



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

JULIANA BARION MASSI

**FARELO DE SOJA E CASCA DE ARROZ  
PARA A PRODUÇÃO DE LIPOPETIDEOS POR  
*Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b**

JULIANA BARION MASSI

**FARELO DE SOJA E CASCA DE ARROZ  
PARA A PRODUÇÃO DE LIPOPETÍDEOS POR  
*Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b**

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

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Rezende.  
Co-Orientador: Prof. Dr. Doumit Camilios Neto.

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

M417f Massi, Juliana Barion.

Farelo de soja e casca de arroz para a produção de lipopetídeos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b / Juliana Barion Massi. – Londrina, 2015.  
131 f. : il.

Orientador: Maria Inês Rezende.

Coorientador: Doumit Camílios Neto.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Londrina,  
Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia agrícola – Teses. 2. *Bacillus amyloliquefaciens* – Teses.  
3. Casca de arroz – Teses. 4. Farelo de soja – Teses. 5. Resíduos agrícolas –  
Teses. 6. Fermentação em estado sólido – Teses. I. Rezende, Maria Inês.  
II. Camílios Neto, Doumit. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de  
Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título.

CDU 663.1

JULIANA BARION MASSI

**FARELO DE SOJA E CASCA DE ARROZ  
PARA A PRODUÇÃO DE LIPOPETIDEOS POR  
*Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b**

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

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Cristina Giatti Marques de Souza  
Universidade Estadual de Maringá - UEM

---

Profa. Dra. Fabiana Guillen Moreira Gasparin  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 11 de junho de 2014.

À Deus que em sua infinita sabedoria e misericórdia nos acolhe em seu sincero amor.

## **AGRADECIMENTOS**

Recordar e escolher à quem agradecer não é tarefa fácil, talvez porque os merecedores sejam muitos e o risco do esquecimento grande.

A Professora Doutora Maria Inês Rezende, pelos conhecimentos compartilhados, profissionalismo, dedicação e orientação. Pela competência e serenidade com que me ensinou sempre. Por sempre descer os degraus do saber, como bem sabem os grandes, e doar, além de sua sabedoria e apoio, uma amizade pura e fraterna.

Ao Professor Doutor Doumit Camillos-Neto, pela disposição de ajudar, paciência e amizade.

Ao Professor Doutor Dionisio Borsato, pela disposição de ajudar, pelo conhecimento compartilhado e por sempre acreditar em mim.

Ao Professor Doutor Cesar Augusto Tischer, pela ajuda na execução e análise dos dados dos experimentos de caracterização molecular.

Ao Professor Doutor André Luiz Martinez de Oliveira por ceder o microrganismo utilizado neste trabalho.

A técnica de laboratório Doutora Ivanira Moreira, pelo auxílio nas análises de caracterização.

Aos professores do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, pelos ensinamentos.

Ao técnico de laboratório Nelson Janeiro Rodriguez, pela ajuda e disposição no auxílio durante o desenvolvimento experimental deste trabalho.

Aos funcionários da secretaria, Elda Jonas de Aguiar e Sérgio do Nascimento Evangelista, e ao Edvaldo Santos da Silva e Sandra Aparecida Defende, pelo profissionalismo e atenção sempre presentes.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo auxílio no desenvolvimento de alguns dos experimentos.

Ao meu marido e maior incentivador para que este trabalho fosse concluído. Obrigada por todo o apoio. Pelas horas de laboratório e por entender em muitas vezes minha ausência necessária. Minha sincera gratidão.

Agradeço a deliciosa companhia e amizade das minhas companheiras de laboratório, Érika Mitsuo, Karina Milani, Nicole Pan e Amanda Aleixo, que muitas vezes me auxiliaram com paciência, sabedoria, humildade e dedicação. Vocês foram imprescindíveis para que tudo desse certo.

Aos meus amigos, pela amizade sincera, pelo apoio e entendimento nas horas difíceis.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço ainda e não com menor amor, a todos aqueles nomes de pessoas especiais e que contribuíram direta ou indiretamente para finalização deste trabalho e que infelizmente neste momento falhei em não citá-los. Perdoem a minha total falta de recordação, ainda tenho muito a melhorar como pessoa.

Se o momento é de crise, não te pertubes,  
segue ....  
Serve e ora, esperando que suceda o melhor.

Queixas, gritos e mágoas são golpes em ti  
mesmo.  
Silencia e abençoa, a verdade tem voz!....

Paciência constante atrai a luz do Céu ...  
Acalma-te, servindo e vencerás com Deus.

Emmanuel

MASSI, Juliana Barion. **Farelo de soja e casca de arroz para a produção de lipopetideos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b** 2014. 131f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR

## RESUMO

Resíduos agroindustriais como bagaços, farelos, cascas entre outros podem ser matéria prima e fonte de energia para a obtenção de diversos produtos com alto valor agregado. Entre eles os biossurfactantes, metabólitos microbianos de grande interesse industrial por suas inúmeras aplicações e pelas vantagens ambientais de baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, mas com utilização limitada pelo alto custo de produção. O objetivo deste estudo foi avaliar a produção de lipopetídeos, uma classe de biossurfactantes, por fermentação em estado sólido (FES), utilizando *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b. As fermentações foram desenvolvidas a partir de misturas dos substratos em diferentes proporções, com 80 % de umidade. Os frascos inoculados (200 µL de suspensão de células) foram incubados em BOD a temperaturas de 28 a 37 ± 2 °C por até 48 horas. A interrupção dos cultivos foi pela adição de água, a mistura homogeneizada (180 rpm por 30 min.) e centrifugada (10.000 rpm por 20 min, 4 °C). Os lipopeptídeos foram precipitados no sobrenadante obtido pela adição de HCl 6M, (pH 2 a 4 °C); seguido de nova centrifugação o precipitado então foi ressuspenso em água, neutralizado (NaOH 0,5 M, pH 7,0) e liofilizado. Soluções do liofilizado foram preparadas para as determinações: Índice de Emulsificação (IE<sub>24</sub>); Tensão Superficial (TS); Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-FT); Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN de 1H e 13C) e Espectrometria de Massa. Os substratos selecionados para a produção foram o farelo de soja (47 % de proteínas) 4 g e a casca de arroz utilizada como *bulking agent* 3,75 g. A avaliação individual dos parâmetros de cultivo com os seguintes resultados, umidade 80 %; solução umedecedora MSM-1; fonte de nitrogênio extrato de levedura 1,75 g; fonte de carbono glicerol 1,50 g; pH inicial 6. O farelo de soja, extrato de levedura e glicerol, foram os pontos centrais de um planejamento fatorial Box-ehnken 3<sup>3</sup>, onde a condição ótima de produção de lipopeptídeos foi 44,072 mg/g.s.s, em farelo de soja (3,25 g), glicerol (1,50 g), extrato de levedura (1,75 g) a 37 ± 2 °C , e 36 h de incubação. As análises de IV-FT apresentaram espectro semelhante ao da surfactina padrão, sugerindo a presença deste biossurfactante, que é produzido pelo *B. amyloliquefaciens* MO.04b em fermentação submersa. Quanto as determinações de RMN e espectrometria de massa não foram conclusivas, provavelmente pela complexidade da amostra e a necessidade de purificação da mesma.

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

MASSI, Juliana Barion. **Soybean meal and rice husk to produce lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b.** 2014. 131f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR

## ABSTRACT

Agroindustrial residues as bagasse, bran, hulls and other raw materials, can be an energy source for obtaining various products with high added value. Among them biosurfactants microbial metabolites, of great industrial interest for numerous applications, and the environmental advantages of low toxicity and high biodegradability, but limited by the high cost of production. The goal of this study was to evaluate the production of lipopeptides, a class of biosurfactants, by solid state fermentation (SSF) using *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b. Fermentations were developed from mixtures of substrates in different proportions, with 80 % humidity. The inoculated flasks (200 µl cell suspension) were incubated in a temperature chamber at  $28-37 \pm 2$  ° C for 48 hours. The interruption of the cultures was the addition of water, the homogenized mixture (180 rpm for 30 min.) centrifuged (10,000 rpm for 20 min, 4 ° C). The lipopeptides were precipitated in the obtained supernatant by adding 6M HCl ( pH 2 at 4 ° C); followed by further centrifugation the precipitate was then resuspended in water, neutralized (0.5 M NaOH , pH 7.0) and lyophilized. Solutions were prepared for determination: Emulsification Index (IE<sub>24</sub>) ; Surface Tension (TS) ; Fourier Transform Infrared (FT-IR); Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (1H NMR and 13C NMR), and mass spectrometry. Selected to produce substrates were soybean meal (47 % protein), 4 g, rice husk bulking agent 3.75 g. The evaluation of individual cultivation parameters with the following results, 80 % humidity; solution MSM- 1; nitrogen sources yeast extract 1.75 g; carbon source glycerol 1.50 g; initial pH 6. Soybean meal , yeast extract and glycerol , were the focal points of a factorial design Box Behnken 3<sup>3</sup> , where the optimum condition for the production of lipopeptides was 44.072 mg/gds in soybean meal (3.25 g), glycerol (1.50 g) , yeast extract (1.75 g) at  $37 \pm 2$  ° C and 36 h incubation . The FT-IR analysis showed a similar pattern to that of surfactin spectrum indicating the presence of this biosurfactant, which is produced by *B. amyloliquefaciens* MO.04b in submerged fermentation. Regarding the determination of NMR and mass spectrometry were not conclusive, probably due to the complexity of the sample and the need for purification thereof.

**Key words:** *Bacillus amyloliquefaciens*, Biosurfactant, Solid State Fermentation

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1-	Demonstração das forças intermoleculares na superfície (a) e no interior do líquido	27
Figura 2 -	Representação das porções hidrofílica e hidrofóbica de um surfactante.....	31
Figura 3-	Estrutura geral de um mono-ramnolípido (A); estrutura geral de um di-ramnolípido (B).....	35
Figura 4 -	Estrutura de trealolípido produzido por <i>Rhodococcus erythropolis</i> .....	36
Figura 5 -	Estrutura de um sofrólípido estrutura fechada (a) e estrutura livre (b) .....	36
Figura 6 -	Estrutura da principal isoforma da surfactina .....	38
Figura 7 -	Estrutura de um fosfatidilglicerol .....	39
Figura 8 -	Estrutura do Emulsan produzido por <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> .....	40
Figura 9 -	Obtenção dos lipopeptídeos produzidos por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b em fermentação em estado sólido em diferentes substratos.....	60
Figura 10 -	Aspecto dos cultivos preliminares em FES de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b cultivado nos resíduos FS (A), CA (B), FM (C) e BC (D), após 4 dias a $28 \pm 2$ °C ...	63
Figura 11 -	Eletromicrografias de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b cultivado nos substratos: FS (A); , FM (B); CA (C) e BC (D) com aumento 12.000X .....	65
Figura 12 -	Crescimento do <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b nas misturas farelo de soja mais casca de arroz (FS + CA) e farelo de milho mais casca de arroz (FM + CA), FES, 37° C.....	68
Figura 13 -	Determinação da tensão superficial- TS (A) e do índice de emulsificação-IE <sub>24</sub> dos ELC dos cultivos de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b nas misturas FS + CA e FM + CA, FES, 37° C.....	70
Figura 14 -	Determinação do pH nos ELC dos cultivos de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b nas misturas FS + CA e FM + CA, FES, 37° C. ....	71
Figura 15 -	Efeito das soluções umedecedoras MSM-1 e MSM-2 na produção de lipopeptídeos na mistura FS e CA, FES, 36 horas, 37° C.....	73
Figura 16 -	Efeito de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio para a produção de lipopeptídeos na mistura FS e CA, FES, 36 horas, 37° C.....	74
Figura 17 -	Efeito de diferentes fontes de carbono para a produção de lipopeptídeos na mistura FS e CA , FES, 36 horas, 37° C.....	76
Figura 18 -	Efeito do pH inicial para o meio MSM-1 para a produção de lipopeptídeos na mistura FS + CA, FES, 36 horas, 37° C.....	77
Figura 19 -	Superfície de resposta da produção de lipopeptídeos por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b em fermentação em estado sólido, fixando-se a concentração de extrato de levedura em 1,75 g. As variáveis independentes são o glicerol 1,75 g e o farelo de soja 4,00 g (nesta figura foram utilizados os valores originais das variáveis). A variável resposta produção de lipopeptídeos em 36 horas de cultivo é expressa em mg/g.s.s .....	81
Figura 20-	Curvas de contorno para a resposta “produção de lipopeptídeos” em função de (A) glicerol, (B) extrato de levedura e (C) farelo de soja .....	82
Figura 21 -	Parâmetros de desejabilidade estimada na condição máxima de produção de lipopeptídeos utilizando o software estatístico 10.0 .....	83
Figura 22 -	Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis farelo de soja, extrato de levedura e glicerol .....	84
Figura 23 -	Valores preditivos versus valores observados .....	85
Figura 24 -	Espectro infravermelho do lipopeptídeo produzido por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b .....	87

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Vantagens e desvantagens da fermentação em estado solido e fermentação submersa .....	25
Tabela 2 -	Uso de substratos lignocelulósicos por FES em diversas áreas.....	26
Tabela 3 -	Quadro surfactantes sintéticos .....	28
Tabela 4 -	Classificação dos biossurfactantes de acordo com a massa molecular, natureza química e microrganismos produtores .....	32
Tabela 5 -	Tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC) de biossurfactantes e surfactantes .....	33
Tabela 6 -	Produção de biossurfactantes, classe dos lipopetídeos, por fermentação em estado sólido .....	42
Tabela 7 -	Composição do meio de Dyg's .....	47
Tabela 8 -	Composição do meio de sais minerais .....	47
Tabela 9 -	Composição do meio de sais minerais (MSM-2) .....	48
Tabela 10 -	Composição de diferentes soluções umedecedoras utilizadas em ensaios preliminares para avaliação dos parâmetros de cultivo .....	51
Tabela 11 -	Variáveis independentes e níveis de variação no planejamento fatorial Box-Behnken 3 <sup>4</sup> .....	53
Tabela 12 -	Box-Behnken 3 <sup>4</sup> para fermentação em estado sólido com <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b para produção de lipopetídeos .....	53
Tabela 13 -	Variáveis independentes e níveis de variação no planejamento fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> .....	54
Tabela 14 -	Box-Behnken 3 <sup>3</sup> para fermentação em estado sólido com <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b para produção de lipopetídeos .....	55
Tabela 15 -	Variáveis independentes e níveis de variação no planejamento fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> .....	56
Tabela 16 -	Box-Behnken 3 <sup>3</sup> para fermentação em estado sólido com <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b para produção de lipopetídeos.....	56
Tabela 17 -	Variáveis independentes e níveis de variação no planejamento fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> .....	57
Tabela 18 -	Box-Behnken 3 <sup>3</sup> para fermentação em estado sólido com <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b para produção de lipopetídeos .....	57
Tabela 19 -	Composição centesimal dos resíduos agroindustriais .....	62
Tabela 20 -	Avaliação plaqueamento, açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais ....	66
Tabela 21 -	Efeito das soluções umedecedoras na produção de lipopeptídeos na mistura farelo de soja e casca de arroz, FES, 36 horas, 37° C.....	72
Tabela 22 -	Efeito da fonte de nitrogênio na solução umedecedora para a produção de lipopeptídeos na mistura farelo de soja e casca de arroz, FES, 36 horas, 37° C .....	75
Tabela 23 -	Efeito da fonte de carbono na solução umedecedora para a produção de lipopetídeos na mistura farelo de soja e casca de arroz,, FES, 36 horas, 37° C.....	75
Tabela 24 -	Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> .....	79
Tabela 25 -	Variáveis codificadas, decodificadas e resultados da produção de lipopetídeos para o planejamento fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> com 5 pontos centrais .....	79
Tabela 26 -	Análise de variância dos dados obtidos pelo planejamento fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup>	80
Tabela 27 -	Representação das bandas obtidas no espectro de infravermelho .....	86

