M arrest in human reast cancer MCF-7 cells through cell cycle factor regulation. **Cell Biochemistry and Biophysics**, 2009b, 55, 163 – 171.
- CAWOY, H.; MARIUTTO, M.; HENRY, G.; FISHER, C.; VASILYEVA, N.; THONART, P.; DOMMES, J.; ONGENA, M. Plant defense stimulation by natural isolates of *Bacillus* depends on efficient surfactin production. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 2014, 27, 2, 87 – 100.
- CHANG, C.C.; CHEN, M.C.; HO, T.F.; WU, H.S.; WEI, Y.H. Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2011, 111, 5, 501 – 511.
- CHEN, H. L.; CHEN, Y. S.; JUANG, R. S. Recovery of surfactin from fermentation broths by a hybrid salting-out and membrane filtration process. **Separation and Purification Technology**, 2008, 59, 3, 244 – 252.

CHEN, W. C.; JUANG, R. S.; WEI, Y. H. Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. **Biochemical Engineering Journal**, 2015, 103, 158 – 169.

COOPER, D.G.; MACDONALD, C.R.; DUFF, S.J.; KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, 1981, 42, 3, 408 – 412.

DAE, K.S.; CHO, J.Y.; PARK, H.J.; LIM, C.R.; LIM, J.H. ; YUN, H.I.; PARK, S.C.; KIM, S.K.; RHEE, M.H. A comparison of the anti-inflammatory activity of surfactin A, B C and D from *B. subtilis*, **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2006, 16, 10, 1656 – 1659.

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21,332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, 1999, 25, 3 – 5, 322 – 329.

DEBOIS, D.; FERNANDEZ, O.; FRANZIL, L.; JOURDAN, E.; DE BROGNIEZ, A.; WILLEMS, L.; CLÉMENT, C.; DOREY, S.; DE PAUW, E.; ONGENA, M. Plant polysaccharides initiate underground crosstalk with bacilli by inducing synthesis of the immunogenic lipopeptide surfactin. **Environmental Microbiology Reports**, 2015, 7, 3, 570 – 582.

ELAZZAZY, A. M.; ABDELMONEIM, T.S.; ALMAGHRABI, O.A. Isolation and characterization of biosurfactant production under extreme environmental conditions by alkali-halo-thermophilic bacteria from Saudi Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, 2015, 22, 4, 466 – 475.

FAHIM, S.; DIMITROV, K.; VAUCHEL, P.; GANCEL, F.; DELAPLACE, G.; JACQUES, P.; NIKOV, I. Oxygen transfer in three phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. **Biochemical Engineering Journal**, 2013, 76, 70 – 76.

FARIA, A. F.; TEODORO-MARTINEZ, D. S.; BARBOSA, G. N. O.; VAZ, B. G.; SILVA, I. S.; GARCIA, J. S.; TÓTOLA, M. R. T; EBERLIN, M. N. E.; GROSSMAN, M. ALVES, O. L.; DURRANT, L. R. Production and structural characterization of surfactin (C₁₄/Leu⁷) produced by *Bacillus subtilis* isolate LSFM-05 grown on raw glycerol from the biodiesel industry. **Process Biochemistry**, 2011, 46, 10, 1951 – 1957.

FONSECA, R.R.; SILVA, A.J. ; DE FRANÇA, F.P.; CARDOSO, V.L.; SÉRVULO, E.F. Optimizing carbon/nitrogen ratio for biosurfactant production by a *Bacillus subtilis* strain, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2007, 37–140, 471–486.

FRANÇA, I. W. L.; LIMA, A. P.; LEMOS, J. A. M.; LEMOS, C. G. F.; MELO, V. M.; SANT'ANA, H. B.; GONÇALVES, L. R. B. Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. **Catalysis Today**, 2015, 255, 15, 10 – 15.

GAUTAM, K.K.; TYAGI, V.K. Microbial surfactants: A Review **Journal of Oleo science**, 2006, 55, 4, 155 – 166.

GHRIBI, D.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S. Enhancement of *Bacillus subtilis* Lipopeptide Biosurfactants Production through Optimization of Medium Composition and Adequate Control of Aeration. **Biotechnology Research International**, Sfax, v. 2011, ID 653654, 6 páginas, jul. 2011.

GIRO, M.E.; MARTINS, J.J.; ROCHA, M.V.; MELO, V.M.; GONÇALVES, L.R. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor, **Biotechnology Journal**, 2009, 4, 5, 738 – 747.

GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, E. C.; RODRIGUES, A. I.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture médium. **Frontiers in Microbiology**, 2015, 6, 59.

GUEZ, J.S.; MÜLLER, C.H.; DANZE, P.M.; BÜCHS, J.; JACQUES, P. Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC6633, **Journal of Biotechnology**, 2008, 134, 1 – 2, 121 – 126.

GURJAR, J. SENGUPTA, B. Production of surfactin from rice mill polishing residue by submerged fermentation using *Bacillus subtilis* MTCC 2423. **Bioresource Technology**, 2015, 189, 243 – 249.

HADDAD, N.I.; WANG, J.; MU, B. Identification of a biosurfactant producing strain: *Bacillus subtilis* HOB2, **Protein & Peptide Letters**, 2009, 16, 1, 7 – 13.

HAZRA, C.; KUNDU, D.; CHAUDHARI, A. Lipopeptide biosurfactant from *Bacillus clausii* BS02 using sunflower oil soapstock: evaluation of high throughput screening methods, production, purification, characterization and its insecticidal activity. **RSC Advances**, 2015, 5, 2974 – 2982.

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Detergent-like action of the antibiotic peptide surfactin on lipid membranes. **Biophysical Journal**, 2001, 81, 3, 1547 – 1554.

HEERKLOTZ, H.; WIEPRECHT, T.; SEELIG, J. Membrane perturbation by the lipopeptide surfactin and detergents as studied by Deuterium NMR, **The Journal of Physical Chemistry**, 2004, 108, 15, 4909 – 4915.

HEERKLOTZ, H.; SEELIG, J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. **European Biophysics Journal**, 2007, 36, 4 – 5, 305 – 314.

HOSONO, K.; SUZUKI, H. Acylpeptides the inhibitors of cyclic adenosine 3''5'-monophosphate phosphodiesterase. III. Inhibition of cyclic AMP phosphodiesterase, **The Journal of Antibiotics**, 1983, 36, 6, 679 – 683.

HSIEH, F.C.; LI, M.C.; LIN, T.C.; KAO, S.S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. **Current Microbiology**, 2004, 49, 3, 186 – 191.

IGLESIAS-FERNÁNDEZ, J.; DARRÉ, L.; KOHLMAYER, A.; THOMAS, R. K.; SHEN, H.; DOMENE, C. Surfactin at the Water/Air Interface and in Solution. **Langmuir**, 2015, 31, 40, 11097 – 11104.

INÈS, M.; DHOUBA, G. Lipopeptide surfactants: Production, recovery and pore forming capacity. **Peptides**, 2015, 71, 100 – 112.

KAKINUMA, A.; HORI, M.; ISONO, M.; TAMURA, G. Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptide lipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. **Agricultural and Biological Chemistry**, 1969, 33, 12, 971 – 972.

KHIRE, J.M. Bacterial Biosurfactants, and Their Role in Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR). In **Biosurfactants**; Sen, R., Ed.; Springer New York: New York, NY, USA, v. 672; p. 146 – 157, 2010.

KHOPADE, A.; BIAO, R.; LIU, X.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and stability studies of the biosurfactant isolated from marine *Nocardiopsis sp.* B4, **Desalination**, 2012, 285, 31, 198 – 204.

KIM, K.; JUNG, S.Y.; LEE, D.K.; JUNG, J.K.; PARK, J.K.; KIM, D.K.; LEE, C.H. Suppression of inflammatory responses by surfactin, a selective inhibitor of platelet cytosolic phospholipase A2. **Biochemical Pharmacology**, 1998, 55, 7, 975 – 985.

KIM, S.Y.; KIM, J.Y.; KIM, S.H.; BAE, H.J.; YI, H.; YOON, S.H.; KOO, B.S.; KWON M.; CHO, J.Y.; LEE, C.E.; HONG, S. Surfactin from *Bacillus subtilis* displays anti-proliferative effect via apoptosis induction, cell cycle arrest and survival signaling suppression. **FEBS Letters**, 2007, 581, 5, 865 – 871.

KONISHI, M.; YOSHIDA, Y.; HORIUCHI, J. I. Efficient production of sophorolipids by *Starmerella bombicola* using a corncob hydrolysate medium. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2015, 119, 3, 317– 322.

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T.; FRANKE, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* okb 105. **Journal of Colloid and Interface Science**, 1998, 204, 1, 1 – 8.

KRACHT, M.; ROKOS, H.; OZEL, M.; KOWALL, M.; PAULI, G.; VATER, J. Antiviral and hemolytic activities of surfactin isoforms and their methyl ester derivatives. **The Journal of Antibiotics**, 1999, 52, 7, 613 – 619.

LAI, C.C.; HUANG, Y.C.; WEI, Y.H.; CHANG, J.S. Biosurfactant-enhanced removal of total petroleum hydrocarbons from contaminated soil, **Journal of Hazardous Materials**, 2009, 167, 1 – 3, 609 – 614.

LIU, X. Y.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Molecular structures of microbial lipopeptides. **Biotechnology Bulletin**, 2005, 4, 18 – 26.

LIU, X.Y.; HADDAD, N.I.A.; YANG, S.Z.; MU, B.Z. Structural characterization of eight cyclic lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* HSO121. **Protein & Peptide Letters**, 2007, 14, 8, 766 – 773.