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	19
2.	OBJETIVOS .....	20
2.1.	OBJETIVO GERAL .....	20
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3.	REVISÃO DA LITERATURA .....	21
3.1.	PANORAMA DO SETOR AGROINDUSTRIAL NO BRASIL .....	21
3.1.1.	Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais: Potencial Biotecnológico .....	22
3.2.	FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COMO ESTRATÉGIA BIOTECNOLÓGICA PARA OBTENÇÃO DE PRODUTOS .....	24
3.3.	AGENTES TENSOATIVOS: SURFACTANTES SINTÉTICOS E BIOSSURFACTANTES .....	27
3.3.1.	Surfactantes Sintéticos .....	27
3.3.2.	Biossurfactantes.....	29
3.3.2.1.	Propriedades gerais dos biossurfactantes .....	33
3.3.3.	Classificação Dos Biossurfactantes .....	34
3.3.3.1.	Grupo dos glicolipídeos: ramnolipídeos, trealolipídeos, soforolipídeos .....	34
3.3.3.2.	Grupo dos lipopetídeos ou lipoproteínas .....	37
3.3.3.3.	Grupo dos fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros .....	38
3.3.3.4.	Grupo dos biossurfactantes poliméricos e particulados .....	39
3.3.4.	Biossurfactantes Produzidos Por Fermentação em Estado Sólido .....	40
3.3.4.1.	Fatores que afetam a fermentação em estado sólido (FES) .....	42
3.4.	POTENCIAIS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DOS BIOSSURFACTANTES .....	43
3.5.	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b .....	44
4.	MATERIAL E MÉTODOS .....	46
4.1.	SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS .....	46
4.2.	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS .....	46
4.3.	MICROORGANISMO E MANUTENÇÃO DA CEPA .....	46
4.4.	MEIOS DE CULTIVO .....	47
4.4.1.	Meio de Manutenção (Dyg's) .....	47
4.4.2.	Meio de Sais Minerais-1 (MSM-1) .....	47
4.4.3.	Meio de Sais Minerais-2 (MSM-2) .....	48
4.5.	CULTIVOS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO .....	48
4.5.1.	Preparo do Inóculo .....	48
4.5.2.	Ensaio Preliminares para a Avaliação do Crescimento do <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b nos Substratos Bagaço de Cana de Açúcar, Farelo de Soja, Farelo de Milho e Casca de Arroz .....	49
4.5.2.1.	Verificação do crescimento por microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	49
4.5.2.2.	Avaliação do crescimento do microrganismo por plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias .....	50
4.5.3.	Interrupção dos Cultivos e Obtenção do Extrato Livre de Células (ELC) .....	50
4.5.4.	Perfil de Crescimento e Produção de Lipopeptídeos nas Misturas Farelo de Soja mais Casca de Arroz e Farelo de Milho mais Casca de Arroz .....	50
4.6.	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS NA MISTURA FARELO DE SOJA E CASCA DE ARROZ .....	51
4.6.1.	Avaliação da Solução Umedecedora para Fermentação em Estado Sólido .....	51
4.6.2.	Seleção de Fontes de Nitrogênio e Fontes de Carbono .....	52
4.6.3.	Seleção de pH inicial .....	52
4.7.	ANÁLISE EXPLORATÓRIA UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL E ANÁLISE POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA NA PRODUÇÃO DE LIPOPETÍDEO .....	52
4.7.1.	Planejamento Fatorial Box-Behnken 3 <sup>4</sup> para Otimização da Produção de Lipopetídeos por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b (Primeira Rodada de Experimentos) .....	53
4.7.2.	Planejamento Fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> para Otimização da Produção de Lipopetídeos por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b (Segunda Rodada de Experimentos) .....	54
4.7.3.	Planejamento Fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> para Otimização da Produção de Lipopetídeos por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b (Terceira Rodada de Experimentos) .....	55
4.7.4.	Planejamento Fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> para Otimização da Produção de Lipopetídeos .....	

	por <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b (Quarta Rodada de Experimentos) .....	56
4.8.	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....	58
4.8.1.	Determinação dos Açúcares Totais .....	58
4.8.2.	Determinação dos Açúcares Redutores .....	58
4.8.3.	Determinação das Proteínas Totais .....	58
4.8.4.	Determinação da Tensão Superficial .....	58
4.8.5.	Medida do Índice de Emulsificação .....	59
4.8.6.	Extração de Lipopetídeos de <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b em FES .....	59
4.9.	CARACTERIZAÇÃO DO LIPOPETIDEO PRODUZIDO POR <i>Bacillus amyloliquafaciens</i> MO.04B EM FES .....	61
4.9.1.	Análise por Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) .....	61
4.9.2.	Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN de 1H e 13C) .....	61
4.9.3.	Espectrometria de Massa .....	61
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	62
5.1.	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS RESÍDUOS BAGAÇO DE CANA (BC), FARELO DE SOJA (FS), FARELO DE MILHO (FM) E CASCA DE ARROZ (CA) .....	62
5.2.	AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b NOS RESÍDUOS RESÍDUOS FARELO DE SOJA (FS), FARELO DE MILHO (FM), CASCA DE ARROZ (CA) E BAGAÇO DE CANA (BC) .....	63
5.3.	PERFIL DE CRESCIMENTO DE <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> MO.04b E PRODUÇÃO DE LIPOPETÍDEOS NAS MISTURAS FARELO DE SOJA MAIS CASCA DE ARROZ E FARELO DE MILHO MAIS CASCA DE ARROZ .....	68
5.4.	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS NA MISTURA FARELO DE SOJA (FS) E CASCA DE ARROZ (CA) .....	72
5.4.1.	Avaliação e Seleção da Solução Umedecedora .....	72
5.4.2.	Avaliação das Fontes de Carbono e Nitrogênio .....	73
5.4.3.	Avaliação do pH Inicial .....	76
5.5.	ANÁLISE EXPLORATÓRIA PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS POR PLANEJAMENTO FATORIAL E ANÁLISE POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA .....	77
5.5.1.	Primeira Rodada de Experimentos: Planejamento Fatorial Box-Behnken 3 <sup>4</sup> .....	78
5.5.2.	Segunda Rodada de Experimentos: Planejamento Fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> .....	78
5.5.3.	Terceira Rodada de Experimentos: Planejamento Fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> .....	78
5.5.4.	Quarta Rodada de Experimentos: Planejamento Fatorial Box-Behnken 3 <sup>3</sup> .....	79
5.6.	CARACTERIZAÇÃO DO LIPOPETIDEO PRODUZIDO POR <i>Bacillus amyloliquafaciens</i> MO.04b ..	85
5.6.1.	Análise por Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) .....	85
5.7.	RMN E ESPECTROMETRIA DE MASSA: CARACTERIZAÇÃO DO LIPOPETIDEO PRODUZIDO POR <i>Bacillus amyloliquafaciens</i> MO.04b .....	87
6.	CONCLUSÕES .....	88
	REFERÊNCIAS .....	90
	ANEXO 1 – Descrição detalhada da determinação da composição centesimal.....	105
	ANEXO 2 – Análise exploratória: Resultados das rodadas 1, 2 e 3 dos experimentos ..	109
	ANEXO 3 – Primeira versão do artigo científico a ser submetido a revista Brazilian Journal of Microbiology .....	114

## INTRODUÇÃO

Os microrganismos produzem alguns compostos anfifílicos denominados biossurfactantes, com propriedades de emulsificação, umedecimento, solubilização, detergência, lubrificação, capacidade molhante, capacidade espumante e dispersão de fases (MULLINGAN, YOUNG, GIBBS, 2001). Quando comparados com os surfactantes sintéticos, os biossurfactantes possuem vantagens consideráveis, tais como baixa toxicidade e alta biodegradabilidade, sendo ativos em extremos de temperatura, pH e salinidade, assim como o fato de poderem ser produzidos a partir de recursos renováveis. A reunião destas vantagens demonstra que os biossurfactantes podem ser utilizados em diversos setores industriais, como a indústria de petróleo, alimentícia e farmacêutica.

Dentre os biossurfactantes mais eficientes, encontram-se os lipopetídeos, que são compostos peptídicos, com estrutura cíclica e carga neutra, ligados a ácidos graxos (MAIER, 2003). As espécies de *Bacillus* produzem os lipopetídeos melhor caracterizados. *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b é uma bactéria Gram-positiva, com tamanhos que variam de 0,7 a 3,0 µm, não patogênicos. Seus metabólitos podem ter várias aplicações, tais como terapêuticas, biorremediação, extração de petróleo entre outras, o que aumenta o interesse por essa bactéria.

A utilização de substratos sólidos com baixo conteúdo de água, por fermentação em estado sólido, é uma alternativa viável para produção de lipopetídeos, pois possibilita a utilização de resíduos sólidos abundantes no Brasil. Estes substratos de baixo custo apresentam vantagem econômica o que viabiliza a produção de tais tensoativos, além disto, o uso de FES evita a formação de espuma durante o processo de fermentação o que evita a saída e perda de nutrientes, produtos e biomassa.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a produção de lipopeptídeos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b cultivado em substratos lignocelulósicos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a composição centesimal dos substratos;
- ✓ Avaliar o crescimento da bactéria nos substratos lignocelulósicos por diluições seriadas e contagem das UFC/g.s.s. e verificar a colonização através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e pelo consumo dos açúcares totais, redutores e proteínas solúveis residuais;
- ✓ Padronizar a condição de fermentação em estado sólido com relação ao parâmetro umidade e selecionar o substrato ou mistura de substratos para produção de lipopeptídeos
- ✓ Avaliar e selecionar os parâmetros de cultivo para a fermentação em estado sólido: solução umedecedora; fonte de carbono; fonte de nitrogênio; pH;
- ✓ Otimizar a produção do biossurfactante/lipopetideo por planejamento fatorial e análise por metodologia de superfície de resposta;
- ✓ Caracterizar o lipopeptídeo produzido, na condição otimizada, por: IV-Infra Vermelho, Ressonância Magnética Nuclear e Espectrometria de Massa.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1. PANORAMA DO SETOR AGROINDUSTRIAL NO BRASIL**

A agroindústria é caracterizada por ser um sistema complexo, constituído pelo agrupamento de macro segmentos. Segundo Batalha (1999), a divisão ocorre da seguinte forma, o primeiro é o segmento rural, que compreende as atividades agropecuárias, o segundo, a produção industrial, que se divide em empresas de primeira e segunda transformação. As empresas de primeira transformação são caracterizadas como responsáveis pelos primeiros processos de fragmentação da matéria prima agropecuária. Os produtos desta primeira transformação são fornecidos as indústrias de segunda transformação, que promovem a produção de produtos mais elaborados. Assim o último macro segmento é a comercialização, onde são efetuadas atividades atacadistas e varejistas.

Um sistema agroindustrial bem gerenciado torna-se eficaz e eficiente na sustentabilidade do setor, quando diminui progressivamente os resíduos provenientes da disponibilização aos consumidores dos produtos que atendem as suas necessidades. Para isto é necessário propor tecnologias inovadoras no sentido de minimizar a geração de resíduos quando há beneficiamento de produtos que não são consumidos (BATALHA; SCARPELLI, 2002)

A extensão territorial brasileira é de 8.547.403 km<sup>2</sup>, é o maior país do continente sul americano, apresenta um potencial de 152,5 milhões de hectares disponíveis para agricultura. O agronegócio, que possui participação expressiva na economia do País, cresceu 0,4 % no primeiro semestre de 2013, ritmo superior ao observado nos seis primeiros meses de 2012 de - 4,0 %, mas abaixo do registrado pela indústria geral em 2013 com 1,9 % (IBGE, 2013).

A previsão para a safra brasileira de grãos em 2013 segundo o Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA) é atingir o recorde de 185,7 milhões de toneladas, resultado 14,7 % superior à safra de 2012 (161,9 milhões de toneladas).

O Paraná destaca-se no panorama nacional por ocupar a terceira posição nas exportações brasileiras do agronegócio, sua participação expressiva de

14,3 %, com crescimento de 3 % sobre o ano de 2011. A participação paranaense no total brasileiro é de 7,3 %. As exportações de 2012 baseiam-se em cinco principais agregados: o complexo da soja, as carnes, o sucro energético, os produtos florestais e as exportações de milho, somando 90 % do total paranaense.

A produção acelerada traz consigo a geração de resíduos agroindustriais, que podem prejudicar o meio ambiente por conta do seu armazenamento ou descarte inadequado. O agravamento dos problemas ambientais tem provocado na sociedade a demanda por novas tecnologias como forma de solucionar a problemática dos resíduos gerados nos processos de produção industrial.

O grande desafio é manter o equilíbrio entre a produção de bens e serviços e o crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental (PINTO, 2005).

### **3.1.1. Aproveitamento de Resíduos Agroindustriais: Potencial Biotecnológico**

Segundo Demajorovic (1996) resíduos sólidos e lixo diferenciam-se porque, enquanto o lixo não possui nenhum tipo de valor, sendo considerado aquilo que deve ser descartado, os resíduos possuem valor econômico agregado, por possibilitarem reaproveitamento no próprio processo produtivo. Para Timofiecsyk e Pawlowsky (2000), o termo resíduo é utilizado em sentido amplo, englobando não somente sólidos como também os efluentes líquidos e os materiais presentes nas emissões atmosféricas.

Sem uma correta utilização, os resíduos são capazes de criar potenciais problemas ambientais, representam perdas de matéria-prima e energia, exigindo investimentos significativos em tratamentos para controlar a poluição. Muitos dos tratamentos de efluentes não eliminam realmente os resíduos gerados, apenas os transferem para outro meio que não os esperava (TIMOFIECSYK; PAWLOWSKY, 2000). Segundo Laufenberg, Kunz e Nystroem (2003), os resíduos são ricos em substâncias de alto valor. O emprego de tecnologia adequada converte este material em produtos comerciais ou matéria-prima para processos secundários.