- LIU, X.Y.; YANG, S. Z.; MU, B. Z. Isolation and characterization of a C12-lipopeptide produced by *Bacillus subtilis* HSO 121. **Journal of Peptide Science**, Shanghai, v. 14, n. 7, p. 864 – 875, fev. 2008.
- LIU, X.Y.; YANG, S.Z.; MU, B.Z. Production and characterization of a C15-surfactin-O-methyl ester by a lipopeptide producing strain *Bacillus subtilis* HSO121. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 1144 – 1151, out. 2009.
- LIU, X.Y.; TAO, X.; ZOU, A.; YANG, S.; ZHANG, L.; MU, B. Effect of the microbial lipopeptide on tumor cell lines: apoptosis induced by disturbing the fatty acid composition of cell membrane. **Protein Cell**, 2010, 1, 6, 584 – 594.
- LIU, J. F.; MBADINGA, S. M.; YANG, S. Z.; GU, J. D.; MU, B. Z. Chemical Structure, Property and Potential Applications of Biosurfactants Produced by *Bacillus subtilis* in Petroleum Recovery and Spill Mitigation. **International Journal of Molecular Sciences**, 2015, 16, 3, 4814 - 4837.
- MA, Z.; HU, J. Production and Characterization of Surfactin-Type Lipopeptides as Bioemulsifiers Produced by a *Pinctada martensii*-Derived *Bacillus mojavensis* B0621A. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2015, 177, 7, 1520 – 1529.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Structural characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45 °C. **Journal of Surfactants and Detergents**, 1999, 2, 3, 367 – 372.
- MARCHANT, R., BANAT, I. M., Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? **Biotechnology Letters**, 2012, 34, 9, 1597 – 1605.
- MARIN, C. P.; KASCHUK, J. J.; FROLLINI, E.; NITSCHKE, M. Potential use of the liquor from sisal pulp hydrolysis as substrate for surfactin production. **Industrial Crops and Products**, 2015, 66, 239 – 245.
- MARTI, M.E.; COLONNA, W.J.; PATRA, P.; ZHANG, H.; GREEN, C.; REZNIK, G.; PYNN, M.; JARRELL, K.; NYMAN, J.A.; SOMASUNDARAN, P. Production and characterization of microbial biosurfactants for potential use in oil-spill remediation. **Enzyme and Microbial Technology**, 2014, 55, 31 – 39.
- MIRELES II, J.R.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R.M. *Salmonella enterica* serovar typhimurium swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: surfactin inhibits biofilm formation. **Journal of Bacteriology**, 2001, 183, 20, 5848 – 5854.
- MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants, **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 2009, 14, 5, 372 – 378.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater, **Bioresource Technology**, 2006, 97, 2, 336 – 341.
- NOAH, K.S.; BRUHN, D.F.; BALA, G.A. Surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis* in a chemostat, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2005, 122, 1, 465 – 473.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J.M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1999, 51, 5, 553 – 563.

PONTE ROCHA, M.V.; GOMES BARRETO, R.V.; MELO, V.M.; BARROS GONÇALVES, L.R. Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by *Bacillus subtilis* LAMI008, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2009, 155, 1, 366 – 378.

RAJPUT, S.; RAJPUT, S.; KUMAR, B. N. P.; SARKAR, S.; DAS, S.; AZAB, B.; SANTHEKADUR, P. K.; DAS, S. K.; EMDAD, L.; SARKAR, D.; FISHER, P. B.; MANDAL, M. Targeted apoptotic effects of thymoquinone and tamoxifen on XIAP mediated Akt regulation in breast cancer. **PLOS ONE**, 2013, 8, 4, 1 – 13.

RAMÍREZ, I. M.; TSAOUSI, K.; RUDDEN, M.; MARCHANT, R.; ALAMEDA, E. J.; ROMÁN, M. G.; BANAT, I. M. Rhamnolipid and surfactin production from olive oil mill waste as sole carbon source. **Bioresource Technology**, 2015, 198, 231 – 236.

RIVERA, O. M. P.; MOLDES, A. B.; TORRADO, A. M.; DOMÍNGUEZ, J. M. Lactic acid and biosurfactants production from hydrolyzed distilled grape marc. **Process Biochemistry**, 2007, 42, 6, 1010 – 1020.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1999, 52, 2, 154 – 162.

SAKTHIPRIYA, N.; DOBLE, M.; SANGWAI, J. S. Action of biosurfactant producing thermophilic *Bacillus subtilis* on waxy crude oil and long chain paraffins. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2015, 105, 168 – 177.

SAMAD, A.; ZHANG, J.; CHEN, D.; LIANG, Y. Sophorolipid Production from Biomass Hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2015, 175, 4, 2246 – 2257.

SCHALLER, K.D.; FOX, S.; BRUHN, D.; NOAH, K.; BALA, G. Characterization of surfactin from *Bacillus subtilis* for application as an agent for enhanced oil recovery. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2004, 115, 1, 827 – 836.

SEN, R.; SWAMINATHAN, T. Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin, **Process Biochemistry**, 2005, 40, 9, 2953 – 2958.

SEN, R.; BACK, N.; COHEN, I. R.; LAJTHA, A.; LAMBRIS, J. D.; PAOLETTI, R. Surfactin: Biosynthesis, Genetics and Potential Applications. In: Ramkrishna Sen. (Org.). *Advances in Experimental Medicine and Biology. Biosurfactants*. New York: Springer Science+Business media, LCC, Landes Bioscience, v. 672, p. 316-323, 2010.

SEYDLOVÁ, G.; SVOBODOVÁ, J. Review of surfactin chemical properties and the potential biomedical applications, **Central European Journal of Medicine**, 2008, 3, 2, 123 – 133.

SHALIGRAM, N.S.; SINGHAL, R.S. Surfactin—a review on biosynthesis fermentation, purification and applications, **Food Technology and Biotechnology**, 2010, 48, 2, 119 – 134.

SHEPPARD, J.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 1987, 27, 2, 110 – 16.

SHEPPARD, J.D.; JUMARIE, C.; COOPER, D.G.; LAPRADE, R. Ionic channels induced by surfactin in planar lipid bilayer membranes, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, 1991, 1064, 1, 13 – 23.

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

SLIVINSKI, C. T. **Produção de surfactina por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana e okara como substrato**. 2012. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

SOUSA, M.; MELO, V. M. M.; RODRIGUES, S.; SANT'ANA, H. B.; GONÇALVES, L. R. B. Screening of biosurfactant-producing *Bacillus* strains using glycerol from the biodiesel synthesis as main carbon source. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2012, 35, 6, 897 – 906.

SOUSA, M.; DANTAS, I. T.; FELIX, A. K. N.; SANT'ANA, H. B.; MELO, V. M. M.; GONÇALVES, L. R. B. Crude Glycerol from Biodiesel Industry as Substrate for Biosurfactant Production by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 2014, 57, 2, 295 – 301.

TENDULKAR, S.R.; SAIKUMARI, Y.K.; PATEL, V.; RAGHOTAMA, S.; MUNSHI, T.K.; BALARAM, P.; CHATTOO, B.B. Isolation, purification and characterization of an antifungal molecule produced by *Bacillus licheniformis* BC98, and its effect on phytopathogen magnaporthe grisea. **Journal of Applied Microbiology**, 2007, 103, 2331–2339.

THOMPSON, D. N.; FOX, S. L.; BALA, G. A. The effect of pretreatments on surfactin production from potato process effluent by *Bacillus subtilis*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2001, 91, 1, 487 – 501.

VEDARAMAN, N.; VENKATESH, N. Production of surfactin by *bacillus subtilis* MTCC 2423 from waste frying oils. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 2011, 28, 2, 175 – 180.

VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*, **Applied and Environmental Microbiology**, 1997, 63, 1, 44 – 49.

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**, 2007, 42, 40 – 45.

WHANG, L.M.; LIU, P.W.; MA, C.C.; CHENG, S.S. Application of biosurfactants, rhamnolipid, and surfactin, for enhanced biodegradation of diesel-contaminated water and soil, **Journal of Hazardous Materials**, 2008, 151, 1, 155 – 163.

WILLENBACHER, J.; YEREMCHUK, W.; MOHR, T.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Enhancement of Surfactin yield by improving the medium composition and fermentation process. **AMB Express**, 2015, 5, 1, 57.

YANG, S.Z.; WEI, D.Z.; MU, B.Z. Determination of the amino acid sequence in a cyclic lipopeptide using MS with DHT mechanism. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, 2006, 68, 1, 69 – 74.

YANG, H.; YU, H.; SHEN, Z. A novel high-throughput and quantitative method based on visible color shifts for screening *Bacillus subtilis* THY-15 for surfactin production. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, 2015, 42, 8, 1139 – 1147.

YEH, M. S.; WEI, Y. H.; CHANG, J. S. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. **Biotechnology Progress**, 2005, 21, 4, 1329 – 1334.

APÊNDICE B

Primeira versão do artigo científico a ser submetido à revista *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*

Produção de surfactina por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em mistura de resíduos agroindustriais

Mariana Munhoz Larini^a (marianamlarini@gmail.com), Maria Inês Rezende^b (mirezende@uel.br), Fabiana Guillen Moreira Gasparin^c (fagasparin@uel.br), Ismael Rodrigues Amador^d (ir.amador@hotmail.com)

^{a,b,c,d} Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid | Pr 445 Km 380, Caixa Postal 6001 – CEP 86051-990, Londrina – PR – Brasil.

Article history: Received: ; revised:; accepted:;. Available online:.

Abstract: O Brasil destaca-se no cenário agrícola mundial como importante produtor de soja, cana de açúcar e arroz, os quais geram resíduos que podem ser empregados como substratos e agentes de estruturação na fermentação em estado sólido (FES). O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de surfactina, um lipopeptídeo da classe de biossurfactantes, por (FES), utilizando *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b, o qual foi cultivado em misturas de resíduos agroindustriais. Os frascos inoculados foram incubados a 37 °C em diferentes períodos de incubação. Os cultivos foram interrompidos com adição de água destilada, seguido de homogeneização e centrifugação. Foram determinados pH, biomassa, peso do sólido fermentado, dosagens de proteínas totais, açúcares totais e redutores e atividade enzimática de protease, xilanase, celulase e lacase dos ELC. Cultivos em maior volume de substrato foram desenvolvidos para produzir surfactina, cuja quantificação foi por CLAE-UV/Vis. O intervalo de tempo de fermentação de maior crescimento celular foi entre 18 e 24 horas de cultivo; Das enzimas analisadas, foram determinadas atividades para a xilanase e protease. A surfactina apresentou maior produção em 18 horas de cultivo. Sendo a produção de surfactina por petróleo de elevado custo e impacto ambiental, utilizar microrganismos é uma alternativa promissora para driblar tais fatores

Keywords: *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b, Biossurfactantes, Fermentação em Estado Sólido, Resíduos Agroindustriais, Surfactina

1. INTRODUÇÃO

Os surfactantes são moléculas anfipáticas, caracterizadas por sua capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido. Sua obtenção pode ser sintética, por de reações químicas, maneira pela qual a maioria é sintetizada atualmente, ou natural, por microrganismos específicos. Os biossurfactantes, produzidos a partir de fontes renováveis, são uma alternativa para a substituição dos sintéticos, originários de derivados do petróleo.