Na agroindústria, resíduos sólidos como bagaços, tortas, cascas, restos de frutas e hortaliças e etc são produzidos por usinas, matadouros e indústrias do processamento de carnes, frutas e hortaliças, indústria de celulose e

papel, curtumes entre outros. Os resíduos do cultivo agrícola são constituídos pelos restos de plantas não aproveitados comercialmente. O Paraná destaca-se pela produção das culturas de soja, milho, trigo, mandioca e cana de açúcar, que apresentam as maiores áreas de cultivo, totalizando 8.877.518 ha na safra 11/12 (SEAB, 2012) sendo, portanto um estado também gerador de resíduos.

A importância econômica destas culturas está na diversidade de utilização. São utilizadas para a alimentação animal, humana e também na indústria de alta tecnologia. Ao contrário do que acontecia no passado, quando os resíduos eram dispostos em aterros sanitários ou empregados sem nenhum tratamento para ração animal ou adubo, conceitos de minimização, recuperação, aproveitamento de subprodutos e bioconversão de resíduos são cada vez mais difundidos e necessários para as cadeias agroindustriais, pois produzem uma série de resíduos de alto valor de agregado (LAUFENBERG; KUNZ; NYSTROEM, 2003).

A utilização de resíduos agroindustriais fornece substratos alternativos a baixo custo, minimiza problemas ambientais causados pelo descarte no meio ambiente, transformando um resíduo poluente em um subproduto estável de alto valor comercial. Desta maneira diferentes produtos com maior valor agregado têm sido produzidos com o uso de matérias primas provenientes da natureza (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

Materiais lignocelulósicos são fontes abundantes de carboidratos, por serem o resultado do processo contínuo de reabastecimento destes nutrientes pela fotossíntese através do dióxido de carbono e da energia solar (FAN; GHARPURAY; LEE, 1987). Apresentam características de matéria-prima promissora na produção de energia, alimentos, produtos químicos, entre outros (WU; LEE, 1997).

Para considerar o desenvolvimento de um processo biotecnológico, é necessário avaliar o custo de produção. Produzir novos produtos por processos fermentativos em larga escala, depende do desenvolvimento de processos de baixo custo, especialmente das matérias primas utilizadas, que representam até 30 % do custo de produção (CAMEOTRA; MAKKAR, 2004). A redução dos custos é fator importante no desenvolvimento de uma produção em larga escala Aliado a esta premissa, tem-se a geração de inúmeros resíduos agroindustriais, de diferentes fontes, que geram um problema ambiental, quando relacionado ao descarte ou custo de tratamento do mesmo. Estas duas prerrogativas têm motivado estudos que aliam

a obtenção de produtos a partir de processos fermentativos com a utilização de resíduos lignocelulósicos, o que gera produtos de alto valor agregado (BANAT, 2000).

Subprodutos da agroindústria como farelos, cascas, bagaços entre outros são materiais que têm a composição adequada para permitir o crescimento celular e o acúmulo do produto de interesse. Os substratos agroindustriais que contêm altos teores de carboidratos ou proteínas suprem as necessidades de cultivo para uso como fonte de carbono e nitrogênio na produção de diferentes produtos (MERCADÉ et al., 1997; RUTZ et al., 2008)

### **3.2. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COMO ESTRATÉGIA BIOTECNOLÓGICA PARA A OBTENÇÃO DE PRODUTOS**

A fermentação em estado sólido (FES) é um processo comumente empregado em países orientais visando à elaboração de alimentos mas que tem ganhado adeptos em sua utilização entre pesquisadores da Europa e Continente Americano. É uma técnica de crescimento de microrganismos sobre e no interior de partículas porosas úmidas (suporte ou matriz sólida), onde a quantidade de líquido contido nesta matriz deve se manter a um nível correspondente a atividade da água, como a quantidade de água é limitada, diferente do processo submerso, o controle da umidade é essencial para o processo (SOCCOL, VANDENBERGHE, 2003). A Tabela 1 apresenta as vantagens da FES em relação à fermentação submersa.

A FES utiliza sólidos na ausência ou quase ausência de água livre nos espaços entre as partículas. As partículas do substrato devem conter umidade suficiente para permitir o crescimento e metabolismo do microrganismo. Metabólitos específicos podem ser produzidos devido à restrita disponibilidade de água, assim como aumento da produtividade e do rendimento quando comparado à fermentação submersa (PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

O substrato ou matriz sólida deve possuir algumas características que aumentem o rendimento do processo. A granulometria que o material apresenta, deve permitir a circulação de ar por entre a massa e a dissipação de gases e calor produzidos, fatores que podem prejudicar o rendimento do processo. Quanto menor o tamanho do material, maior a área superficial, o que permite um maior acesso pelo

microrganismo, deve-se ter cuidado, no entanto, com a compactação do material, o que dificulta o crescimento celular. A porosidade permite que o substrato retenha água, facilitando o transporte de enzimas e metabólitos entre o meio e o microrganismo. Verificado estes parâmetros, a escolha do tamanho da partícula e do tipo do substrato deve ser feita para cada fermentação em particular (LIMA et al., 2001 PANDEY; SOCCOL; MITCHELL, 2000).

**Tabela 1** - Vantagens e desvantagens da fermentação em estado sólido e fermentação submersa

Fermentação em estado sólido	Fermentação submersa
Meio de cultura não flui livremente	Meio de cultura sempre flui livremente
Profundidade do meio limitado	Profundidade do meio variável com o biorreator
Consumo limitado de água, baixa $a_w$ , sem efluentes	Consumo de água e descarte de efluentes
Baixa capacidade de transferência de calor	Fácil controle de temperatura
Fácil aeração e grande área de contato ar/substrato	Aeração requer fluxo elevado
Substrato tampão	Fácil controle de pH
Necessita projetos para o design de novos equipamentos	Equipamentos industriais já disponíveis
Inoculação de esporos, batelada	Fácil inoculação, processo contínuo
Risco de contaminação por fungos	Risco de contaminação por uma única célula bacteriana
Baixo consumo de energia	Elevado consumo energético
Pequenos volumes e baixos custos de equipamentos	Grandes volumes e elevado custo tecnológico

**Fonte:** Adaptado de ROUSSOS et al., 1993; HÖLKER et al., 2004; RODRIGUES et al., 2006

A FES tem como vantagem a obtenção de extratos mais concentrados, o que facilita o processo de purificação do metabólito de interesse, além da possibilidade de uso de resíduos agroindustriais como substratos, o que diminui os custos do processo produtivo (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIC, 2006; SATO; SHIGETOSHI, 1999; MOO-YOUNG; MOREIRA; TENDERDY, 1983). A Tabela 2 apresenta exemplos de substratos lignocelulósicos e os diversos produtos provenientes do seu processamento por FES.

**Tabela 2 - Uso de substratos lignocelulósicos por FES em diversas áreas**

SUBSTRATOS	PRODUTOS
Palha de trigo	Enriquecimento protéico Degradação de lignina para ruminantes Rações Cultivo de Cogumelos
Farelo de trigo	Produção de enzimas Produção de hormônios de crescimento de plantas Produção de drogas imunossupressoras (Ciclosporina A) Produção de aromas
Bagaço de cana de Açúcar	Enriquecimento protéico Produção de antibiótico (Penicilina) Produção de ácido láctico
Torta de girassol	Produção de antibióticos (Cefamicina C)
Melaço de beterraba	Enriquecimento protéico para rações
Farelo de soja	Produção de enzimas Produção de Biosurfactantes
Polpa de café	Produção de pectinase
Farelo amiláceo de arroz	Produção de aroma Produção de proteases Produção de pigmentos
Bagaço de mandioca	Produção de aromas
Sementes de soja	Produção de alimentos fermentados
Resíduos de maçã	Produção de etanol e goma xantana
Casa de Kiwi	Produção de ácido cítrico
Semente de amaranto	Produção de compostos voláteis

**Fonte:** Adaptado de COUTO; SANROMAN, 2006

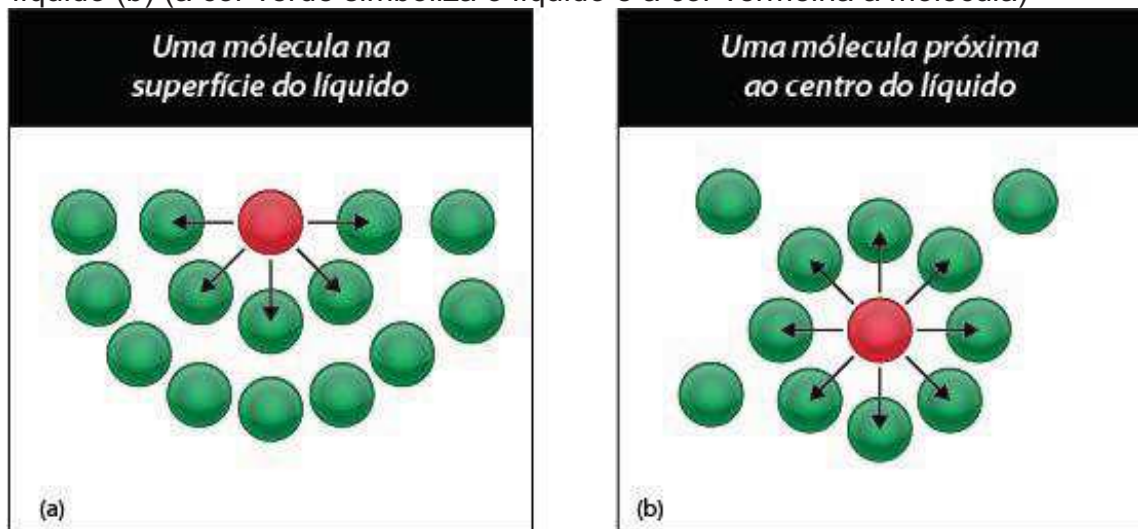
Segundo Mitchell, Krieger e Berovic (2006), grãos de arroz, raízes de mandioca, soja, farelo de arroz, farelo de trigo, fubá, casca de arroz, casca de trigo, entre outros subprodutos, produtos processados ou produtos agrícolas propriamente ditos podem ser utilizados como substratos para fermentação em estado sólido. Para Pandey, Soccol e Mitchell (2000), a utilização de resíduos sólidos agroindustriais de baixo custo e potencialmente poluidores no processo é vantagem econômica.

### 3.3. AGENTES TENSOATIVOS: SURFACTANTES SINTÉTICOS E BIOSURFACTANTES

#### 3.3.1. Surfactantes Sintéticos

Surfactante é uma palavra que vem da expressão “surface active agent”, que significa “agente de atividade superficial” ou simplesmente tensoativo (SABATINI et al., 2006). Segundo Martins e Kalil (2008), são moléculas anfipáticas, que possuem uma fração apolar ou hidrofóbica e uma fração polar ou hidrofílica (Figura 1). Tendem a separação preferencialmente na interface em fases fluídas com diferentes graus de polaridade e ligações de hidrogênio, tais como interfaces (limite entre duas fases imiscíveis) óleo/água, sólido-líquido ou ar/água (OLIVEIRA; MEI, 2009; ANTUNES et al., 2006).

**Figura 1** - Demonstração das forças intermoleculares na superfície (a) e no interior do líquido (b) (a cor verde simboliza o líquido e a cor vermelha a molécula)



Fonte: a própria autora, 2014

Os surfactantes sintéticos constituem uma classe importante de compostos químicos (Tabela 3) amplamente utilizados em diversos setores industriais (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

Tabela 3 - Quadro surfactantes sintéticos

<b>TENSOATIVOS DE CADEIA SIMPLES</b>			
<b>CARGA</b>	<b>FÓRMULA</b>	<b>NOME</b>	
Aniônico	$C_{12}H_{25} \text{ — } OSO_3^-Na^+$	Docecilsulfato de sódio (SDS)	
Aniônico	$C_7F_{15} \text{ — } COO^-NH_4^+$	Pentadecafluorooctanoato de amônia	
Catiônico	$C_{12}H_{25} \text{ — } N^+(CH_3)_3Cl^-$	Cloreto de dodeciltrimetilamônio	
Catiônico	$C_{16}H_{33} \text{ — } N^+(CH_3)_3Br^-$	Brometo de hexadeciltrimetilamônio	
Não-lônico	$C_{12}H_{25} \text{ — } (OCH_2CH_2)_5OH$	Dodeciléter de pentaóxietileno	
<b>FOSFOLIPÍDIOS DE CADEIAS DUPLAS</b>			
<p><math>R_1 = \text{cadeia } C_n \text{ saturada}</math></p> <p><math>R_2 = \text{cadeia } C_n \text{ insaturada}</math></p> <p><b>Cadeia Hidrocarbônica</b></p> <p><b>Cabeça Polar</b></p> <p><b>Grupo caracterizante</b></p>			
	<b>CABEÇA POLAR</b>	<b>CADEIA HIDROCARBÔNICA</b>	<b>NOME DO FOSFOLIPÍDIO</b>
Zwiteriônico	$-(CH_2)_2 - N^+(CH_3)_3$	di $C_{14}$ = dimeristoil	Fosfatidilcolina (lecitina)
Zwiteriônico	$-(CH_2)_2 - NH_3$	di $C_{12}$ = dilauroil	Fosfatidiletanolamina
<b>Outros tensoativos de cadeia dupla</b>			
Aniônico	$CH_4H_9 - CH(C_2H_5)CH_2 - COO - CH_2$ $CH_4H_9 - CH(C_2H_5)CH_2 - COO - CH - SO_3Na^+$		Aerosol OT
Catiônico	$C_{16}H_{33} \text{ — } N^+(CH_3)_2Br^-$ $C_{16}H_{33}$		Brometo de dihexadecil dimetilamônio

Fonte: Adaptado Brandão, 1999

Estima-se que o mercado mundial de surfactantes movimentava anualmente, cerca de 9,4 bilhões de dólares, com estimativa de crescimento de 35 % ao ano (KIM et al., 2000), durante a última década, sua utilização aumentou aproximadamente 300 % na indústria química americana (CASTIGLIOLI; BERTOLIN; COSTA, 2009), está projetado para atingir 2,3 milhões de toneladas em 2015, aplicados em áreas da indústria petrolífera, na produção de petróleo e óleos

lubrificantes e também na biorremediação e dispersão do derramamento de óleos, entre outros setores industriais (NITSCHKE, PASTORE, 2002).

A eficácia de um surfactante é determinada por sua habilidade de diminuir a tensão superficial da água, com a interação entre as moléculas de água e do tensoativo, diminuindo o trabalho requerido para trazer uma molécula à superfície e reduzindo assim a tensão superficial. Um surfactante eficaz pode diminuir a tensão superficial da água de  $72 \text{ mN.m}^{-1}$  para  $35 \text{ mN.m}^{-1}$  (NITSCHKE, PASTORE, 2002).

Há muitas pesquisas para identificar e isolar novos tensoativos como os de origem natural, (CHANDRAN; DAS, 2011; LIU et al., 2010; ANANDARAJ; THIVAKARAN, 2010; PORSUNTHORNTAWEE et al., 2008; MONTEIRO et al., 2007; BONILLA et al., 2005; TAHZIBI; KAMAL; ASSADI, 2004), em substituição aos surfactantes sintéticos, esta tendência tem aumentado nos últimos anos, devido à diversidade de biossurfactantes e suas potenciais aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cerâmica, papel, metal, cosméticos, tratamento de efluentes entre outras (LANG, 2002), sendo a aplicação mais promissora a limpeza de óleos em tanques de navios e biorremediação em derramamento de óleos e petróleo (FROST; SULLIVAN, 2002).

Esta tendência move-se pela necessidade de produtos mais brandos, ou de substituição de compostos não biodegradáveis (alquil benzenos ramificados) e pelo aumento da especificidade dos produtos (NISTCHEKE; PASTORE, 2002).

### **3.3.2. Biossurfactantes**

Tem-se por definição que os biossurfactantes são compostos de origem microbiana, que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial da água e possuem alta capacidade emulsificante entre dois líquidos imiscíveis. Considerados sabões biológicos biodegradáveis, são subprodutos (metabólitos secundários), estruturalmente diversos, produzidos por bactérias, fungos filamentosos e leveduras (REDDY, CHINTHAMREDDY, 2000).

A utilização de biossurfactantes data da década de 50, quando Jarvis e Johnson em 1949 detectaram atividades antibióticas e hemolíticas de um ramnolípídeo, alguns anos mais tarde, Arima e colaboradores descobriram a surfactina, um biossurfactante da classe dos lipopeptídeos, que é produzido por

bactérias do gênero *Bacillus*, com várias aplicações industriais (BARROS et al., 2007, THANIYAVARN et al., 2003).

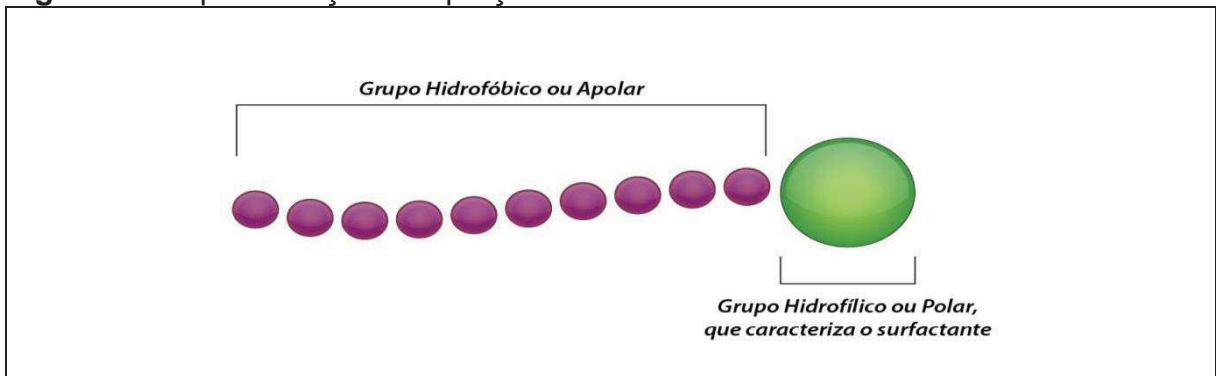
Os microrganismos produzem as moléculas de biossurfactantes utilizando vários substratos incluindo açúcares, hidrocarbonetos e resíduos agroindustriais (MESQUITA, 2004; NITSCHKE; PASTORE, 2002). Para Bognolo (1999), são produzidos, principalmente, pelo crescimento aeróbio de microrganismos, quando excretados no meio de cultivo, durante o crescimento, auxiliam no transporte e translocação de substratos insolúveis através da membrana celular.

Os biossurfactantes apresentam características comuns aos surfactantes sintéticos (Figura 2), são moléculas anfifílicas, com uma porção hidrofílica e uma porção hidrofóbica. Além disso os biossurfactantes o fato de possuírem um ou mais grupos lipofílicos e hidrofílicos, fornece a eles maior habilidade de reduzir as tensões superficiais em misturas como óleo/água quando comparados aos surfactantes sintéticos.

A fração hidrofílica dos biossurfactantes é constituída por carboidratos, aminoácidos, peptídeos cíclicos, fosfato, ácidos carboxílicos, alcoóis, ésteres entre outros (PARRA; GUINEA; MANRESA, 1989) e a fração hidrofóbica é geralmente constituída por longas cadeias de ácidos graxos, hidroxilados ou não, e seus derivados como ácido  $\alpha$ -alquil- $\beta$ -hidroxi-graxos (LANG, 2002; PARRA; GUINEA; MANRESA, 1989), capazes de formar diversas estruturas como micelas, vesículas esféricas ou irregulares e estruturas lamelares (CHAMPION et al., 1995).

A função fisiológica dos biossurfactantes pode estar associada a entrada de compostos pela membrana celular ou para aumentar a biodisponibilidade de determinados substratos presentes no meio. Também existem situações onde a produção de biossurfactantes está associada à interação das células com superfícies sólidas (MESQUITA, 2004).

**Figura 2** - Representação das porções hidrofílica e hidrofóbica de um surfactante



Fonte: a própria autora, 2014

Segundo Lin (1996), os biossurfactantes conseguem reduzir tensão superficial da água de  $72 \text{ mN.m}^{-1}$  para valores menores do que  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ . Logo, são exigidas menores quantidades de biossurfactantes para que os monômeros dessas moléculas se aglomerem formando as primeiras micelas, tendo influência nas forças atrativas do líquido, assim como em sua polaridade, o que desarranja sua superfície permitindo a diminuição da tensão superficial. Biodegradabilidade, baixa toxicidade e solubilização de compostos hidrofóbicos são características dos biossurfactantes que recebem especial atenção do setor industrial (SHALIGRAM; SINGHAL, 2010).

Inoh et al. (2003), afirmam que compostos de superfície ativa são produzidos por microrganismos capazes de crescerem em substratos insolúveis em água, apresentando diversas propriedades biológicas, além de serem intracelulares, extracelulares ou ainda constituintes da parede celular (BERTRAND et al., 1994).

Ao contrário dos surfactantes sintéticos que têm sua classificação baseada no grupamento polar, os biossurfactantes são classificados conforme a sua natureza bioquímica de sua estrutura ou com a espécie microbiana produtora (Tabela 4). O potencial de produção dos biossurfactantes é determinado pela genética dos microrganismos, embora as condições ambientais do substrato também devam ser consideradas (RAHMAN et al., 2002; BOGNOLO, 1999).

**Tabela 4-** Classificação dos biossurfactantes de acordo com a massa molecular, natureza química e microrganismos produtores

Classificação	Biossurfactante	Microrganismo	Fonte	
Baixo peso molecular	Glicolípideos	Ramnolípideos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BENICASA et al., 2004 MANEERAT, 2005 SÓBERON-CHAVEZ et al., 2005 COSTA et al., 2010 REISA et al., 2010
		Trealolípideos	<i>A. paraffineus, Rhodococcus enthopolis</i>	UCHIDA et al., 1989
		Soforolípideos	<i>Candida lypolitica, T. bombicola, Candida Lombicola, Candida apícola</i>	HOMMEL et al., 1994 RAU et al., 2001 du et al., 2003 MANEERAT, 2005
		Flavolípideos	<i>Rhodococcus erythropolis, Flavobacterium sp MTN11</i>	UCHIDA et al., 1989
	Lipopeptídeos e Lipoproteínas	Gramicidina S	<i>B. brevis</i>	AZUMA; DEMAIN, 1996
		Polimixina	<i>B. polymyxa</i>	FALAGAS et al., 2003
		Viscosina	<i>P. fluorescens</i>	NEU et al., 1990
		Peptídeo-lípideo	<i>B. licheniformis</i>	YAKIMOV et al., 1998
		Surfactina	<i>B. subtilis, B. pumilus</i>	DAVIS et al., 1999 CAMILIOS et al., 2003 MANEERAT, 2005 BARROS et al., 2007
		Ácidos graxos, lipídeos e fosfolípideos	Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
	Lipídeos neutros		<i>Nocardia erythropolis</i>	MAKKAR; CAMEOTRA, 2002
	Fosfolípideos		<i>Thiobacillus thicoxidans</i>	LEMKE et al., 2005
	Emulsan		<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	ROSEMBERG, 1993
	Alto Peso Molecular	Surfactante poliméricos	Biodspersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
Liposan			<i>Candida lipolytica</i>	CIRIGLIANO; CARMAN, 1984
Surfactante particulado		Monoproteína	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	caval et al., 1988
		Alasan	<i>Acinetobacter redioresistens</i>	NAVON-VENEZIA et al., 1995
		Vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	DESAI; BANAT, 1997

Fonte: ROSEMBERG; RON, 1999

### 3.3.2.1. Propriedades gerais dos biossurfactantes

Os tensoativos naturais possuem algumas propriedades como: emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água; transporte de hidrocarbonetos (CHUANG et al., 2010; NITSCHKE; PASTORE, 2002); aderência-liberação da célula a superfícies (ROSENBERG; RON, 1999); atividade antibiótica (LIN, 1996), alta biodegradabilidade (LIU et al., 2010), baixa toxicidade (EDWARDS et al., 2003), compatíveis com o meio ambiente (SRIRAM et al., 2011) que faz com que sejam bastante competitivos com os surfactantes de origem sintética. Como vantagens destaca-se que: os biossurfactantes apresentam alta atividade superficial e interfacial (COOPER; PADOCK, 1980), tolerância a temperatura, pH e força iônica, baixa ou nenhuma toxicidade e alta biodegradabilidade (MULLIGAN; GIBBS, 1993).

Segundo Cameotra e Makkar (2004), a concentração micelar crítica dos biossurfactantes varia entre 1 -2000 mg.L<sup>-1</sup>, enquanto que a tensão interfacial (óleo/água) e superficial fica em torno de 1 e 30 mN.m<sup>-1</sup> (Tabela 5). Assim há um crescente interesse pelos biossurfactantes, pela capacidade fisiológica que eles possuem ao atuar na interface das micelas apresentando diferentes polaridades. Ainda que este mecanismo de atuação não esteja bem elucidado, é provável que as propriedades de superfície de membrana representem um importante papel.

**Tabela 5** - Tensão superficial e concentração micelar crítica (CMC) de biossurfactantes e surfactantes

Natureza do surfactante	Microrganismo produtor	Biossurfactante	Tensão Superficial (mN.m <sup>-1</sup> )	CMC (mg.L <sup>-1</sup> )
Biológicos	Rhodococcus ruber	Glicolípideo	26,8	54
	Rhodococcus erythropolis	Trealose dicorinomicolato	36	4
	Rhodococcus erythropolis	Trealose tetra éster	26	15
	Pseudomonas aeruginosa	Ramrólípideo	29	50-200
	Candida bombicola	Soforólípideo	33	82
	Bacillus subtilis	Surfactina	27	23
Sintéticos	Dodecil sulfonato de sódio (SDS)		37	2120
	Brometo de cetiltrimetilamônio		30	130
	Tween 20		30	600
	n-alquil benzeno sulfonato		47	590
	Triton X-100		35	268

Fonte: adaptado MULLIGAN, 2005; CHRISTOFI; IVSHINA, 2002

Esse processo dinâmico baseia-se na habilidade que possuem em reduzir a tensão superficial através do remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas e/ou hidrofílicas, aumentando assim a área superficial, isto gera um aumento da biodisponibilidade e por consequência da biodegradabilidade (ANNA et al., 2002).

### **3.3.3. Classificação dos Biossurfactantes**

Segundo Nitschke e Pastore (2002), os biossurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais, são classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem glicolípídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolípídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (LANG, 2002; DESAI; DESAI, 1993).

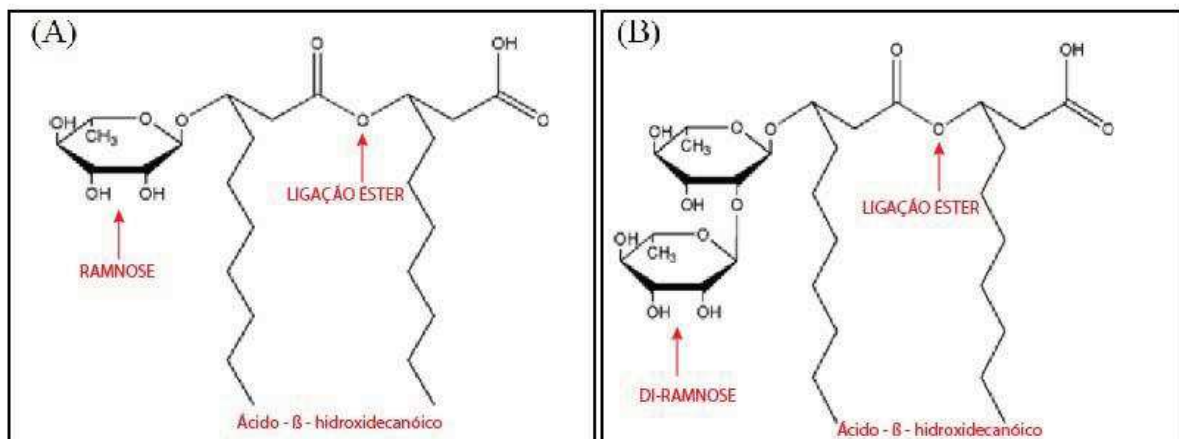
#### **3.3.3.1. Grupo dos glicolípídeos: ramnolípídeos, trealolípídeos, soforolípídeos**

Os glicolípídeos são produzidos por várias estirpes de *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria Gram-negativa não esporulada. Este microrganismo é o mais estudado na literatura (COSTA, 2010), utilizando diversos substratos, que podem conter hidrocarbonetos ou carboidratos como única fonte de carbono. O grau de polaridade desses compostos depende dos hidrocarbonetos utilizados como substratos, os mais conhecidos são formados por carboidratos (glicose, manose, galactose ou ramnose) e ácidos graxos de cadeia longa (HOLMBERG, 2001).

Camílios-Neto et al. (2008) relatou a produção de ramnolípídios por fermentação em estado sólido e otimizou sua produção por *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614, utilizando uma mistura de substratos composta por 50 % de bagaço de cana de açúcar e 50 % de farinha de semente de girassol. Após 288 h de cultivo obteve uma produção de 172g.kgSS<sup>-1</sup> (grama por quilograma de substrato seco) de ramnolípídeos.

Segundo Rosenberg e Ron (1999), os ramnolípideos são formados pela ligação de uma molécula de ramnose e duas moléculas de ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico. São classificados como mono-ramnolípídios (Figura 3a) e di-ramnolípídios (Figura 3b). Para Costa (2010), uma das moléculas do ácido  $\beta$ -hidroxidecanóico liga-se à unidade de ramnose através de uma ligação glicosídica, enquanto o grupo hidroxilo do outro ácido forma uma ligação éster. Segundo Hisatsuka et al., (1971), esta classe de surfactantes reduz a tensão superficial para valores de 30 a 25  $\text{mNm}^{-1}$ , atuando como emulsificantes de alcanos (DEZIEL et al., 1999), emulsifica hidrocarbonetos e estimula o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* em n-hexadecano.