Os biossurfactantes podem ser classificados de acordo com sua composição química. Dentre os grupos, os lipopeptídeos se destaca pela sua eficiência e são produzidos por várias espécies de *Bacillus*. Estes, por sua vez, apresentam elevada capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular, além de alta taxa de crescimento.

Algumas das vantagens dos biossurfactantes frente aos surfactantes sintéticos são biodegradabilidade e baixa toxicidade, maior taxa de redução de TS, solubilidade em água, estabilidade térmica, estabilidade quanto a valores extremos de pH, são produzidos a partir de fontes renováveis e apresentam menor custo de produção.

Os biossurfactantes apresentam inúmeras aplicações frente a diversos setores industriais, tais como o de alimentos, cosméticos, agricultura, detergentes, medicina, e principalmente, na indústria do petróleo [8].

A fermentação submersa (FS) e fermentação em estado sólido (FES) são relatadas como processos de produção de metabólitos microbianos, dentre eles os biossurfactantes. A diferença entre as técnicas reside no teor de água contido nos meios de cultivo, sendo que na FS utiliza-se água como solvente e os substratos estão dissolvidos nos meios de cultivo, enquanto na FES há uso de substratos sólidos, sendo que a água é um dos

componentes e apresenta teores variáveis entre 30 a 70 % [22].

O uso de resíduos agroindustriais para a produção de biossurfactantes tem sido uma boa alternativa, já que reduz a geração de resíduos, além de produzir metabólitos que podem ser comercializados. O Brasil é um país de grande importância no cenário agrícola mundial, sendo um dos grandes produtores de soja. Esse grão fornece um subproduto bastante nutritivo e proteico, o farelo de soja (FS), que pode ser utilizado para obtenção de diferentes produtos através da FES. Também destaca-se como produtor de arroz e cana-de-açúcar, o que leva há um grande acúmulo de casca de arroz (CA) e bagaço de cana-de-açúcar (CA), que são pobres em proteínas, porém, podem ser empregados na FES, proporcionando condições mais favoráveis para o crescimento microbiano em baixo teor de umidade.

Este trabalho visa avaliar a produção de surfactina pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b, utilizando mistura de resíduos agroindustriais como substrato. Para tal, será avaliada a produção do lipopeptídeo pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em FES a 37 °C, em diferentes períodos de cultivo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Microrganismo

O microrganismo utilizado foi a bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b previamente isolada a partir de solo contaminado por petróleo e coletado nas proximidades da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR-PR) [11]. A bactéria foi cedida pelo professor Dr. André Luiz Martinez de Oliveira do Depto. de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina - UEL. Foi mantida em tubos de ensaio contendo meio sólido de DYGS inclinado, após o desenvolvimento do microrganismo foi acrescido glicerol PA, autoclavado, sobre a cultura, que em seguida foi mantida em freezer (- 4 °C). Repiques foram realizados a cada seis meses.

Três alçadas de células do meio sólido DYGS (composição em g L⁻¹: extrato de levedura, 2,0; Fosfato monoácido de potássio, 0,5; Glicose, 0,2; Peptona, 1,5; Sulfato de magnésio, 0,5) foram inoculadas em frascos erlenmeyers de 50 mL contendo meio de sais minerais (MSM) (composição em g L⁻¹ KH₂PO₄, 3,0; K₂HPO₄, 7,0; MgSO₄.7H₂O, 0,2; (NH₄)₂SO₄, 1,0), mantido a 37 °C com agitação de 180 rpm por 24 horas. Após seu crescimento, o *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b foi utilizado como inóculo no meio de cultura. Os resíduos agroindustriais BC, FS e CA, obtidos de garapeiro na cidade de Sertanópolis/PR, Granosul Agroindustrial-Cambé/PR e Máquina de Arroz Yara-Londrina/PR, respectivamente, foram utilizados como substratos sólidos.

2.2 Cultivos em Fermentação em Estado Sólido

A FES foi desenvolvida em Erlenmeyers de 50 mL, contendo 1,5 g de uma mistura dos resíduos BC, FS e CA (0,5 g de cada resíduo), umedecida com 10 mL de MSM e acrescida de glicose 0,2 % (m/v). Os frascos foram inoculados com 200 µL de suspensão de células e incubados a 37 °C em incubadora BOD nos tempos 0, 6, 9, 12, 18, 24, 48 e 72 horas. Cultivos realizados em duplicatas.

Posteriormente, uma segunda FES, empregando 7,5 g da mistura de BC, FS e CA (2,5 g de cada resíduo) foi desenvolvida especificamente para a produção de surfactina, nas mesmas condições do cultivo anterior, exceto pelos intervalos de tempo de cultivo (0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 e 48 horas) e volume de inóculo (500 µL). Cultivos desenvolvidos em triplicata.

Os cultivos foram interrompidos ao final de cada período de incubação com a adição de 10 mL (primeira FES) e 100 mL (segunda FES) de água destilada aos frascos de Erlenmeyer. Posteriormente, o material foi centrifugado a 3.500 x g (primeira FES) e 8.000 x g (segunda FES), a 4 °C por 15 minutos, para a obtenção do extrato livre de células (ELC), que foi congelado para posterior determinações analíticas e extração da surfactina nas FES 1 e 2, respectivamente.

O peso seco do material sólido fermentado da primeira FES foi determinado por gravimetria (70 °C, 24 horas) para avaliar a hidrólise dos substratos.

2.3 Determinação do Desenvolvimento Celular

Na primeira FES, a viabilidade do *B. amyloliquefaciens* MO.04b foi determinada pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC). Os cultivos foram interrompidos pela adição de solução salina estéril 0,85 %, seguida da homogeneização dos frascos. A partir da suspensão de células obtida foram feitas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-8} . Alíquotas de 50 μL das diluições 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura sólido de DYGS. As placas foram incubadas em estufa BOD a 37 °C por 24 horas. Após este período, o número de UFC foi determinado [21]. Todos os procedimentos foram desenvolvidos em quadruplicatas.

Na segunda FES, foi construída uma curva padrão para determinação de biomassa por espectrofotometria. Para a construção da curva: a partir da cultura estoque foram retiradas 3 porções de células da cultura estoque de *B. amyloliquefaciens* MO.04; esse material foi transferido para Erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio DYGS. Os frascos foram incubados (37 °C, 180 rpm, 24 horas); as células foram removidas por centrifugação (8.000 x g, 15 minutos) e o sobrenadante descartado; as células foram lavadas com solução salina 0,85 % (m/v) por três vezes para remoção completa de resíduos do meio; as células lavadas foram ressuspensas em 5 mL de solução salina e 1,0 mL da suspensão foi distribuída em cadinhos de porcelana, em triplicata, que foram deixados em estufa (70 °C, 48 horas, até peso constante). Com 1 mL da suspensão de células foram realizadas as diluições (1:50, 1:60, 1:79, 1:80, 1:90, 1:100. A turbidimetria da suspensão de células foi quantificada a 600 nm para a obtenção da curva analítica da biomassa. Com a curva analítica, obteve-se a equação da reta para calcular da concentração de células em diferentes amostras [31].

2.4 Determinação das Atividade de Enzimas Extracelulares

A atividade das enzimas protease, xilanase, celulase e lacase dos ELC foram determinadas. Para determinação da atividade da protease, o sistema de incubação consistiu de 500 μL do ELC, 250 μL do tampão glicina-NaOH (5 mM, pH 9,5) e 250 μL de soro albumina bovina (SAB) (5 mg mL^{-1}), incubado a 37 °C por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de 250 μL de ácido tricloroacético 10 % e centrifugada a 3.500 x g por 15 minutos. A concentração de tirosina solúvel do sobrenadante foi determinada utilizando a equação obtida da curva analítica (20 a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) construída utilizando o padrão de SAB e absorvância em 650 nm [12]. Uma unidade de atividade proteolítica (U mL^{-1}) foi definida como a quantidade de μmoles de tirosina solúvel liberada por mL do ELC por minuto.

A atividade da xilanase foi determinada pela quantificação dos açúcares redutores liberados da xilana [3]. O sistema de incubação foi formado de 100 μL da solução de xilana de “Larchwood” 1 % como substrato; 50 μL de tampão acetato 50 mM (pH 5,0); 325 μL de água destilada e 25 μL de ELC, totalizando 500 μL de volume final. Foram preparados os controles da enzima (C1), sem a solução de xilana e controle do substrato (C2), na ausência do ELC. O ensaio foi mantido à 50 °C por 20 minutos e a reação interrompida com adição de 500 μL do reativo de Somogyi [32]. Na sequência, os tubos foram colocados em banho Maria fervente por 10 minutos, adicionados 0,5 mL de reativo de Nelson [25] e 3,5 mL de água destilada. Uma unidade de atividade xilanásica foi definida como o número de μmoles de xilose liberados por minuto por mL do ELC.

Para a determinação da atividade celulolítica o sistema de incubação consistiu em 1 mL de tampão citrato 50 mM (pH 4,8); 0,5 mL de ELC e uma tira de papel de filtro “Watman n° 1” com 1 X 6 cm, que equivale a aproximadamente 50 mg de glicose. O sistema foi mantido a 50 °C por 60 minutos e a reação interrompida com adição de 0,5 mL de DNS [20] e incubados em banho Maria fervente por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 3,5 mL de água destilada, as absorvâncias determinadas a 540 nm. Determinou-se a densidade óptica líquida (DO_{liq}) e unidade de atividade celulásica foi definida como o número de μmoles de glicose liberados por minuto por mL do ELC.

A lacase foi determinada utilizando-se o DMP (2,6-dimethoxyphenol) como substrato [4]. O ensaio enzimático foi desenvolvido com volume final de 1 mL, contendo 150 μL do substrato de DMP (10 mM em água deionizada), 150 μL de tampão Mac Ilvaine (pH 5,0), 200 μL de água deionizada e 500 μL do ELC. Foram feitos os controles da enzima (C1) e substrato (C2). Posteriormente, os tubos foram incubados em banho Maria termostatizado por 5 minutos a 50 °C. Utilizou-se água deionizada como branco da reação. Após incubação, as leituras de absorvância no comprimento de onda de 468 nm foram realizadas imediatamente. Determinou-se a

densidade ótica líquida (DO_{liq}) e a unidade enzimática foi definida como o número de μ moles de DMP oxidado por minuto por mL de solução de enzima.