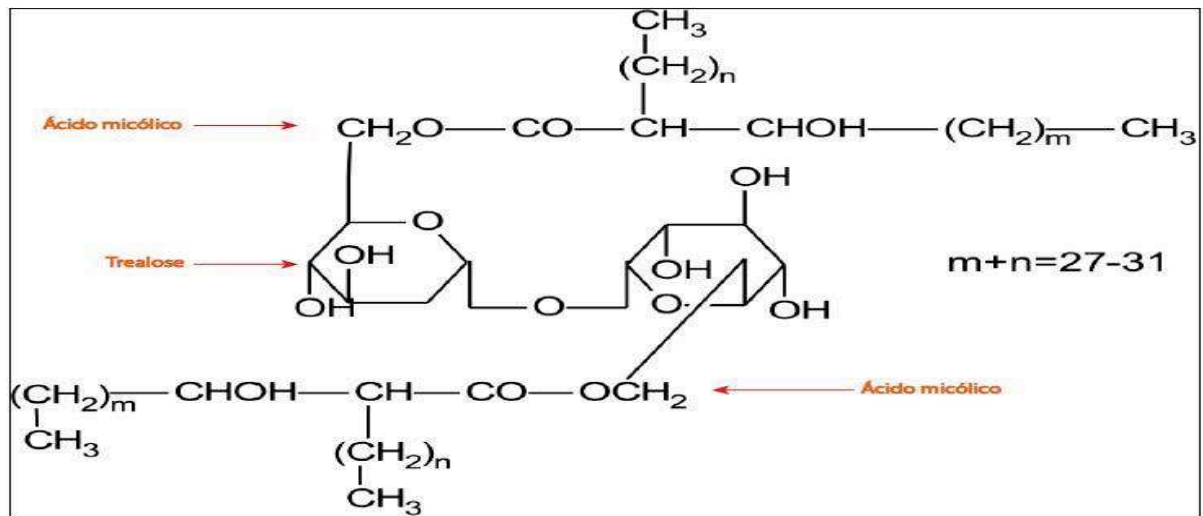
**Figura 3** - Estrutura geral de um mono-ramnolípídio (A); estrutura geral de um di-ramnolípídio (B)



Fonte: KRONEMBERGER, 2007

Os trealolípídios (Figura 4) são constituídos pelo dissacarídeo trealose ligado ao C-6 e C-6' de ácidos micólicos (DESAI; BANAT, 1997). Dependendo do microrganismo produtor, diferem no tamanho e estrutura do ácido micólico, assim como no número de átomos de carbono e no grau de insaturação (ASSELINEAU; ASSELINEAU, 1978). Estes glicolípídios quando purificados são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72  $\text{mN.m}^{-1}$  para valores inferiores a 26  $\text{mN.m}^{-1}$  (LANG; PHILIP, 1998). Para Ortiz et al. (2009), a melhor utilização desta classe de biossurfactantes é a de agente terapêutico.

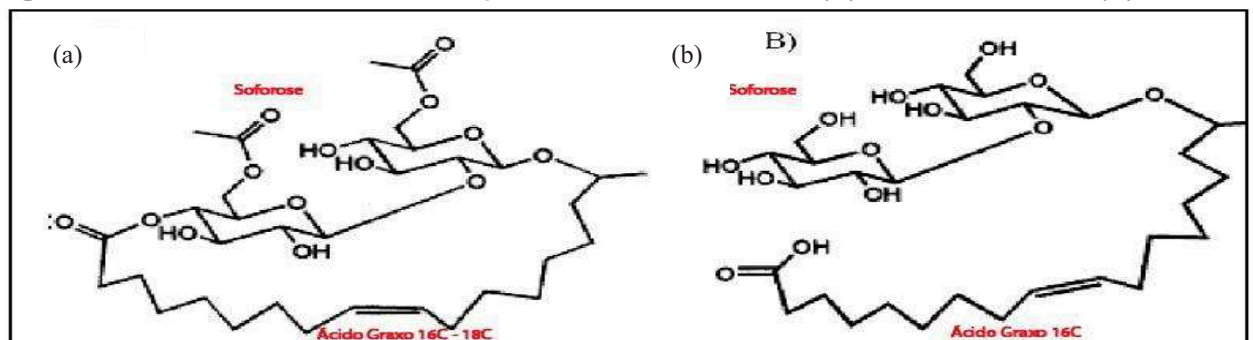
**Figura 4** - Estrutura de trealolípido produzido por *Rhodococcus erythropolis*



Fonte: DESAI, BANAT, 1997

Os sofrólípidios têm como principal estirpe produtora a *Candida bombicola* que utiliza óleos vegetais (ZHOU et al., 1996), ácido oléico (RAU et al., 1996) e alcanos (DAVILA; MARCHAL; VANDECASTEELE, 1997) como fontes de carbono. Apresenta propriedades de reduzir a tensão superficial da água de  $72 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  para  $35 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (KUMAR; MODY, JHA, 2007). Estas propriedades são mantidas em condições extremas de pH, NaCl e temperatura (COOPER; PADDOCK, 1993). Segundo Lang (2002), esta classe é formada pela ligação do carboidrato dímero sofrorose a uma cadeia longa de ácidos graxos (geralmente 16 a 18 carbonos). Apresentam duas estruturas: aberta, cujo grupo carboxílico do ácido se encontra livre (Figura 5a), ou fechada com a ligação entre o grupo carboxílico do ácido e uma hidroxila da sofrorose ao dímero de açúcar (Figura 5b). Segundo Casas, Garcia-Ochoa (1999) apresentam ação antimicrobiana.

**Figura 5** - Estrutura de um sofrólípido estrutura fechada (a) e estrutura livre (b)



Fonte: RAU et al., 1996

### 3.3.3.2. Grupo dos lipopeptídeos ou lipoproteínas

Segundo Barros et al. (2007), a classe dos lipopeptídicos é bastante estudada e caracterizada, devido as suas propriedades antibióticas, constituem um grupo de moléculas como a surfactina, iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina, bacilomicina.

Os lipopetídeos são formados pela ligação de um grupo protéico contendo de 7 a 17 aminoácidos em estrutura cíclica neutra ou aniônica e um ácido graxo com 8 a 9 grupos metil saturados ou insaturados (MAIER, 2003; ZAWAWI, 2005).

Barros, Quadros e Pastore (2008) demonstraram que os lipopeptídeos apresentam excelente capacidade tensoativa, reduzem a tensão da água de 72,31 para 27,01 mN.m<sup>-1</sup>. Sendo estável a temperatura de 100 °C por 140 minutos e a 121 °C por até 60 minutos, frente as concentrações de NaCl entre 2,5 - 20 % e pH variando na faixa de 6 a 10.

A surfactina principal representante da classe foi descoberta por Arima e colaboradores em 1968, que descreveram um novo composto biologicamente ativo, produzido por *Bacillus subtilis*, ao qual denominaram surfactina, devido a sua grande atividade superficial. Várias espécies do gênero *Bacillus* são produtoras deste composto, durante a fase estacionária, quando há limitação de nutrientes (WALENCKA et al., 2008).

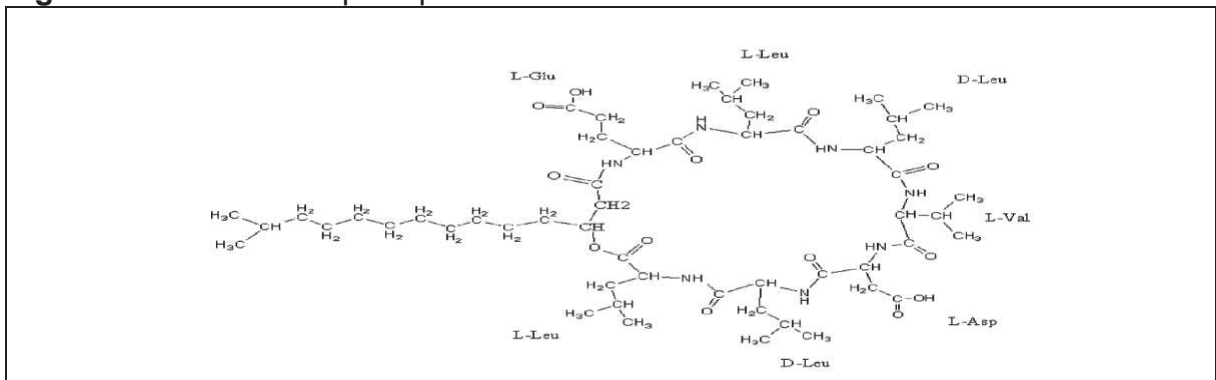
A família da surfactina compreende 7 isoformas: bamilocina A, esperina, liquensina, pumilacidina e as surfactinas A, B e C. A surfactina é um lipopeptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo, que pode variar de 12 a 16 átomos de carbono, sendo o ácido 3-hidróxi-13-metil-tetradecanóico seu principal componente (KAKINUMA et al., 1969). A principal isoforma a surfactina A (Figura 6) é constituída por um anel peptídico de sete aminoácidos (L-glutamina, L-leucina, D-leucina, L-valina, L-asparagina, D-leucina, L-leucina), acoplado a uma cadeia de ácidos graxos de treze a quinze átomos de carbono (BARROS et al., 2007; DAVIS; LYNCH, 1999). As isoformas da surfactina A, B e C variam na posição do sétimo aminoácido.

É produzida naturalmente como uma mistura de vários peptídeos com diferentes comprimentos de cadeia alifática (WALENCKA et al., 2008; BARROS et al., 2007). Sua classificação mínima na escala HMIS (Hazardous Materials

Identification System) em todos os parâmetros: saúde, inflamabilidade e reatividade, podendo ser utilizada em sistemas biológicos (Sigma - Aldrich, 2011). Com relação a sua atividade tensoativa, promove diminuição da tensão superficial da água de 72  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  para 27  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (PRIYA; USHARANI, 2009; BARROS et al., 2007; COLLA; COSTA, 2003), e a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  para valores menores que 1  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (BARROS et al., 2007).

Por ser muito versátil, a surfactina é aplicada em biorremediação de poluentes, pois aumenta a disponibilidade de compostos hidrofóbicos como óleo, hidrocarbonetos poliaromáticos, pesticidas e por conseqüência seu potencial para degradação por microrganismos. Possui também propriedades antitumoral, antibacteriana e antiviral (WALENCKA et al., 2008; VOLLENBROICH et al., 1997).

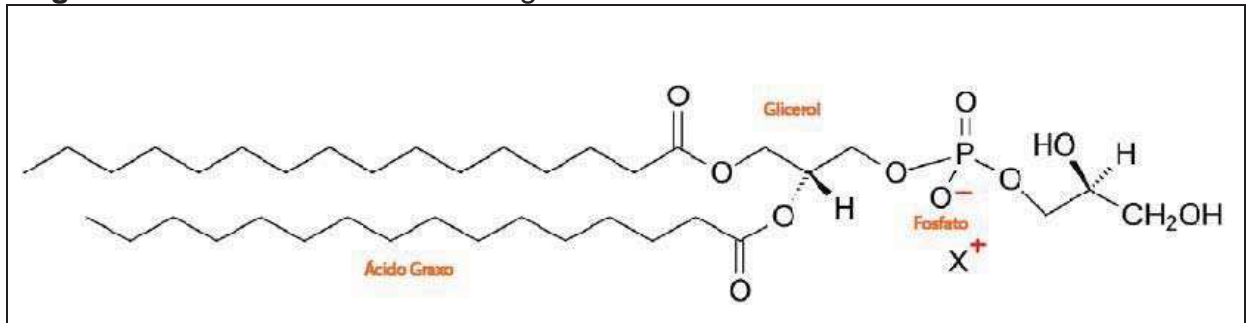
**Figura 6 - Estrutura da principal isoforma da surfactina**



Fonte: BARROS et al., 2007

### 3.3.3.3. Grupo dos fosfolipídeos, ácidos graxos e lipídeos neutros

São moléculas integrantes da estrutura celular, comuns a muitos microrganismos, podem apresentar atividade de superfície ativa e estarem ligadas aos biossurfactantes (MAIER, 2003). Os lipídios neutros (Figura 7), como os triacilgliceróis e seus ácidos graxos, mostram algum grau de atividade tensoativa. São formados por misturas de ácidos graxos  $\alpha$  e  $\beta$ -hidroxilados ligados a cadeias carbônicas longas.

**Figura 7** -Estrutura de um fosfatidilglicerol

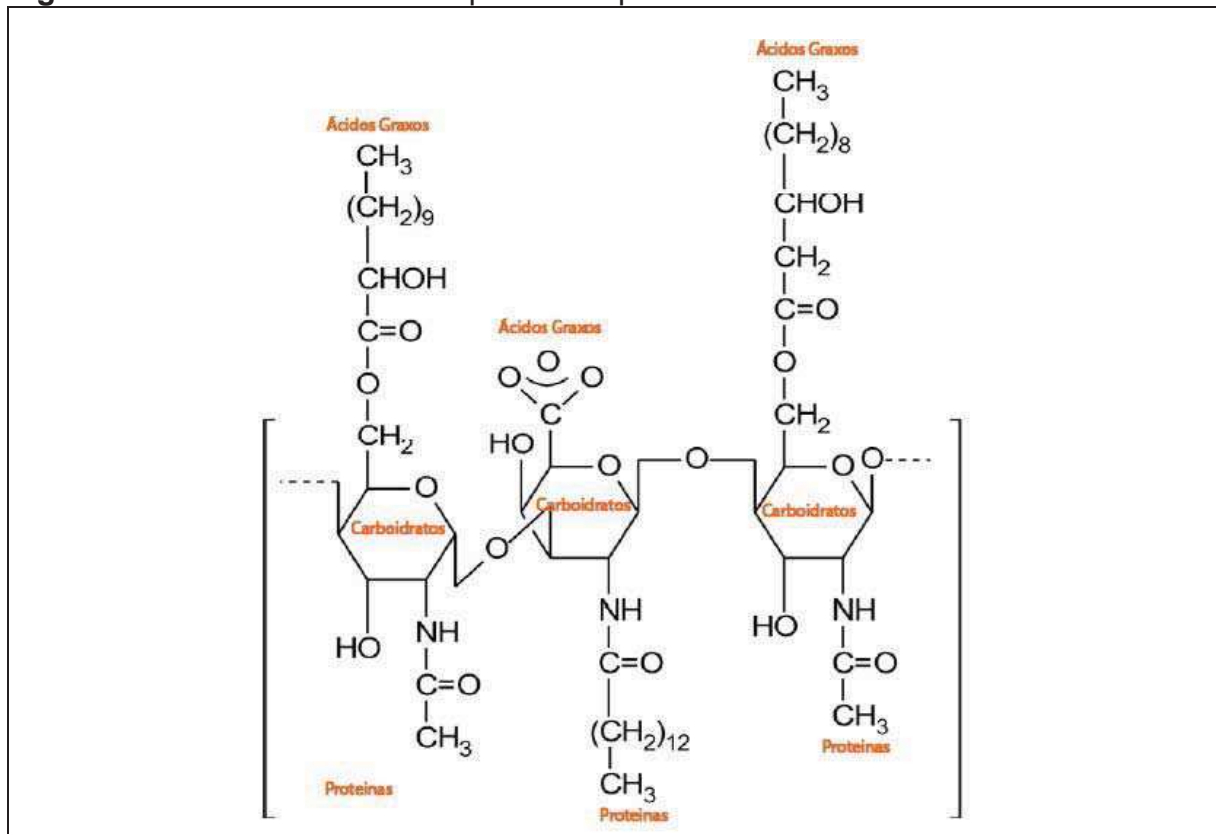
Fonte: BEEBE, UMBREIT, 1971

#### 3.3.3.4. Grupo dos biossurfactantes poliméricos e particulados

Na classe dos biossurfactantes poliméricos destaca-se o emulsan, produzido por *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 (ROSENBERG; RON, 1999). Segundo Desai e Banat (1997) é classificado como heteropolissacarídeo composto de ácidos graxos ligados covalentemente a polissacarídeos através de uma ligação orto-éster.

Segundo Maier (2003), são constituídos de carboidratos, proteínas, lipídios, bem como uma mistura destes compostos. *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 produz um potente bioemulsificador utilizado em escala comercial com o nome de EMULSAN (Figura 8), com importante uso na degradação do petróleo (BUENO, 2008; SHABTAI; GUTNICK, 1986). O emulsan apresenta uma massa molecular média de aproximadamente 1000 KDa e sua porção hidrofílica é composta por carboidratos, enquanto que sua porção hidrofóbica apresenta ácidos graxos (KIM; OH; KIM, 1997).

**Figura 8-** Estrutura do Emulsan produzido por *Acinetobacter calcoaceticus*



Fonte: DESAI; BANAT, 1997

Os biossurfactantes particulados são caracterizados como células microbianas e vesículas extracelulares com atividade tensoativas. Possuem elevada hidrofobicidade superficial, assim são considerados biossurfactante os microrganismos que degradam hidrocarbonetos (NITSCHKE; PASTORE, 2002).

### 3.3.4. Biossurfactantes Produzidos por Fermentação em Estado Sólido

A grande maioria dos biossurfactantes relatados são produzidos por fermentação submersa (FS) sob agitação constante, aeração, pH e meio de cultivo adequado ao microrganismo utilizado. A produção e eficiência dos biotensoativos é medida por alguns parâmetros indiretos como: determinação da tensão superficial, índice de emulsificação ( $E_{24}$ ), determinação da atividade emulsificante e concentração micelar crítica (MONTEIRO et al., 2007; PHETRONG; H-KITTIKUN; MANEERAT, 2008; PINTO; MARTINS; COSTA, 2009; SILVA et al., 2009; TECHAOEI et al., 2011).

Entretanto há um interesse crescente para a produção de biossurfactantes por FES (Tabela 6). Ohno, Ano e Shoda (1995) estudaram a produção de biossurfactantes utilizando como substrato o resíduo fermentado de soja (“Okara”) por linhagens de *Bacillus subtilis* geneticamente modificadas. A produção de surfactina, foi de  $2,0 \text{ g.kgSS}^{-1}$  (grama por quilograma de substrato seco). Veenanadig, Gowthaman e Karanth (2000) estudaram a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* FE-2 em biorreator de FES utilizando farelo de trigo como substrato. O extrato obtido reduziu a tensão superficial de  $54 \text{ mN.m}^{-1}$  para  $24 \text{ mN.m}^{-1}$  em 54 h de fermentação, porém não chegaram a determinar o biossurfactante produzido.

Das e Sen (2006) compararam a produção de biossurfactante por duas cepas de *Bacillus subtilis* em FS e FES, utilizando cascas de batata como substrato. A quantidade de biossurfactante produzido foi similar em ambos os sistemas, com produções de  $102$  e  $92 \text{ g.kgSS}^{-1}$  na FS e FES respectivamente, entretanto o biossurfactante não foi identificado.

Slivinski et al., (2012), produziram  $3,3 \text{ g/kgSS}$  de surfactina por FES, utilizando okara e bagaço de cana de açúcar como agente de bulking, com *Bacillus pumillus* UFPEDA 448.

Zhu et al., (2012), produziram  $50,01 \text{ mg/gss}$  de lipopeptídeos de *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173, em fermentação estado sólido, utilizando farinha de soja e palha de arroz como substrato.

**Tabela 6** - Produção de biossurfactantes, classe dos lipopetídeos, por fermentação em estado sólido

<b>Microrganismo Substrato</b>	<b>Lipopetideo Produzido</b>	<b>Referência</b>
<i>Bacillus subtilis</i> RB 14 CS Okara	Iturina A	Mizumoto, Hirai e Shoda (2006)
<i>Bacillus subtilis</i> RB 14 CS Okara	Iturina A	Mizumoto e Shoda (2007)
<i>Bacillus subtilis</i> DM-03 e DM-04 Casca de batata	Não identificado	Das e Mukherjee (2007)
<i>Bacillus subtilis</i> S3 Farelo de trigo e Farelo de arroz	Iturina A	Shih et al. (2008)
<i>Bacillus subtilis</i> B6-1 Resíduo de soja e Batata doce	Fengicina	Wang et al. (2008)
<i>Bacillus pumilus</i> UFPEDA 48 Okara + espuma	Surfactina A	Bugay et al. (2009)
<i>Bacillus subtilis</i> RB 14CS Okara	Iturina A	Ano et al. (2009)
<i>Bacillus pumillus</i> UFPEDA 448 Okara e bagaço de cana de açúcar	Surfactina	Slivinski et al. (2012)
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> XZ-173 Farelo de soja e casca de arroz	Surfactina	Zhu et al. (2012)

Fonte: própria autora.

#### 3.3.4.1. Fatores que afetam a fermentação em estado sólido (FES)

As condições ambientais e nutricionais são fatores importantes para a produção de biossurfactantes por fermentação utilizando microrganismos. Os fatores que influenciam o crescimento microbiano afetam diretamente a produção do biossurfactante (DESAI, BANAT, 1997; MUKHERJEE, DAS, SEN, 2006). Temperatura, pH e disponibilidade de oxigênio afetam a produção, pois tem efeito sobre o crescimento e também sobre as atividades celulares (DESAI; BANAT, 1997). A produção também pode ser afetada por variáveis como fontes e concentrações de carbono (CAMEOTRA, MAKKAR, 1998; NITSCHKE et al., 2005), de nitrogênio (ILORI; AMOBI; ODOCHA, 2005; ABOUSEOUD et al., 2008; CAMEOTRA; MAKKAR, 2010) e de micronutrientes como ferro (WEI; LAI; CHANG, 2007) e manganês (COOPER; PADDOCK, 1980).

### 3.4. POTENCIAIS APLICAÇÕES INDUSTRIAIS DOS BIOSURFACTANTES

As pesquisas na área de produtos biotecnológicos e sua utilização vêm merecendo atenção e ganhando cada vez mais espaço entre as indústrias química, farmacêutica, alimentícia, petroquímica, entre outras (SOUMEN; PALASHPRIYA; RAMKRISHNA, 2006; PATTANATHU; EDWARD, 2008), por possuírem alto potencial de aplicação, seja no pré-tratamento de matérias primas, modificações de produtos, gestão de resíduos ou reciclagem e conservação de energia (BANAT; MAKKAR; CAMEOTRA, 2000). Sua aplicação esta diretamente relacionada com as propriedades físico-químicas que cada composto apresenta (KOSARIC; CAIRNS; GRAY, 1984). O principal mercado é a indústria petrolífera, onde podem ser utilizados para a produção de petróleo ou adicionados a formulações de lubrificantes (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Nesta perspectiva de crescimento, os biossurfactantes são produtos biotecnológicos de interesse comercial, por possuírem ampla faixa de aplicações industriais. Apesar da diversidade que os biossurfactantes apresentam, ainda não são amplamente utilizados devido aos elevados custos de produção associados a métodos ineficientes de recuperação dos produtos, assim como a utilização de substratos caros. Contudo, este problema econômico pode ser reduzido através da utilização de fontes alternativas de substratos facilmente disponíveis que apresentam baixo custo. (VOLLBRECHT, RAU, LANG, 1999; DELEU; PAQUOT, 2004).

Os biossurfactantes possuem potencial uso e aplicações por serem biodegradáveis e uma forma alternativa aos surfactantes sintéticos. Para Benicasa et al. (2004) o grande interesse nestes produtos advém das propriedades que eles exibem, como baixa toxicidade e propriedades terapêuticas, assim como propriedades biológicas utilizadas no campo biomédico (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002).

Entre estes compostos destacam-se os lipopeptídeos, devido a sua alta atividade de superfície, podendo atuar como agentes antimicrobianos, antitumorais, antivirais, imunomoduladores, inibidores específicos de enzimas e toxinas (RODRIGUES et al, 2006).

### 3.5. *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b

O gênero *Bacillus* compreende espécies de bastonetes moveis Gram-positivos cuja extremidade é reta ou arredondada apresentam diversos tamanhos (0,5 x 1,2µm a 2,5 x 10 µm), formam endósporos e são aeróbios estritos ou facultativos. Cerca de 70 espécies são encontradas no solo, água, ar, matérias primas e alimentos processados (Gomes. 2012).

O gênero também apresenta elevada taxa de crescimento e grande capacidade de secretar proteínas para um meio extracelular, algumas espécies apresentam estado de GRAS (Generally Recognized As Safe), exigido pelo FDA (Food and Drug Administration) para aplicação na área de alimentos (SCHALLMEY, SINGH, WARD, 2004). Essas bactérias apresentam elevado potencial biotecnológico (SHAFFER et al., 2002; GORLACH-LIRA et al., 2010). Possuem ampla versatilidade metabólica, está presente na diversidade bacteriana de vários ambientes naturais e antropogênicos (LEE, TIN, KELLEY, 2002; CHANTAWANNAKUL et al., 2002).

Por ser um gênero bastante heterogêneo tanto geneticamente como fenotipicamente (tipo respiratório, metabolismo de carboidratos, composição da parede), a maioria é saprófita, não transmitem doenças para os animais, sendo o *Bacillus anthracis* a espécie mais patogênica para humanos (GOMES, 2012).

Diversas espécies do gênero *Bacillus* possuem alto potencial na produção de biossurfactantes, apresentando condições suficientes para competir com seus congêneres sintéticos. *Bacillus subtilis*, encontrada no solo, produz surfactina, lipopeptídeo cíclico que além de possuir elevada atividade, apresenta extensa atividade biológica, afetando o crescimento de tumores, bactéria, fungos, vírus e micoplasmas. Outra espécie pertencente a esse grupo são os *Bacillus licheniformis* (JAVALHERI et al., 1985; VOLLENBROICH et al., 1997; CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

O *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b foi isolado e identificado por Granzotto e colaboradores (2012) a partir de solo contaminado com petróleo coletado nas proximidades da Refinaria Getúlio Vargas-PR. Investigaram a diversidade microbiana deste solo com o objetivo de selecionar agentes de biorremediação em potencial.

Pedro (2012) avaliou a capacidade emulsificante de extratos obtidos do cultivo de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b nos resíduos agroindustriais,

bagaço de cana de açúcar, casca de arroz, torta de soja e torta de milho visando à utilização destes como substratos para estudos de produção de biossurfactantes. Nesta avaliação determinou o Índice de Emulsificação ( $IE_{24}$ ) nos extratos obtidos dos cultivos em torta de soja, torta de milho e bagaço de cana, nos extratos dos cultivos em casca de arroz não foi determinada capacidade emulsificante.

Santos (2012) determinou o perfil das enzimas extracelulares, protease, amilase, celulase e lipase, produzidas por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b sob condição de fermentação em estado sólido (FES) nos mesmos substratos estudados por Pedro (2013). O melhor substrato para a produção de enzimas foi a torta de soja, onde foram determinadas atividade proteolítica de 180 U/mL e atividade amilolítica 7 U/mL; neste estudo foram também avaliadas as atividades celulolítica e lipolítica porém para essas enzimas a atividade encontrada foi muito baixa.

Papi (2013) produziu, otimizou a produção e fez a caracterização molecular de surfactina produzida por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b por fermentação submersa, um biossurfactante da classe dos lipopeptídeos que apresenta muitas aplicações, mas, ainda não é produzido em escala industrial. As condições ótimas de cultivo foram 36,8 °C (temperatura); 8,2 (pH); 3,4 % (m/V) (salinidade); 1,02 % (m/V) concentração de glucose. A solução do extrato bruto deste biossurfactante provocou um abaixamento da tensão superficial da água de 69,82 mN/m<sup>-1</sup> para 29,52 mN/m<sup>-1</sup>, sendo a CMC de 220 mg de surfactina/L. E a caracterização molecular determinou que este extrato continha uma mistura de isoformas de surfactina, estando presentes: Anteiso-C<sub>15</sub>, Anteiso-C<sub>15</sub> [Val 7] e Iso-C<sub>14</sub> [Val 7], Anteiso C<sub>15</sub> [Leu 7]-O-metil ester ou Anteiso-C<sub>16</sub> [Leu 7], e que a Anteiso-C<sub>15</sub> se encontrava-se em maior proporção.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS**

Foram utilizados os seguintes substratos lignocelulósicos para os estudos de fermentação em estado sólido (FES): bagaço de cana de açúcar (BC) (armazenado no estoque do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia) lavado e pulverizado com gramatura de aproximadamente 28 mesh, farelo de milho (FM) (armazenado no estoque do Departamento de Bioquímica e Biotecnologia) sem nenhum processamento prévio, casca de arroz (CA), sem processamento prévio, (adquirida beneficiadora Máquina de Arroz Yara-Londrina/PR) e o farelo de soja (FS), sem processamento prévio, foi gentilmente cedido pela empresa Granosul Agroindustrial-Cambé/PR. Os substratos sólidos foram utilizados da forma como foram obtidos sem nenhum tipo de processamento prévio.

### **4.2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS SUBSTRATOS LIGNOCELULÓSICOS**

A composição centesimal dos substratos, bagaço de cana de açúcar, casca de arroz, farelo de milho e farelo de soja foi determinada de acordo com métodos oficiais da Association of Official Analytical Chemists (AOAC) e Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985) e incluiu a determinação do teor de umidade, proteínas, lipídeos totais, cinzas e carboidratos totais. Todas as determinações foram realizadas em duplicata. As técnicas e metodologias estão detalhadamente descritas no ANEXO 1.