2.5 Extração, Purificação e Quantificação de Surfactina

A surfactina foi extraída, purificada e quantificada a partir dos ELC dos cultivos da segunda FES. Para a extração, 80 mL dos ELC referentes a cada tempo de cultivo foram inseridos em Erlenmeyers de 125 mL, seu pH dos foi ajustado para 2,0 com HCl 6 mol L⁻¹. O sobrenadante acidificado foi mantido em repouso (4 °C, 12 horas) para precipitação da surfactina. O precipitado obtido foi separado por centrifugação (8.000 x g, 15 minutos) e solubilizado em 10 mL de água destilada e o pH neutralizado (7,0) com NaOH 1 mol L⁻¹. 10 mL da solução obtida foi adicionada a 20 mL da mistura de clorofórmio e metanol [CHCl₃:CH₃OH (4:1)] para extração da surfactina. A fração residual, denominada extrato bruto, foi obtida através da evaporação do solvente orgânico (70 °C, evaporador rotatório), sob pressão reduzida [30]. O extrato foi liofilizado para separação e quantificação da surfactina. Experimentos realizados em triplicata.

O extrato orgânico obtido foi pesado em balança analítica, o biosurfactante foi quantificado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Shimadzu LC-10 AD, acoplado a detector Shimadzu SPD-10A UV-Vis, 210 nm), empregando padrão de surfactina (Sigma-Aldrich) a 100 μ g mL⁻¹. Foi realizada separação em modo isocrático em uma coluna cromatográfica Luna[®] (Phenomenex[®]) de fase reversa C₁₈ (250 x 4,6 mm; partícula 5 μ m; poro 100 Å) utilizando mistura de acetonitrila e ácido trifluoroacético 3,8 mmol L⁻¹ (80:20, v/v) como fase móvel, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ [14], [19]. As amostras foram dissolvidas em fase móvel em diferentes concentrações, 20 μ L foram injetados na coluna, em corrida cromatográfica de 45 minutos. Para a obtenção da concentração da surfactina nas amostras integrou-se as áreas dos picos dos homólogos. Aplicou-se o valor de área obtido na equação de regressão calculada pela curva analítica, e foi obtida a concentração de surfactina nas amostras. Para determinar a concentração total de surfactina produzida no processo fermentativo foi determinada a massa total obtida no extrato orgânico seco e, em seguida foi feita a relação da quantidade de surfactina obtida com aquela calculada pela equação de regressão. A fim de determinar o rendimento da surfactina em mg g⁻¹ de sólido seco, a massa de surfactina obtida foi dividida pela massa de substrato sólido utilizado.

2.6 Outras Determinações analíticas

Os cultivos da primeira FES foram submetidos a outras determinações analíticas. O pH dos ELC e controle dos cultivos foram determinados por método potenciométrico.

Para a determinação quantitativa das proteínas totais foi utilizado o método descrito por Hartree [12], utilizando o padrão de SAB (200 μ g mL⁻¹). A curva analítica foi construída com base nas leituras espectrofotométricas a 595 nm, na faixa linear de trabalho de 20 a 200 μ g mL⁻¹.

Para a determinação quantitativa dos açúcares totais foi empregado o método fenol-ácido sulfúrico [9]. Para a construção da curva analítica, glicose (100 μ g mL⁻¹) foi utilizada como padrão, a curva foi realizada com base nas leituras espectrofotométricas a 490 nm, na faixa linear de trabalho de 20 a 100 μ g mL⁻¹.

Para a determinação quantitativa dos açúcares redutores empregou-se o método descrito por Somogyi e Nelson [32], [25]. Para a construção da curva analítica, glicose (100 μ g mL⁻¹) foi utilizada como padrão, e a curva foi realizada com base nas leituras espectrofotométricas a 540 nm, na faixa linear de trabalho de 20 a 100 μ g mL⁻¹.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 FES Prévia

Os cultivos da primeira FES foram desenvolvidos em Erlenmeyers de 50 mL contendo a mistura de BC, FS e CA (0,5 g de cada resíduo), umedecida com MSM [6] e acrescido de glicose 0,2 % (m/v). Os cultivos foram

realizados em 0, 6, 9, 12, 18, 24, 48 e 72 horas e após a interrupção foram obtidos os ELC utilizados para as determinações de pH, proteínas totais, açúcares totais e redutores e peso do sólido fermentado (Tabela 1).

Tabela 1 - Avaliação da capacidade de hidrólise da mistura de resíduos lignocelulósicos farelo de soja, bagaço de cana-de-açúcar e casca de arroz por *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b cultivado a 37 °C

Tempo (horas)	pH	Biomassa (x 10 ⁸ UFC mL ⁻¹)	Proteína Total (mg mL ⁻¹)	Açúcar Total (mg mL ⁻¹)	Açúcar Redutor (mg mL ⁻¹)	Sólido Fermentado Residual (g)
0	6,6	0,0	9,80	5,61	2,37	1,22
6	6,4	1,0	10,99 ± 0,50	4,09 ± 0,03	1,47 ± 0,22	1,17 ± 0,004
9	6,7	1,2	11,30 ± 0,00	3,68 ± 0,20	0,23 ± 0,03	1,11 ± 0,001
12	7,3	14,0	12,12 ± 0,50	4,14 ± 0,05	1,13 ± 0,12	1,03 ± 0,014
18	7,6	134,0	8,94 ± 0,55	2,82 ± 0,23	0,82 ± 0,09	1,08 ± 0,013
24	8,2	10,0	8,99 ± 1,41	2,29 ± 0,03	0,62 ± 0,05	1,05 ± 0,012
48	8,6	8,0	9,30 ± 0,45	3,54 ± 0,10	0,59 ± 0,07	0,94 ± 0,002
72	8,5	7,0	9,55 ± 0,20	3,05 ± 0,02	0,78 ± 0,09	0,93 ± 0,000

O pH final do ELC foi de 6,6 a 8,5 após 72 horas de fermentação, indicando que houve uma mudança no meio após o fim do cultivo. A produção de biomassa foi crescente até 134×10^8 UFC mL⁻¹ após 18 horas, com redução até 7×10^8 UFC mL⁻¹ após 72 horas de cultivo. O teor de açúcares totais e redutores reduziu em 45,6 % e 67, 1 % após 72 horas de fermentação em relação aos controles. O teor médio de proteínas apresentou oscilações durante o período de tempo estudado, com aumento de 23,7 % do início do cultivo até as 12 horas, com redução de 25,8 % a partir das 12 horas até 24 horas de cultivo, por fim, com aumento de 6,2 % a partir de 24 horas até o fim do cultivo. Quanto ao material sólido fermentado, verificou-se redução de 23, 8 % do peso seco. Este resultado mostra que após 72 horas de cultivo o microrganismo hidrolisou aproximadamente 25 % do total dos resíduos agroindustriais utilizados como substratos.

Foi avaliado o crescimento celular do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em cultivo com MSM [6], acrescido de 0,2 % (p/v), seguido de incubação a 28 2 °C e 180 rpm, nos períodos de tempo de 3, 6, 9, 12, 18 e 24 horas. Diluições seriadas dos cultivos foram realizadas, 20 µL dessas diluições foram plaqueadas em meio sólido e incubadas por 24 horas a 28 °C. Resultados do crescimento celular indicaram que o período de maior proliferação celular foi de 12 até 18 horas, com aproximadamente 5×10^7 a $3,75 \times 10^8$ UFC mL⁻¹, sendo que de 18 a 24 horas o número de células se manteve constante [27]. O perfil de crescimento do *B. amyloliquefaciens* MO.04b em FES utilizando as misturas de FS, CA e farelo de milho, ao longo de 48 horas de cultivo, com intervalos de 6 horas de fermentação, apresentou pico de crescimento de 1×10^8 UFC gSS⁻¹ (unidades formadoras de colônias por grama de substrato seco) em 12 horas, a partir deste tempo, houve desenvolvimento constante até 48 horas [21]. O crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em FS foi avaliado, onde os cultivos foram preparados com MSM [6], contendo 0,2 % (m/v) de glicose. A incubação ocorreu a 37 °C e 180 rpm, durante intervalos de tempo 0, 3, 6, 9, 12, 21 e 24 horas, seguida das diluições seriadas dos cultivos (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000), 200 µL dessas diluições foram plaqueadas em meio sólido de DYGS, incubadas por 24 horas a 37 °C, sendo então determinadas as unidades formadoras de colônias. Verificou-se que de 10 horas até 18 horas de cultivo a concentração celular ocorreu de maneira mais expressiva, de $1,4 \times 10^7$ a $6,6 \times 10^7$ UFC mL⁻¹, depois de 18 horas houve a fase de morte celular [29].

3.2 Atividades Enzimáticas

As atividades de celulase, xilanase, protease e lacase foram testadas nos ELC obtidos dos cultivos da primeira FES, os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Atividade das enzimas celulase, xilanase, protease e lacase produzidas pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em 1,5 g da mistura de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz, incubada a 37 °C em diferentes tempos de cultivo

Tempo (horas)	Celulase (U mL ⁻¹)	Xilanase (U mL ⁻¹)	Protease (U mL ⁻¹)	Lacase (U mL ⁻¹)
6	ND*	0,415 ± 0,021	0,940 ± 0,393	ND ^a
9	ND*	0,626 ± 0,146	0,980 ± 0,071	ND ^a
12	ND*	0,808 ± 0,002	0,917 ± 0,060	ND ^a
18	ND*	0,796 ± 0,043	0,690 ± 0,095	ND ^a
24	ND*	0,734 ± 0,071	0,524 ± 0,167	ND ^a
48	ND*	0,579 ± 0,093	0,607 ± 0,036	ND ^a
72	ND*	0,267 ± 0,152	0560 ± 0,155	ND ^a

ND*: Não Detectado

Dentre as enzimas, o MO.04b produziu protease em maiores atividades, sendo verificadas as maiores atividades entre 6 e 12 horas de cultivo, e decréscimo da atividade a partir de 12 horas até o fim do cultivo, com redução de 61,1 %.

A atividade de protease produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em FES nos resíduos agroindustriais BC, CA, torta de soja e torta de milho foi determinada. O melhor substrato para a produção de protease foi a torta de soja, com atividade proteolítica de 180 U mL⁻¹ [28].