### **4.3. MICRORGANISMO E MANUTENÇÃO DA CEPA**

A bactéria *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b foi isolada por Granzotto (2009) a partir de solo contaminado por petróleo coletado nas proximidades da Refinaria Getúlio Vargas (REPAR-PR). Esta cepa foi identificada (Granzotto et al., 2012) e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. André Luiz Martinez de Oliveira

(Departamento de Bioquímica e Biotecnologia-Universidade Estadual de Londrina (UEL). O microrganismo foi mantido em tubos de ensaio contendo meio sólido inclinado de Dyg's, a cultura foi recoberta com óleo mineral autoclavado e desta forma mantida em freezer (-4 °C); repiques foram feitos a cada seis meses.

#### 4.4. MEIOS DE CULTIVO

##### 4.4.1. Meio de Manutenção (Dyg's)

O meio de Dyg's foi utilizado como meio de manutenção para o microrganismo e foi preparado como descrito na Tabela 7.

**Tabela 7-** Composição do meio de Dyg's

<b>Composição</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
Extrato de levedura	2,0
Fosfato monoácido de potássio	0,5
Glicose	0,2
Peptona	1,5
Sulfato de magnésio	0,5

Os reagentes foram dissolvidos em água destilada, e o volume foi completado para 1000 mL. Para o preparo do meio sólido, foram adicionadas 15 gramas de ágar.

##### 4.4.2. Meio de Sais Minerais-1 (MSM-1)

O meio de sais minerais (MSM-1) (Tabela 8) foi utilizado para o preparo do inóculo dos cultivos de FES; como solução umedecedora dos substratos lignocelulósicos e preparado segundo Camilios-Neto et al., (2008).

**Tabela 8-** Composição do meio de sais minerais

<b>Composição</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0

Os reagentes foram dissolvidos em água destilada e o volume foi completado para 1000 mL. Como fonte de carbono foi adicionada glicose separadamente autoclavada de forma a obter uma solução final com a concentração 0,2 % (m/v).

#### 4.4.3. Meio de Sais Minerais-2 (MSM-2)

O meio de sais minerais (MSM-2) (Tabela 9) foi utilizado como solução umedecedora dos substratos lignocelulósicos e preparado segundo ZHU et al. (2012).

**Tabela 9 – Composição do meio de sais minerais (MSM-2)**

<b>Composição</b>	<b>g.L<sup>-1</sup></b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5
KCl	0,5
MnSO <sub>4</sub>	5.10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub>	0,16.10 <sup>-3</sup>
FeSO <sub>4</sub>	0,15.10 <sup>-3</sup>
L-fenilalanina	2.10 <sup>-3</sup>

#### 4.5. CULTIVOS DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

##### 4.5.1. Preparo do Inóculo

A bactéria inicialmente foi cultivada em Erlenmeyers de 50 mL contendo 10 mL de meio de sais (MSM-1), acrescida de 2 % de glicose, esses frascos foram inoculados pela transferência de uma alçada de células provenientes de tubos estoque, contendo meio sólido Dyg's e então incubados a 37± 2 °C sob agitação de 180 rpm em shaker orbital, por 24 horas. Após este período 200 µL da suspensão de células obtida foi utilizada como inóculo, e este volume continha aproximadamente 4.10<sup>7</sup> UFC/mL.

#### **4.5.2. Ensaio Preliminares para a Avaliação do Crescimento do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b nos Substratos Bagaço de Cana de Açúcar, Farelo de Soja, Farelo de Milho e Casca de Arroz**

Para os cultivos preliminares de fermentação em estado sólido (FES) foram utilizados quatro resíduos agroindustriais, bagaço de cana (BC), farelo de soja (FS), farelo de milho (FM) e casca de arroz (CA). Os cultivos foram desenvolvidos em Erlenmeyers de 50 mL, contendo separadamente 1,5 g dos materiais lignocelulósicos umedecidos com diferentes volumes de solução de sais (MSM-1) que variaram entre 4 e 10 mL de acordo com o material. Nesses ensaios foram também realizados os estudos de padronização da umidade para a FES onde a solução umedecedora foi adicionada progressivamente aos substratos sólidos para atingir a umidade de 80 %. Os frascos foram incubados com 200  $\mu$ L de suspensão de células (descrita em 4.5.1.) e mantidos em incubadora BOD  $28 \pm 2$  °C, durante 4 dias. Todos os experimentos foram desenvolvidos em quadruplicatas.

##### **4.5.2.1. Verificação do crescimento por microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Amostras dos substratos fermentados e dos substratos in natura foram utilizadas para a obtenção de imagens de microscopia eletrônica de varredura. O processamento das amostras foi realizado no Laboratório de Microscopia Eletrônica da UEL. As imagens foram geradas no microscópio eletrônico Modelo Quanta 200 da FEI Philips com capacidade máxima de aproximação de 50.000 vezes.

As amostras coletadas dos frascos de cultivo foram submetidas a duas técnicas de preparo, segundo Dominguez-Manzano et al. (2012) e Setta et al. (2012). As amostras foram secas, fixadas e desidratadas antes de serem conduzidas ao microscópio eletrônico de varredura.

#### **4.5.2.2. Avaliação do crescimento do microrganismo por plaqueamento e contagem de unidades formadoras de colônias**

O crescimento do *B. amyloliquefaciens* MO.04b foi determinado pela contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) nos cultivos de FES contendo 1,5 g dos resíduos BC, FM, FS e CA. Os cultivos foram interrompidos pela adição de solução salina estéril 0,85 %. Em seguida os frascos de Erlenmeyer foram agitados por 30 minutos em shaker orbital; a partir da suspensão obtida foram feitas diluições decimais em série, de  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ . Em seguida alíquotas de 200  $\mu$ L das diluições  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ , foram transferidas pelo método “pour plate” para placas de Petri contendo meio de cultura sólido de Dyg’s. As placas foram incubadas em estufa BOD, com temperatura de  $28 \pm 2$  °C, por 24 horas. Após este período de incubação o número de unidades formadoras colônias foi contado e expresso em UFC por grama de substrato seco (UFC/gss) de acordo com Zhu et al. (2012). Todos os procedimentos foram desenvolvidos em quadruplicatas.

#### **4.5.3. Interrupção dos Cultivos e Obtenção do Extrato Livre de Células (ELC)**

A interrupção dos cultivos foi realizada pela adição de água destilada, de 10 a 15 mL nos frascos dependendo da capacidade de absorção do resíduo estudado. Após esta adição o conteúdo dos frascos foi homogeneizado em Shaker durante 30 minutos a 180 rpm e logo após o conteúdo foi transferido para tubos de centrifuga e submetidos à centrifugação a 9.000 rpm, a  $4 \pm 2$  °C, 20 minutos. Os respectivos extratos livres de células (ECL) foram coletados e armazenados até a realização das determinações analíticas.

#### **4.5.4. Perfil de Crescimento e Produção de Lipopeptídeos nas Misturas Farelo de Soja mais Casca de Arroz e Farelo de Milho mais Casca de Arroz**

Estes cultivos foram desenvolvidos em erlenmeyers de 250 mL, contendo farelo de soja e casca de arroz, separados e em misturas proporcionais. Estes substratos foram umedecidos com MSM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . ( $3,0 \text{ g.L}^{-1}$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  ( $7,0 \text{ g.L}^{-1}$ )  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ( $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) e  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ ), alcançando 80 % de umidade,

e esterilizados 2 vezes. Em seguida foram inoculados assepticamente e incubados, por 36 horas, em estufa a 37 °C. Para interrupção dos cultivos foram adicionados 50 mL de água destilada e os frascos foram submetidos a agitação por 30 minutos, 37 °C e 200 rpm. Os substratos foram então retirados com auxílio de filtragem a vácuo para extração de todo líquido. O filtrado foi então centrifugado a 9.000 g por 20 minutos para obtenção do extrato livre de células (ELC).

#### 4.6. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS NA MISTURA FARELO DE SOJA E CASCA DE ARROZ

Para avaliação dos parâmetros de cultivo, foram desenvolvidas fermentações em erlenmeyers de 50 mL, contendo solução umedecedora, suficiente para se obter 80 % de umidade, inoculados com 200 µL de suspensão de células e mantidos em BOD a 37 °C por 36 horas. Todos os estudos e determinações analíticas foram realizados em triplicata.

##### 4.6.1. Avaliação da Solução Umedecedora para Fermentação em Estado Sólido

Foi avaliado o efeito de duas soluções umedecedoras (Tabela 10) em FES, para produção de lipopetídeos.

**Tabela 10** – Composição de diferentes soluções umedecedoras utilizadas em ensaios preliminares para avaliação dos parâmetros de cultivo

Composição	Solução A (g.L <sup>-1</sup> )	Solução B (g.L <sup>-1</sup> )
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,0	--
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2	0,5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,0	--
KCl	--	0,5
MnSO <sub>4</sub>	--	5.10 <sup>-3</sup>
CuSO <sub>4</sub>	--	0,16.10 <sup>-3</sup>
FeSO <sub>4</sub>	--	0,15.10 <sup>-3</sup>
L-fenilalanina	--	2.10 <sup>-3</sup>

A – Camilios-Neto et al.(2008); B – Zhu et al. (2012)

#### **4.6.2. Seleção de Fontes de Nitrogênio e Fontes de Carbono**

Foram testadas diferentes fontes de nitrogênio adicionais: uréia, extrato de levedura, sulfato de amônio e peptona na concentração 0,15 g, e diferentes fontes de carbono adicionais: glicose, sacarose, amido e glicerol, na concentração de 0,15 g, na produção de lipopetídeos.

#### **4.6.3. Seleção do pH inicial**

Foi avaliada a influência do pH inicial da solução umedecedora, com auxílio de potenciômetro, os pH avaliados foram 6,7 e 8, na produção de lipopetídeos.

### **4.7. ANÁLISE EXPLORATÓRIA UTILIZANDO PLANEJAMENTO FATORIAL E ANÁLISE POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA NA PRODUÇÃO DE LIPOPETÍDEO**

Para avaliar os parâmetros da FES com *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b para produção de lipopetídeos foi utilizado planejamentos fatoriais e análise por metodologia de superfície de resposta, ferramenta estatística, matemática utilizada para avaliar o efeito que variáveis independentes têm sobre a variável resposta desejada. O planejamento fatorial de Box-Behnken é um planejamento experimental utilizado para procedimentos de otimização e o modelo consiste na repetição do ponto central, para medir a variabilidade experimental, mais um conjunto de pontos fatoriais ancorados no ponto central definindo a região de interesse (BOX; BEHNKEN, 1960). A variável resposta utilizada foi a produção de lipopetídeos em mg/gss. Os dados foram tabulados e os gráficos construídos pelo programa Statistica 10.0.

Todos os ensaios do planejamento tiveram como resposta a quantificação de lipopeptídeos, a medida de pH final do extrato livre de células e a medida da tensão superficial pelo do método do ane de Du Nouy.

Todas as análises foram feitas em duplicata.

#### 4.7.1. Planejamento Fatorial Box-Behnken 3<sup>4</sup> para Otimização da Produção de Lipopetideos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b (Primeira Rodada de Experimentos)

Na primeira rodada de experimentos foi aplicado um planejamento fatorial Box-Behnken 3<sup>4</sup>, com quatro variáveis, três níveis e 5 repetições do ponto central (Tabelas 11 e 12). As variáveis independentes ( $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  e  $x_4$ ) e as variáveis decodificadas ( $X_1$  = farelo de soja,  $X_2$  = casca de arroz,  $X_3$  = extrato de levedura,  $X_4$  = glicerol) estão apresentadas na Tabela 12. As condições de cultivo foram estabelecidas em 37 °C e 36 horas de incubação.

**Tabela 11** - Variáveis independentes e níveis de variação no planejamento fatorial Box-Behnken 3<sup>4</sup>

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
$X_1$ = Farelo de soja (g)	2,50	5,00	7,50
$X_2$ = Casca de arroz (g)	0	2,50	5,00
$X_3$ = Extrato de levedura (g)	0,00	0,15	0,30
$X_4$ = Glicerol (g)	0,00	0,15	0,30

**Tabela 12** – Box-Behnken 3<sup>4</sup> para fermentação em estado sólido com *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b para produção de lipopetideos

	Variáveis Codificadas				Variáveis Decodificadas			
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$
	Farelo soja	Casca Arroz	Extrato levedura	Glicerol	Farelo soja	Casca Arroz	Extrato levedura	Glicerol
1	-1	-1	0	0	2,50	0,00	0,15	0,15
2	1	-1	0	0	7,50	0,00	0,15	0,15
3	-1	1	0	0	2,50	5,00	0,15	0,15
4	1	1	0	0	7,50	5,00	0,15	0,15
5	0	0	-1	-1	5,00	2,50	0,00	0,00
6	0	0	1	-1	5,00	2,50	0,30	0,00
7	0	0	-1	1	5,00	2,50	0,00	0,30
8	0	0	1	1	5,00	2,50	0,15	0,30
9	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15
10	-1	0	0	-1	2,50	2,50	0,15	0,00
11	1	0	0	-1	7,50	2,50	0,15	0,00
12	-1	0	0	1	2,50	2,50	0,15	0,30
13	1	0	0	1	7,50	2,50	0,15	0,30
14	0	-1	-1	0	5,00	0,00	0,00	0,15
15	0	1	-1	0	5,00	5,00	0,00	0,15
16	0	-1	1	0	5,00	0,00	0,30	0,15

17	0	1	1	0	5,00	5,00	0,30	0,15
18	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15
19	-1	0	-1	0	2,50	2,50	0,00	0,15
20	1	0	-1	0	7,50	2,50	0,00	0,15
21	-1	0	1	0	2,50	2,50	0,30	0,15
22	1	0	1	0	7,50	2,50	0,30	0,15
23	0	-1	0	-1	5,00	0,00	0,15	0,00
24	0	1	0	-1	5,00	5,00	0,15	0,00
25	0	-1	0	1	5,00	0,00	0,15	0,30
26	0	1	0	1	5,00	5,00	0,15	0,30
27	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15
28 (C)	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15
29 (C)	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15
30 (C)	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15
31 (C)	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15
32 (C)	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15
33 (C)	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15

\*os experimentos foram aleatorizados

#### 4.7.2. Planejamento Fatorial Box-Behnken 3<sup>3</sup> para Otimização da Produção de Lipopeptídeos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b (Segunda Rodada de Experimentos)

A segunda rodada de experimentos foi elaborada para avaliar a produção de lipopeptídeos utilizando planejamento fatorial Box-Behnken 3<sup>3</sup>, com três variáveis, três níveis e 5 repetições do ponto central (Tabelas 13 e 14). As variáveis independentes ( $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ) e as variáveis decodificadas ( $X_1$  = farelo de soja,  $X_2$  = casca de arroz,  $X_3$  = extrato de levedura,  $X_4$  = glicerol) estão apresentadas na Tabela 14. As condições de cultivo foram estabelecidas em 37° C e 36 horas de incubação.