A produção de protease por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em farelo de soja (FS) e farelo de milho (FM) foi avaliada. A atividade da protease no extrato de FS foi de 146,08 U mL⁻¹, no extrato de FM foi de 63,41 U mL⁻¹, utilizando extratos sem diálise (ESD). O melhor tempo de cultivo foi 9 horas em FS para protease (11,7 U mL⁻¹), usando em extratos dialisados (ED), em FM não foi produzida protease. A condição ótima de produção de protease foi obtida na mistura de substratos FS, BC e CA, atingindo atividade de 20,32 U mL⁻¹ [29].

Ao relacionar o percentual de hidrólise do material seco fermentado (Tabela 2) com a atividade de protease, é possível perceber que a redução do material sólido fermentado em 9 horas de cultivo foi de aproximadamente 10 %, sendo que em 72 horas de cultivo a redução foi de aproximadamente 25 %, o que mostra que nos períodos de maior atividade da protease, entre 6 e 9 horas, ocorreu redução mais acentuada dos resíduos.

Em relação a produção de xilanase, observa-se os ELC dos cultivos apresentaram atividade para a enzima, sendo a produção máxima obtida de 0,81 U mL⁻¹ após 12 horas de cultivo. Relacionando a redução do material sólido fermentado com a atividade de xilanase, é possível notar que houve diminuição de aproximadamente 15 % do resíduo (Tabela 2) em 12 horas de cultivo, período no qual a xilanase apresentou atividade máxima. Em apenas 12 horas de cultivo a redução do resíduo foi superior à redução encontrada no restante do período de cultivo, fato que pode estar relacionada à maior atividade de protease e xilanase entre as 9 e 12 horas de cultivo.

Em fermentações com o *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A, através da transferência de culturas puras do microrganismo em meio sólido (NaNO₃ 1 g L⁻¹, K₂HPO₄ 1 g L⁻¹, KCl 1 g L⁻¹, MgSO₄ 0,5 g L⁻¹, extrato de levedura 0,5 g L⁻¹, glicose 1 g L⁻¹, ágar 17 g L⁻¹) contendo 5 g L⁻¹ de xilana, a atividade de xilanase foi de 10,5 U mL⁻¹ [2].

A produção desta enzima foi avaliada por duas espécies de microrganismos termofílicos do gênero *Bacillus sp.*, utilizando-se resíduos agroindustriais como matéria-prima. A melhor produção de xilanase (1,35 U mL⁻¹) foi obtida em meio de crescimento contendo dreche cervejeiro 1 % (m/v), sendo que a atividade xilanolítica também foi observada quando o farelo de trigo (1,32 U mL⁻¹), BC (0,80 U mL⁻¹), tupinambo (0,32 U mL⁻¹), sabugo de milho (0,30 U mL⁻¹) e xilana industrial (0,21 U mL⁻¹) foram utilizados como substratos. A xilanase de *Bacillus sp.* 3M foi caracterizada em termos de perfil de temperatura e pH. A melhor atividade da enzima foi observada na temperatura de 60 °C no pH de 5,3. A enzima manteve 100 % da sua atividade original depois de 96 horas a 60 °C e pH 7,0 [17].

A atividade máxima de xilanase de 0,81 U mL⁻¹ produzida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b neste trabalho estão em concordância com o valor obtido ao empregar o BC (0,80 U mL⁻¹) [17], sugerindo que estudos de otimização da produção e caracterização da enzima sejam desenvolvidos visto que a produção da mesma é mais frequente nos fungos filamentosos.

Os ELC não apresentaram atividade de celulase e lacase, embora o gênero *Bacillus* possa produzi-las em condições específicas.

Foi analisada a capacidade de produção de celulase por um isolado de *Bacillus* em meio de cultivo acrescido de carboximetilcelulose, celulose microcristalina, palha de trigo e casca de arroz. O meio de cultivo acrescido de carboximetilcelulose induziu a maior atividade após 6 horas de incubação, com $0,12 \text{ U mL}^{-1}$. [7].

Os resultados da produção de celulase (CMCase) termofílica pelo *Bacillus sp.* C1AC5507, utilizando BC, mostraram maior atividade celulolítica entre pH 4,2 – 5,5 e temperatura de $67 - 70 \text{ }^\circ\text{C}$, com máxima atividade de $0,37 \text{ U mL}^{-1}$ em pH 4,2 e temperatura de $70 \text{ }^\circ\text{C}$ [26].

A bactéria produtora de lacase, *Bacillus subtilis* MTCC 2414, foi estudada em substratos agroindustriais. Os maiores rendimentos de lacase foram em farelo de arroz e farelo de trigo. Ao variar, separadamente, alguns parâmetros (temperatura, pH, tempo de incubação e fontes de carbono e nitrogênio), os autores detectaram produções máximas de: 270 U mL^{-1} ($30 \text{ }^\circ\text{C}$), 345 U mL^{-1} (pH 7,0) e 267 U mL^{-1} (96 horas de incubação). As fontes de carbono e nitrogênio resultaram em altas rendimentos de enzima, com 3 % de sucrose (275 U mL^{-1}) e 3 % de peptona ($352,2 \text{ mL}$) para farelo de arroz, e 3 % de sucrose ($247,4 \text{ U mL}^{-1}$) e 3 % de peptona (328 U mL^{-1}) para o farelo de trigo, respectivamente [24].

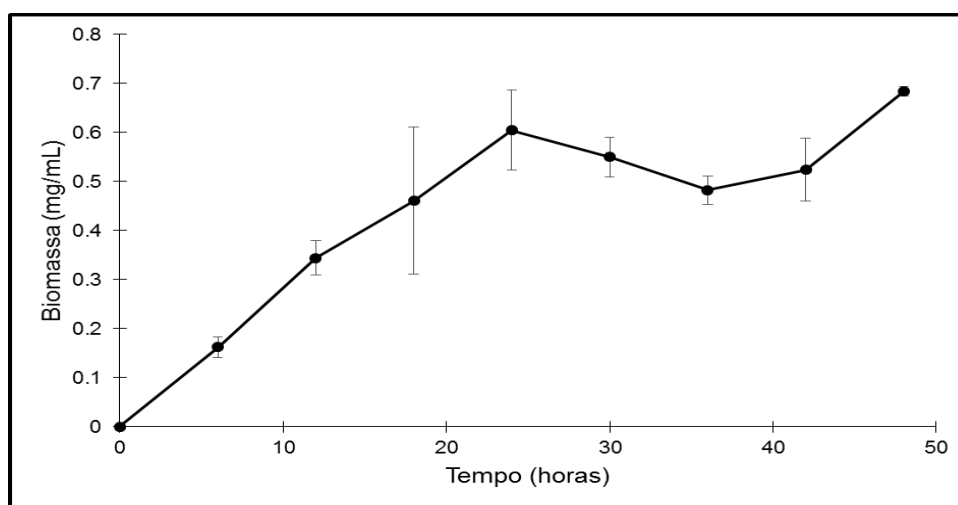
Os resultados, observados na literatura indicam que a espécie de *Bacillus* é capaz de produzir a lacase, ao contrário do observado nas condições deste.

3.3 Determinação do desenvolvimento Celular por Curva Padrão de Biomassa

A determinação de desenvolvimento celular dos ELC da segunda FES se deu através da curva padrão de biomassa, cuja equação de regressão linear obtida foi $y = 1,6556x + 0,0893$, com R^2 de 0,992. A biomassa foi medida com a suspensão do material retirado dos cultivos, e a partir desta suspensão foram realizadas as determinações através da turbidimetria a 600 nm, e em seguida foi quantificada através da curva padrão de biomassa, em mg mL^{-1} (Figura 1).

Houve aumento de biomassa nas primeiras 24 horas de cultivo. Nas primeiras 6 horas a biomassa correspondia a $162 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, atingindo o pico em 24 horas, com $605 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Após esse período a biomassa diminuiu até as 36 horas, atingindo $483 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, voltou a se elevar até 48 horas, atingindo o máximo, com $684 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$.

Figura 1 - Biomassa da suspensão obtida do cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b em FES em 7,5 g da mistura contendo bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ em diferentes tempos de cultivo



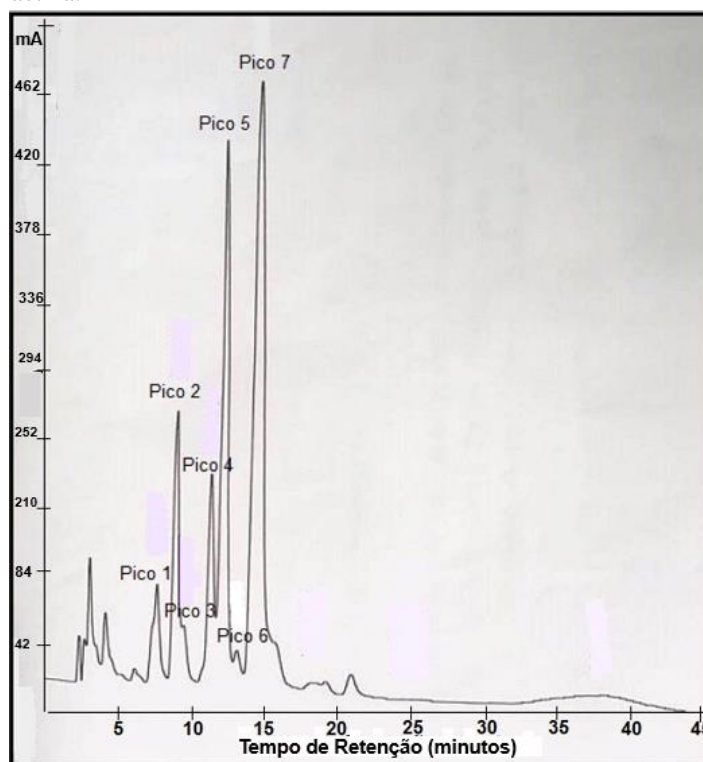
3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Procedeu-se com a aplicação da CLAE para a identificação e quantificação da surfactina produzida pelo *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b na segunda FES. O padrão de surfactina ($100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e os extratos foram

dissolvidos em acetonitrila e ácido trifluoroacético 3,8 mmol L⁻¹ (80:20, v/v), e cada amostra foi dissolvida em uma concentração diferente. Foram injetados 20 µL na coluna cromatográfica em uma corrida de 45 minutos, com vazão de 1,0 mL min⁻¹.

Foi realizado o cromatograma do padrão de surfactina a 100 µg mL⁻¹. O perfil cromatográfico apresentou 7 grandes picos com tempos de retenção de 8,392; 9,725; 10,325; 12,208; 13,067; 14,100 e 15,508 minutos. Porém, em nenhuma das amostras os picos 1 e 6 estavam presentes assim como os demais picos evidenciados na Figura 2. Sendo assim, foram considerados 5 picos (picos 2, 3, 4, 5 e 7), dos 7 apresentados na Figura 2, como sendo os homólogos da surfactina.

Figura 2 – Cromatograma do padrão de surfactina (Sigma-Aldrich) 100 µg mL⁻¹, apresentando os 7 picos, cujos tempos de retenção foram de 8,392; 9,725; 10,325; 12,208; 13,067; 14,100 e 15,508 minutos. Os picos 2, 3, 4, 5 e 7 são os homólogos da surfactina.



Os extratos liofilizados referentes a cada período de cultivo foram agrupados e pesados, esse peso total de extratos sólidos referentes aos diferentes tempos de cultivo foi dissolvido na fase móvel do sistema em diferentes concentrações (mg mL⁻¹), para serem aplicados no sistema de CLAE. Para determinar a concentração de surfactina presente em cada amostra, foi feita a integração da área dos picos dos homólogos, e em seguida a área obtida foi aplicada na equação de regressão calculada através da curva analítica construída em uma faixa de concentração de surfactina de 20 µg mL⁻¹ a 100 µg mL⁻¹. Para determinar a concentração de surfactina presente em cada amostra foi feita a integração da área dos picos dos homólogos, e em seguida a área obtida foi aplicada na equação de regressão. Para determinar a quantidade de surfactina presente em todo o extrato obtido do processo fermentativo determinou-se a massa total do extrato orgânico seco e então relacionou-se a quantidade de surfactina obtida com aquela calculada pela equação de regressão. Por fim, para o rendimento da surfactina em mg g⁻¹ de substrato seco (mg gSS⁻¹), a massa de surfactina obtida foi dividida pela massa de substrato sólido utilizado. Todas estas determinações estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Massa de extrato seco obtido do processo fermentativo; Concentração das amostras aplicadas no sistema de CLAE; Concentração de surfactina nas amostras; Concentração de surfactina no total de extrato seco; Rendimento de surfactina, em mg por grama de substrato seco

Tempo (horas)	Peso do extrato seco (mg)	Concentração das amostras (mg mL ⁻¹)	Surfactina (mg mL ⁻¹)	Rendimento de surfactina (mg gSS ⁻¹)*
6	16,7	1,04	5,76	0,77
12	16,1	0,80	13,21	1,76
18	13,4	0,89	64,16	8,55
24	1,3	0,75	1,69	0,23
30	2,5	1,25	1,31	0,17
36	3,4	1,13	4,62	0,62
42	3,2	1,00	5,02	0,67
48	1,0	1,00	0,34	0,05

Mg gSS⁻¹*: miligramas por grama de substrato seco

É possível verificar que houve um pico na produção de surfactina em 18 horas de cultivo, atingindo 8,55 mg gSS⁻¹, mesmo período em que houve pico no crescimento celular (134×10^8 UFC mL⁻¹) nos cultivos da primeira FES. A produção do biossurfactante foi de 0,77 mg gSS⁻¹ (6 horas), atingiu seu máximo de produção de 8,55 mg gSS⁻¹ (18 horas), seguido de diminuição até 30 horas de cultivo (0,14 mg gSS⁻¹), aumentando até 42 horas (0,67 mg gSS⁻¹), e novamente decrescendo até as 48 horas de cultivo (0,05 mg gSS⁻¹).

Linhagens de *Bacillus sp.* BMN 14 e BMN 27 foram cultivadas em processos fermentativos a 37 °C e 140 rpm em agitador de banho térmico. Os tempos analisados foram de 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 e 30 horas de cultivo. O biossurfactante produzido foi a surfactina, para quantificá-la os autores utilizaram a CLAE, usando a mesma fase móvel deste trabalho e coluna mantida a 40 °C. Os autores analisaram a biomassa e produção de surfactina ao longo do tempo, observaram que houve aumento da massa celular até 18 horas nas linhagens BMN 14 (0,50 g L⁻¹) e BMN 27 (0,36 g L⁻¹), seguido pela produção do biossurfactante, que continua a crescer até o fim do processo. Os autores acreditam que essa diminuição no crescimento após as 18 horas tenha se dado em função da produção do biossurfactante [13]. Ainda, a inibição do crescimento de massa celular em alta concentração de produto é um fenômeno comum em processos fermentativo [16]. Esta pode ser a explicação para o que ocorreu no presente trabalho, o qual apresentou pico de crescimento celular nas 18 horas de cultivo, apresentando também pico de produção de surfactina neste período. Uma produção aproximada de 1,42 g L⁻¹ de surfactina foi obtida por BMN 14 (24 horas). Em contrapartida, a linhagem BMN 27 produziu aproximadamente 0,62 g L⁻¹ no mesmo período. Isto implica que a produção de biossurfactante pela linhagem BMN 27 mostrou maior dependência pelo crescimento celular que a linhagem BMN 14. Consequentemente, a linhagem BMN 14 foi mais capaz de produzir o biossurfactante com glicose como substrato. Este resultado é sustentado pelo maior aumento na tensão superficial com a linhagem BMN 14 (até 27,2 mN m⁻¹) que com a linhagem BMN 27 (até 34,3 mN m⁻¹). Os autores não observaram nenhuma mudança nos valores de tensão superficial (TS) em ambas as linhagens após 18 horas. Segundo os autores, tal fato pode estar ligado à formação de outros produtos metabólicos, consequentemente estes produtos metabólicos não afetaram a TS. Além disso, uma mudança na TS pode ter sido causada pela saturação de interface com as moléculas do surfactante [1].

A biossíntese dos análogos estruturais da surfactina por *Bacillus subtilis* KB1 e #309 foram estudados. As culturas foram incubadas (37 °C, 24 horas, 180 rpm) em meio Landy [18]. A curva de crescimento foi realizada com cultivo das cepas durante 12 horas em meio Luria-Bertani (LB) a 37 °C com agitação a 150 rpm. Testes de atividade enzimática de protease e celulase foram realizados. Uma FES foi realizada em tubos de vidro contendo bolo de colza (couve-nabiça) misturada com solução bacteriana em razão de volume de bolo de colza e ar de 1:1, contendo 6,6 g de bolo de colza. Após 24 horas de fermentação uma amostra de 1 g foi coletada, suspensa em 8 mL de metanol, extraída após 2 horas de incubação (28 °C, 180 rpm). A CLAE-UV foi utilizada em seguida. A fase móvel foi a mesma deste trabalho, com mudanças de gradiente durante o experimento, vazão de 1 mL min⁻¹ e detecção por UV a 210 nm para permitir a detecção dos homólogos da surfactina (sinal do grupo ácido da porção hidrofóbica) [15].

As taxas de crescimento das duas cepas foram comparadas. Ambas as cepas atingiram a fase estacionária ao mesmo tempo (24 horas). A cepa #309 atingiu densidade óptica maior, mostrou crescimento diáxico (retomou o crescimento após 48 horas), perfil de crescimento semelhante ao encontrado neste trabalho nos cultivos da segunda FES (pico de crescimento em 24 horas, com retomada de crescimento em 48 horas de

cultivo). Assim, em contraste à KB1, a cepa #309 passou por reprogramação metabólica, mostrando diferenças substanciais entre as cepas. Ambas cepas exibiram atividade enzimática extracelular semelhantes. *B. subtilis* KB1 e #309 produziram proteases e celulases, enzimas avaliadas no atual trabalho. As cepas #309 e KB1 produziram 1,452 UA (unidades de atividade) e 1,436 UA de protease, e 1,60 UA e 1,70 UA de celulase, respectivamente, em 24 horas de cultivo. No atual trabalho, o microrganismo não produziu celulase, mas apresentou produção de protease, atingindo $0,524 \text{ U mL}^{-1}$ desta enzima em 24 horas de cultivo, o que equivale a aproximadamente um terço da atividade produzida pelos microrganismos referenciados no mesmo período de tempo [15].

Em relação à produção de surfactina, as cepas #309 e KB1 produziram $7,4 \text{ mg gSS}^{-1}$ e $10,9 \text{ mg gSS}^{-1}$, respectivamente. No atual trabalho, em 24 horas de cultivo, a produção de surfactina por grama de substrato seco foi de $0,23 \text{ mg gSS}^{-1}$, enquanto [15] produziu $7,4 \text{ mg gSS}^{-1}$ (#309) e $10,9 \text{ mg gSS}^{-1}$ (KB1) neste período. Porém, em 18 horas de cultivo, no atual trabalho foram produzidos $8,55 \text{ mg gSS}^{-1}$, resultado intermediário entre os produzidos pelas duas cepas em 24 horas [15].

O *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 foi cultivado em quatro diferentes condições: FS durante 12 horas, FS com Okara em 24 horas de cultivo, FES com Okara em 36 horas de cultivo e FES com Okara e espuma de poliuretano em 48 horas de cultivo, todos utilizando glicerol como fonte de carbono para a produção de surfactina. Para quantificar o biosurfactante produzido foi utilizada a CLAE, equipamento acoplado a detectores SPA-10 UV/Vis a 210 nm e ESI-MS. Foi utilizada mesma fase móvel deste trabalho, vazão de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. Assim como neste trabalho, foram visualizados cinco homólogos, denominados C_{12} , C_{13} , C_{14} , C_{15} e C_{16} , com tempos de retenção de 3,40; 4,06; 5,35; 6,78 e 7,28 minutos. O rendimento de biosurfactante por kg de substrato seco foi de $1.728 \text{ mg kgSS}^{-1}$ (FS com Okara, 24 horas), $410,4 \text{ mg kgSS}^{-1}$ (FES, com Okara, 36 horas) e $356,8 \text{ mg kgSS}^{-1}$ (FES, Okara/Espuma, 48 horas) [5].

Os *B. subtilis* DSM 10T, *B. amyloliquefaciens* DSM 7T e *B. methylotrophicus* DSM 23117 foram cultivados. As quantidades de surfactina obtidas foram de $54,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 24 horas (*B. subtilis* DSM 10T), $2,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 48 horas (*B. amyloliquefaciens* DSM 7T) e $4,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 48 horas (*B. methylotrophicus* DSM 23117). Ao comparar a quantidade de surfactina produzida pelo *B. amyloliquefaciens* DSM 7T com o *B. amyloliquefaciens* MO-04B utilizado neste trabalho, ambos cultivados em 48 horas, evidencia-se que a cepa deste trabalho produziu $0,34 \text{ mg mL}^{-1}$ e a cepa DSM 7T, $2,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, ou $0,0021 \text{ mg mL}^{-1}$, quantidade inferior ao deste estudo [10].

O *B. pumilus* UFPEDA 448 foi cultivado em FES utilizando BC e okara como substrato em 48 horas de cultivo. O rendimento de surfactina por litro de solução umedecedora utilizando BC e okara (1:1) em FES (48 horas, $37 \text{ }^\circ\text{C}$) foi de $0,484 \text{ g LSU}^{-1}$ [30].

Bacillus DSM 10^T, DSM 3256, DSM 3258, DSM 1090, ATCC 21332 e LM43a50^{°C} foram cultivados em biorreator. A surfactina obtida foi quantificada por CLAE-UV/vis. A fase móvel foi a mesma deste trabalho, em corrida cromatográfica de 25 minutos. Foram encontrados 6 picos para o padrão de surfactina entre os tempos de retenção de 6 e 13 minutos. As cepas DSM 1090, ATCC 21332, DSM 3258, DSM 10^T, LM43a50^{°C} e DSM 3256 produziram 0,8; 1,33; 1,36; 0,8; 0,53 e 0,08 g de surfactina, respectivamente [33].

O *Bacillus amyloliquefaciens* B128^d foi cultivado, incubado a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 120 horas. CLAE-UV/vis foi realizada a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e mesma fase móvel deste trabalho, comprimento de onda de 210 nm. Foram encontrados seis picos representando os homólogos do padrão de surfactina. O microrganismo foi capaz de produzir $0,452 \text{ g L}^{-1}$ de surfactina, resultado superior aos encontrados neste trabalho [14].

B. subtilis ATCC 21332 foi incubado (200 rpm, $30 \text{ }^\circ\text{C}$, 96 horas). Utilizou-se CLAE-UV/vis com mesma fase móvel deste trabalho, vazão de $2,2 \text{ mL min}^{-1}$, injeção de $30 \mu\text{L}$ e monitorado a 205 nm. A concentração de surfactina produzida pelo microrganismo foi de $168,28 \text{ mg mL}^{-1}$ [23].

4. CONCLUSÃO

O *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b é capaz crescer em mistura de resíduos de bagaço de cana-de-açúcar, farelo de soja e casca de arroz e de hidrolisar aproximadamente 25 % (m/m) do total da mistura de resíduos agroindustriais utilizados como substratos em 72 horas de cultivo em FES a 37 ± 2 °C. Nestas condições, o microrganismo foi capaz de produzir as enzimas protease e xilanase, não produziu lacase e celulase. A análise em (CCD) não se mostrou eficiente para identificação e separação da surfactina produzida pelo microrganismo nas condições de FES estabelecidas (37 ± 2 °C, em até 48 horas de cultivo, em mistura de BC, FS e CA), mas a bactéria se mostrou capaz de produzir surfactina, tendo a máxima produção, quantificada por CLAE, em 18 horas de cultivo.

5. REFERÊNCIAS

- [1] ABDEL-MAWGOUD, A. M.; ABOULWABA, M. M.; HASSOUNA, N. A. H.. Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolate BS5. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 150, 289 – 303.
- [2] AMORE, A.; PARAMESWARAN, B. KUMAR, R.; BIROLO, L.; VINCIGUERRA, R.; MARCOLONGO, L.; IONATA, E.; LA CARA, F.; PANDEY, A.; FARACO, V. Application of a new xylanase activity from *Bacillus amyloliquefaciens* XR44A in brewer's spent grain saccharification. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2014, 90, 573 – 581.
- [3] BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. International testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*, 1992, 23, 257 – 270.
- [4] BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; KURTBÖKE, I.; HARY, G. E. S. Vertryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye Poly R-478. *Letters in Applied microbiology*, 1996, 23, 93 - 96.
- [5] BUGAY, C. Biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp.: estudos de produção e caracterização. 2009. 82 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2009.
- [6] CAMILIOS NETO, D.; MEIRA, J.A.; ARAÚJO, J.M.; MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N. Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 81, 441 – 448.
- [7] DE MARCO, É. G. Produção e caracterização de celulases produzidas por um isolado de *Bacillus* sp. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- [8] DECESARO, A.; RIGON, M.R. Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Química Nova*, 2013, 36, 7, 947 – 954.
- [9] DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 1956, 28, 350 – 356.
- [10] GEISSLER, M.; OELLIG, C.; MOSS, K.; SCHWACK, W.; HENKEL, M.; HAUSMANN, R. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) for the simultaneous quantification of the cyclic lipopeptides Surfactin, Iturin A and Fengycin in culture samples of *Bacillus* species. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2012, 1044 – 1045, 214 – 224.
- [11] GRANZOTTO, G.; MARCELINO, P. R. F.; BARBOSA, A. M.; RODRIGUES, E. P.; REZENDE, M. I.; OLIVEIRA, A. L. M. Culturable bacterial pool from aged petroleum-contaminated soil: identification of oil-eating *Bacillus* strains. *Annals Microbiology*, 2012, 62, 1681 – 1690.
- [12] HARTREE, E.F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 1972, 48, 422 – 427.
- [13] HERYANI, H.; PUTRA, M. D. Kinetic study and modeling of biosurfactant production using *Bacillus* sp. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2017, 27, 49 – 54.
- [14] HSIEH, F.C.; LI, M.C.; LIN, T.C.; KAO, S.S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. *Current Microbiology*, 2004, 49, 186 – 191.
- [15] JAJOR, P.; PILAKOWSKA-PIETRAS, D.; KRASOWSKA, A.; LUKASZEWICZ, M. Surfactin analogues produced by *Bacillus subtilis* strains grown on rapeseed cake. *Journal of Molecular Structure*, 2016, 1126, 141 – 146.

- [16] JONES, R. P.; GREENFIELD, P. F. A review of yeast ionic nutrition. I. Growth and fermentation requirements. *Process Biochemistry*, 1984, 19, 48 – 60.
- [17] LADEIRA, S. A. Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção de celulasas e xilanases por espécies de bacillus sp. 2013. 139 f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, Campos dos Goytacazes, 2013.
- [18] LANDY, M. WARREN, G. H.; ROSENMAN, S. B.; COLIO, L. G. Bacillomycin; an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1948, 67, 539 – 541.
- [19] LIU, X.; REN, B.; GAO, H.; LIU, M.; DAI, H.; SONG, F.; YU, Z.; WANG, S.; HU, J.; KOKARE, C. R.; ZHANG, L. Optimization for the Production of Surfactin with a New Synergistic Antifungal Activity. *PLoS ONE*, 2012, 7, 1 – 9.
- [20] MANDELS, M., ANDREOTTI, R., ROCHE, C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology and bioengineering symposium*, 1976, 16, 21 – 33
- [21] MASSI, J.B. Farelo de soja e casca de arroz para a produção de lipopetideos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b. 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, 2014.
- [22] MITCHELL, D.A.; KRIEGER, N.; BEROVIC, M. *Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation*. v.1, ed. 1, Heidelberg: Springer, 2006, 450 p.
- [23] MUBARAK, M. Q. E.; HASSAN, A. R.; HAMID, A. A.; KHALIL, S.; ISA, M. H. M. A Simple and Effective Isocratic HPLC Method for Fast Identification and Quantification of Surfactin. *Sains Malaysiana*, 2015, 44, 115 – 120.
- [24] MUTHUKUMARASAMY, N. P.; JACKSON, B.; RAJ, A. J.; SEVANAN, M. Production of Extracellular Laccase from *Bacillus subtilis* MTCC 2414 Using Agrosidues as a Potential Substrate. *Biochemistry Research International*, 2015, 2015, 9 p.
- [25] NELSON, N. A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biochemistry*, 1944, 153, 376 – 380.
- [26] PADILHA, I.Q.M.; CARVALHO, L.C.T.; DIAS, P.V.S.; GRISI, T.C.S.L.; SILVA, F.L.H.; SANTOS, S.F.M.; ARAÚJO, D.A.M. Produção e caracterização parcial de celulase termofílica de *Bacillus* sp. utilizando bagaço de cana. 52o Congresso Brasileiro de Química. Recife, 2012.
- [27] PAPI, M. C. Biossurfactantes de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b: Produção, otimização e caracterização molecular. 2013. 113 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.
- [28] SANTOS, L. M. Perfil de Enzimas Extracelulares Produzidas por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b sob Condição de Fermentação em Estado Sólido. 2012. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.
- [29] SANTOS, L. M. Farelo de soja e farelo de milho como substratos na produção de amilase e protease por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b. 2015. 113 f. Dissertação (mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, 2015.
- [30] SLIVINSKI, C. T. Produção de surfactina por *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 em fermentação em estado sólido utilizando bagaço de cana e okara como substrato. 2012. 143 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- [31] SOARES, D.W.F. Produção e caracterização de biossurfactantes obtidos por linhagens de *Bacillus* sp. isoladas de estações de tratamento de águas residuais e de solo de manguezais (Ceará – Brasil). 2014, 202 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade de Granada, Fortaleza, 2014.
- [32] SOMOGYI, M.A. A new reagent for determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry*, 1945, v. 160, p. 61 – 68.
- [33] WILLENBACHER, J.; ZWICK, M.; MOHR, T.; SCHMID, F.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Evaluation of different *Bacillus* strains in respect of their ability to produce Surfactin in a model fermentation process with integrated foam fractionation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98, p. 9623 – 9632.

ANEXOS

ANEXO A

Normas da Revista Biotechnology Journal para publicação de artigos de revisão

((This is a template for writing a review type article for Biotechnology Journal.

Please replace fields and brackets “[xxx]” with the appropriate text.

Leave headings as they are

Comments are in blue and enclosed in double brackets; delete all comments after you have read them.

Word count and display elements

Review: 8000 words – up to 5 display elements (figures/tables)

Mini-review: 4000 words – up to 2 display elements (figures/tables)

Perspective: 4000 words – up to 5 display elements (figures/tables)

(word count includes references, tables & figure legends)

Revised manuscripts, include:

Point-by-point response with reviewer comment followed by author response. Specify in this letter the location of the changes (e.g. section 1, paragraph 1)

Highlight the changes in the manuscript))

Review / Mini-review / Perspective

((keep only the option that corresponds to your manuscript))

[Title: insert title here]

((Title needs to describe the main experimental findings of the manuscript, i.e. what you found and NOT what you did.

Place important keywords at the beginning of the title))

[Given-Name Middle-initial Family-Name]1

[Given -Name Middle-initial Family -Name]2

[Given -Name Middle-initial Family-Name]3

1[Department, Institution, City, Country]

2[Department, Institution, City, Country]

3[Department, Institution, City, Country]

Correspondence: [Salutation Given-Name Middle-initial Family-Name, Department, Institution, Street, Postal Code and City, Country].

E-mail: [insert email address]

Keywords: [List five keywords; order the keywords alphabetically]

((Keywords should be words that a colleague would use to find your paper, it should be specific and not general))

Abbreviations: [Use the following text style: Abb1, abbreviation 1; Abb2, abbreviation 2]

((List all abbreviations used in the text. Common abbreviations such as DNA are NOT necessary in this list))

Abstract

((The abstract must provide a succinct SUMMARY of the whole paper and should include the following elements

- Background (information available and accepted in the field; why the topic is worthy of a review)
- Purpose and scope
- Summary of new synthesis and conclusions reached in the review
- Conclusion (remaining knowledge gap, significance of the new synthesis, take-home message of the review)

The limit is 200 words.))

1 Introduction

((Describe why the topic is worthy of the latest review and the main themes covered in the review))

2 [insert section titles]

((Divide the main themes of the review into sections, each with an informative section title that takes into the principles of search engine optimization))

2.1 [Subheadings]

((Subheadings should be used and these headings should be informative and provide relevant keywords to help with search engine optimization))

[section number depends on the number of sections before] Conclusions

((issues raised in the introduction should be reflected in the conclusion. Provide a take-home message to the review))

Acknowledgement

((Include any acknowledgements of general support, technical help or financial and material support. Provide full grant numbers, if applicable.))

Conflict of interest

((Disclose any potential sources of conflict of interest. A potential conflict of interest may be if you are a consultant for a company involved in this study. This declaration will not influence the decision to publish the paper; a failure to declare however, may lead to rejection or retraction of the paper. If there are none, please write, “The authors declare no financial or commercial conflict of interest.”))

[section number depends on the number of sections before] References

((References are listed in the order in which they appear in the text, and then in the tables and figure legends.

In-text citations (numbers in square brackets) are placed in the text before punctuation.

Include only articles that are part of the scientific published record.

DO NOT include

- websites - URL to be included in the main text only

- unpublished works. Any submitted papers should be listed as “unpublished data” in brackets in the main text

Examples of reference style are given below.))

((for articles with 5 authors or less, list all authors))

[1] Yum, K., Hong, S. G., Healy, K. E., Lee, L. P., Physiologically relevant organs on chips. *Biotechnol. J.* 2014, 9, 16–27.

((for articles with more than 5 authors, list 4 authors followed by et al.))

((for articles that do not yet have a page number, include DOI))

[2] Senís, E., Fatouros, C., Große, S., Wiedtke, E. et al., CRISPR/Cas9-mediated genome engineering: An adeno-associated viral (AAV) vector toolbox. *Biotechnol. J.* 2015, 10, DOI: 10.1002/biot.201400046.

((for books))

[3] Bisaria, V. S., Kondo, A. (Eds.), *Bioprocessing of renewable resources to commodity bioproducts*, Wiley-VCH, Weinheim 2014.

((for book chapters))

[4] Geis, A., Perspectives of genetic engineering of bacteria used in food fermentations, in: Heller, K. J. (Ed.), *Genetically Engineered Food – Methods and Detection*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim 2003, pp. 100–118.

((for patents))

[5] Pandey, R., Ratnani, K., Ahmed, S., Williams, J., Direct conversion of methane to hythane. US Patent 5516967, 1996.

Table 1. [insert one-line table description]

((Tables should be used to help with presenting the available information in a logical and succinct manner.

Number tables with Arabic numerals, including a short title. Column headings should indicate units. Additional table information should be included in the footnotes. Footnotes should be indicated alphabetically a), b), etc.

One table per page.

Max number of tables & figures: depends on article type, see first page))

((Figures

Figures must be submitted as separate files, and not embedded in the text file.

Figures are numbered with Arabic numerals and panels should be labeled A, B, etc. in bold uppercase letters on the top left corner.

Sans-serif fonts such as Arial and Helvetica are preferred. Font size should be consistent across comparable labels and figures.

We encourage using only figures that would help convey the message of the review. Where possible, avoid using published figures unless these have been adapted specifically for the review. Ensure that you have the appropriate permissions to re-use any figures that you do not have the copyright to.

Submitted figure files should be in .eps, .tiff or .ppt format and have a resolution of 300 dpi at the final printed size))

Figure legends

Figure 1. [Insert figure legend, starting with a one-sentence summary of what the figure shows]

((The legend should be self-explanatory and allow readers to understand the figure without referring to the main text.

Symbols should include a key in the figure; if not, describe the symbols in the figure legend))

ANEXO B

Normas da Revista Orbital: The Electronic Journal of Chemistry para publicação de artigo científico

Insert the title here (Font: Times New Roman, 16, Bold)

Insert the autor(s) name here (Font: Times New Roman, 12, Bold) - **Authors' full names (and e-mail)**. For example: Adilson Beatriz^a (adilson.beatriz@ufms.br), Dênis Pires de Lima^a (denis.lima@ufms.br), and others

^a*Authors' addresses. The mailing address(es) of author(s) should include the institutional affiliation, street or PO box number, city, postal code and country. (Font: Time New Roman, 10, Italic)*

Article history: Received: ; revised:; accepted:. Available online:.

Abstract: All manuscripts must be accompanied by a written abstract which should briefly state the purpose of the research, the principal results and the major conclusions. Numbers (arabic) identifying structural formulae or labels may be used in the abstract. A typical abstract should contain 100-200 words. (Font: Times New Roman, 9).

Keywords: The abstract should be followed by 4-6 keywords in alphabetical order

1. INTRODUCTION

An introductory statement should be given placing the work in the appropriate context and stating the purpose and objectives of the research. Type or cut/paste. (Font: Times New Roman, 10)

References in the text should be numbered sequentially and placed between square brackets []. The list of references, also numbered between square brackets, must be included at the end of the manuscript.

2. MATERIAL AND METHODS

This section should describe the experimental methods used in the work in sufficient detail to allow repetition of the work by others. Authors are encouraged to include detailed experimental data such as experimental procedures and characterization data as Additional Material rather than as an extensive experimental section. (Font: Times New Roman, 10)

3. RESULTS AND DISCUSSION

The presentation of experimental details in this section should be kept to a minimum. Information already obvious in tables, figures or schemes should not be reiterated and authors are encouraged to make full use of the additional files that allow supplementary material to be presented in extensive form. Footnotes may not be used in any section of the paper. (Font: Times New Roman, 10)

Table: Tabulation of experimental results is encouraged whenever it provides greater clarity or more economical use of space. Tables must be oriented portrait style on the page and must fit within the margins of a single page. Larger tables will be published as Supplementary Material. Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals and constructed in table format. Do NOT use ChemDraw or Isis Draw to create tables. **Tables created in ChemDraw/Isis Draw will be returned to the author for proper formatting.** Each Table should be provided with a descriptive heading, which, together with the individual column headings,

should make the Table, as far as possible, self-explanatory. Do not use cell borders. Tables should be inserted in the text close to the point where they are discussed. **When inserting tables, do not use the float over text option.**

Figures: Diagrams, graphs, spectra, photographs, and any other illustrations should all be considered Figures.

Figures should be labeled sequentially with Arabic numerals as they appear (i.e., Figure 1, Figure 2 etc.) together with a caption appearing directly below each Figure.

Figures should be included within the body of the manuscript at a point soon after the reference to the Figure appears in the text. **When inserting figures, do not use the float over text option.**

Schemes and Equations Scheme: depicts a series of chemical transformations containing chemical structures. Equation: illustrates a simpler transformation with a single reaction arrow. For preparation of Schemes and Equations CS ChemDraw is the recommended drawing program, but ISISDraw (or ACD/ChemSketch) may also be used. **When inserting schemes, do not use the float over text option.**

4. CONCLUSION

This should state clearly the main conclusions of the research and give a clear explanation of their importance and relevance. (Font: Times New Roman, 10)

5. ACKNOWLEDGMENTS

Optional

6. REFERENCES AND NOTES

- [1] Xxxxx (last name), Y.; Axxxx (last name), T. U.; Bxxx, A. H. *Journal name* **year**, *vol.*, first page. [CrossRef] or [Link]

For example:

- [1] Constantino, M. G.; Oliveira, K. T.; Beatriz, A.; da Silva, G. V. *J. Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 2641. [CrossRef] [http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039\(03\)00377-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0040-4039(03)00377-0)
- [2] Kogawa, N. R. A.; Arruda, E. J.; Micheletti, A. C.; Matos, M. F. C.; de Oliveira, L. C. S.; de Lima, D. P.; Carvalho, N. C. P.; de Oliveira, P. D.; Cunha, M. C.; Ojeda, M.; Beatriz, A. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 65427. [CrossRef] <http://dx.doi.org/10.1039/C5RA02798E>
- [3] Iwasita, T.; Câmara, G. A. In: In-situ spectroscopic studies of adsorption at the electrode and electrocatalysis. Sun S-G.; Christensen, P. A.; Wieckowski, A., eds. Amsterdam: Elsevier, 2007, chapter 2.
- [4] Cotton, F. A.; Wilkinson, G.; *Advanced inorganic chemistry*, 5th ed. New York: Wiley, 1988.
- [5] Constantino, M. G.; da Silva, G. V. *Fundamentos de Química*, 1st ed. São Paulo: Atheneu 2014, p. 121. [Link]

(Font: Times New Roman, 8)

See: Instructions to Authors:

<http://www.orbital.ufms.br/public/guidelines.pdf>