**Tabela 13** - Variáveis independentes e níveis de variação no planejamento fatorial Box-Behnken 3<sup>3</sup>

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
$X_1$ = Farelo de soja (g)	5,00	7,50	10,00
$X_3$ = Extrato de levedura (g)	1,50	1,75	2,00
$X_4$ = Glicerol (g)	1,50	1,75	2,00

**Tabela 14** - Box-Behnken 3<sup>3</sup> para fermentação em estado sólido com *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b para produção de lipopeptídeos

	Variáveis Codificadas			Variáveis decodificadas		
	x <sub>1</sub>	x <sub>2</sub>	x <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
	Farelo De soja	Extrato de Levedura	Glicerol	Farelo De soja	Extrato de Levedura	Glicerol
1	-1	-1	0	5,00	1,50	1,75
2	1	-1	0	10,00	1,50	1,75
3	-1	1	0	5,00	2,00	1,75
4	1	1	0	10,00	2,00	1,75
5	-1	0	-1	5,00	1,75	1,50
6	1	0	-1	10,00	1,75	1,50
7	-1	0	1	5,00	1,75	2,00
8	1	0	1	10,00	1,75	2,00
9	0	-1	-1	7,50	1,50	1,50
10	0	1	-1	7,50	2,00	1,50
11	0	-1	1	7,50	1,50	2,00
12	0	1	1	7,50	2,00	2,00
13	0	0	0	7,50	1,75	1,75
14	0	0	0	7,50	1,75	1,75
15	0	0	0	7,50	1,75	1,75
16	0	0	0	7,50	1,75	1,75
17	0	0	0	7,50	1,75	1,75

\*os experimentos foram aleatorizados

#### 4.7.3. Planejamento Fatorial Box-Behnken 3<sup>3</sup> para Otimização da Produção de Lipopeptídeos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b (Terceira Rodada de Experimentos)

A terceira rodada de experimentos foi elaborada para avaliar a produção de lipopeptídeos utilizando planejamento fatorial Box-Behnken 3<sup>3</sup>, com três variáveis, três níveis e 5 repetições do ponto central (Tabelas 15 e 16). As variáveis independentes (x<sub>1</sub>, x<sub>2</sub>, x<sub>3</sub>) e as variáveis decodificadas (X<sub>1</sub> = farelo de soja, X<sub>2</sub> = casca de arroz, X<sub>3</sub> = extrato de levedura, X<sub>4</sub> = glicerol) estão apresentadas na Tabela 16. As condições de cultivo foram estabelecidas em 37° C e 36 horas de incubação.

**Tabela 15** - Variáveis independentes e níveis de variação no planejamento fatorial Box-Behnken 3<sup>3</sup>

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
X <sub>1</sub> = Farelo de soja (g)	4,00	5,00	6,00
X <sub>3</sub> = Extrato de levedura (g)	1,50	1,75	2,00
X <sub>4</sub> = Glicerol (g)	1,50	1,75	2,00

**Tabela 16** - Box-Behnken 3<sup>3</sup> para fermentação em estado sólido com *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b para produção de lipopetídeos

	Variáveis codificadas			Variáveis decodificadas		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
	Farelo de Soja	Extrato de Levedura	Glicerol	Farelo de Soja	Extrato de Levedura	Glicerol
1	-1	-1	0	4,00	1,50	1,750
2	1	-1	0	6,00	1,50	1,750
3	-1	1	0	4,00	2,00	1,750
4	1	1	0	6,00	2,00	1,750
5	-1	0	-1	4,00	1,75	1,500
6	1	0	-1	6,00	1,75	1,500
7	-1	0	1	4,00	1,75	2,000
8	1	0	1	6,00	1,75	2,000
9	0	-1	-1	5,00	1,50	1,500
10	0	1	-1	5,00	2,00	1,500
11	0	-1	1	5,00	1,50	2,000
12	0	1	1	5,00	2,00	2,000
13	0	0	0	5,00	1,75	1,750
14	0	0	0	5,00	1,75	1,750
15	0	0	0	5,00	1,75	1,750
16	0	0	0	5,00	1,75	1,750
17	0	0	0	5,00	1,75	1,750

\*os experimentos foram aleatorizados

#### 4.7.4. Planejamento Fatorial Box-Behnken 3<sup>3</sup> para Otimização da Produção de Lipopetídeos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b (Quarta Rodada de Experimentos)

A quarta rodada de experimentos foi elaborada para avaliar a produção de lipopeptídeos utilizando planejamento fatorial Box-Behnken 3<sup>3</sup>, com três variáveis, três níveis e 5 repetições do ponto central (Tabelas 17 e 18). As variáveis

independentes ( $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$ ) e as variáveis decodificadas ( $X_1$  = farelo de soja,  $X_2$  = casca de arroz,  $X_3$  = extrato de levedura,  $X_4$  = glicerol) estão apresentadas na Tabela 18. As condições de cultivo foram estabelecidas em 37° C e 36 horas de incubação.

**Tabela 17** - Variáveis independentes e níveis de variação no planejamento fatorial Box-Behnken 3<sup>3</sup>.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
$X_1$ = Farelo de soja	2,50	4,00	5,50
$X_2$ = Extrato de levedura	1,25	1,50	1,75
$X_3$ = Glicerol	1,50	1,75	2,00

**Tabela 18** – Box-Behnken 3<sup>3</sup> para fermentação em estado sólido com *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b para produção de lipopetídeos

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas		
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$X_1$	$X_2$	$X_3$
	Farelo de Soja	Extrato de Levedura	Glicerol	Farelo de Soja	Extrato de Levedura	Glicerol
1	-1	-1	0	2,50	1,25	1,75
2	1	-1	0	5,50	1,25	1,75
3	-1	1	0	2,50	1,75	1,75
4	1	1	0	5,50	1,75	1,75
5	-1	0	-1	2,50	1,50	1,50
6	1	0	-1	5,50	1,50	1,50
7	-1	0	1	2,50	1,50	2,00
8	1	0	1	5,50	1,50	2,00
9	0	-1	-1	4,00	1,25	1,50
10	0	1	-1	4,00	1,75	1,50
11	0	-1	1	4,00	1,25	2,00
12	0	1	1	4,00	1,75	2,00
13	0	0	0	4,00	1,50	1,75
14	0	0	0	4,00	1,50	1,75
15	0	0	0	4,00	1,50	1,75
16	0	0	0	4,00	1,50	1,75
17	0	0	0	4,00	1,50	1,75

\*os experimentos foram aleatorizados

## **4.8. DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS**

### **4.8.1. Determinação dos Açúcares Totais**

Para a determinação quantitativa dos açúcares totais utilizou-se o método fenol-ácido sulfúrico de Dubois et al. (1956). A curva de calibração foi realizada com padrão de glucose 1 mg/mL, realizada na faixa de sensibilidade de 0 a 100 µg/mL as leituras espectrofotométricas realizadas 490 nm.

### **4.8.2. Determinação dos Açúcares Redutores**

Para a determinação quantitativa dos açúcares redutores foi utilizado o método de Somogyi (1945) e Nelson (1944). A curva de calibração foi realizada com padrão de glucose 1 mg/mL, realizada na faixa de sensibilidade de 10 a 60 µg/mL as leituras espectrofotométricas realizadas 540 nm.

### **4.8.3. Determinação das Proteínas Totais**

Para a determinação quantitativa das proteínas totais foi utilizado o método de Hartre (1972). A curva de calibração foi realizada com padrão de sora albumina bovina 1 mg/mL, realizada na faixa de sensibilidade de 0 a 200 µg/mL as leituras espectrofotométricas realizadas 650 nm.

### **4.8.4. Determinação da Tensão Superficial**

Para determinação da tensão superficial (TS) foi utilizado tensiometro Krüss analógico, segundo metodologia de Du Nouy, disponível no departamento de Bioquímica da UEL. A amostra foi colocada em recipiente do próprio aparelho, com o anel de platina inicialmente submerso. Uma força adicional é exercida sobre o anel, e no momento em que a lâmina do líquido se rompe, a TS é determinada (KRÜSS, 1994).

As condições de ensaio foram padronizadas com volume médio de 15 mL de amostra na temperatura ambiente. A calibração do aparelho se deu com a medida da TS da água destilada, cujo valor está em torno de 72 mN/m.

#### 4.8.5. Medida do Índice de Emulsificação

O índice de emulsificação (IE) foi determinado conforme a metodologia de Cooper e Goldenberg (1987) adaptada. Em um tubo de ensaio foram colocados 3 mL de querosene e em seguida 3 mL dos sobrenadantes das culturas. Cada tubo foi agitado em vórtex por 2 minutos e deixado em repouso por 24 horas. A percentagem de emulsificação foi determinada pela Equação (01). A medida foi realizada em 24 horas de repouso.

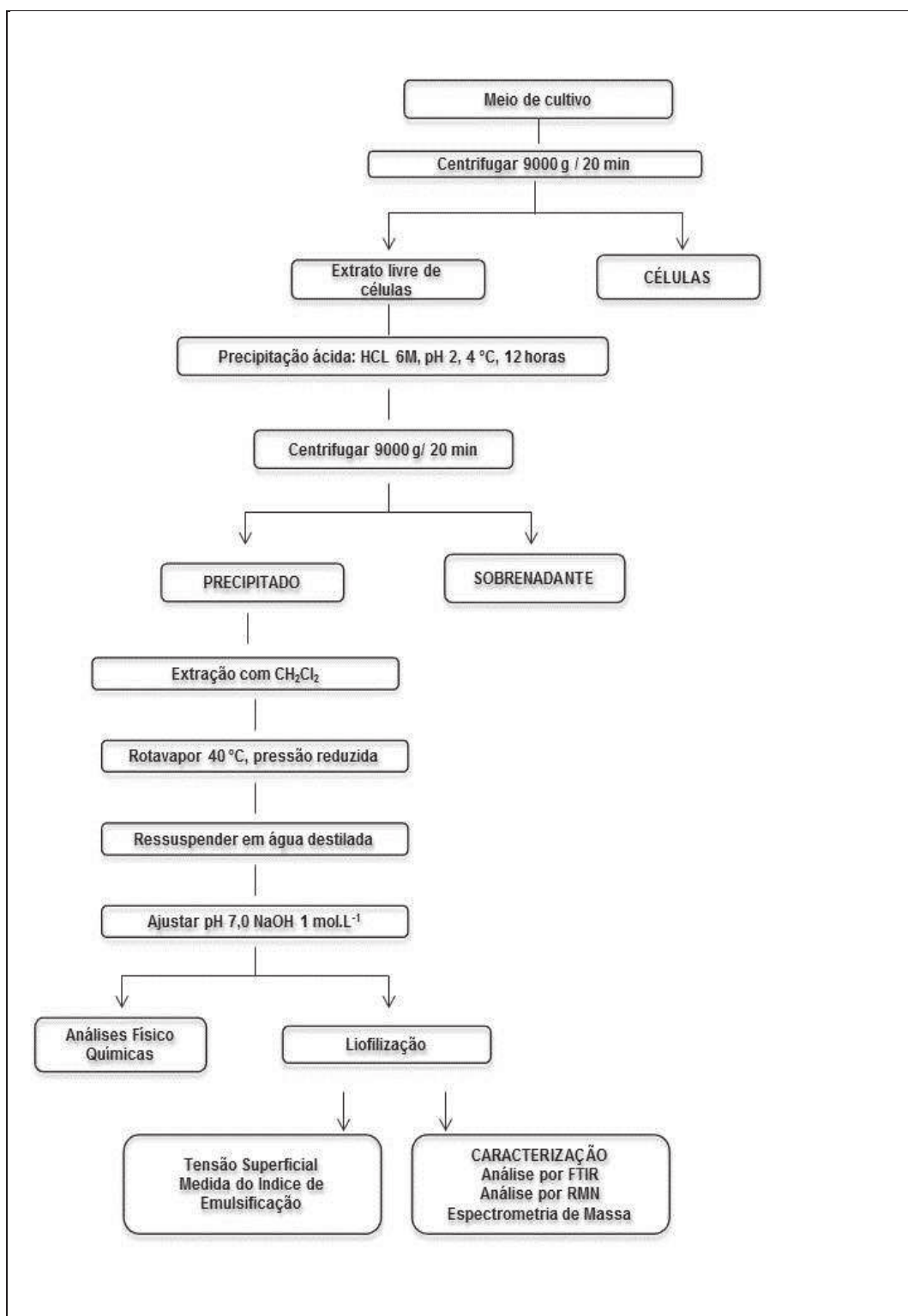
$$IE_{24} = \frac{\text{altura camada emulsionada (cm)}}{\text{altura total do líquido (cm)}} \times 100 \quad \text{Equação 01}$$

#### 4.8.6. Extração de Lipopetídeos de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em FES

O fluxograma para extração e obtenção dos lipopetídeos de *B. amyloliquefaciens* MO.04b está descrito na Figura 9. Após cultivo, o pH do extrato livre de células obtido foi ajustado para 2,0 (HCl 6 mol.L<sup>-1</sup>), este sobrenadante acidificado foi mantido a 4 °C por 12 horas para precipitação dos lipopetídeos, Ao acidificar a solução contendo lipopetídeos para pH igual a 2 ocorre uma elevação da tensão superficial para 62 mN.m<sup>-1</sup>, que volta para 27 mN.m<sup>-1</sup> com a neutralização, mostrando a dependência das propriedades surfactantes do lipopetídeo ao pH (COOPER; PADOCK, 1980). Esta dependência se deve ao fato de que em meio ácido os lipopetídeos precipitam devido à perda de solubilidade causada por protonação. Quando o pH do meio retorna ao valor original, o surfactante sofre desprotonação tornando-se novamente solúvel (COOPER; PADOCK, 1980; COSTA, 2006). O precipitado foi então separado por centrifugação a 9.000 g por 20 minutos. Este precipitado foi submetido a extração com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, onde o solvente da fase orgânica foi solubilizado. O solvente orgânico foi evaporado a 40 °C em evaporador rotatório, sob pressão reduzida obtendo-se uma fração residual, a qual foi adicionada 10 mL de água destilada e o pH foi novamente ajustado para 7,0 com solução de NaOH 1mol.L<sup>-1</sup> (GHOJAVAND et al., 2008). Ao final, o extrato foi submetido a determinação da tensão superficial e liofilizados para a quantificação

dos lipopeptídeos e caracterização molecular por FTIR, RMN e espectrometria de massa.

**Figura 9** - Obtenção dos lipopeptídeos produzidos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em fermentação em estado sólido em diferentes substratos



FONTE: a própria autora 2014

#### **4.9. CARACTERIZAÇÃO DO LIPOPETÍDEO PRODUZIDO POR *Bacillus amyloliquafaciens* MO.04b EM FES**

##### **4.9.1. Análise por Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)**

A espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF) foi realizada utilizando o espectrômetro pertencente ao departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina. Uma pequena quantidade da amostra seca liofilizada, foi misturada e macerada junto a brometo de potássio (KBr) após este processo o material foi prensada, tornando-se uma pastilha fina e consistente, o espectro foi então gerado na faixa de comprimento de onda de 400 – 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

##### **4.9.2. Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN de 1H e 13C)**

As análises de RMN de 1H e 13C do material extraído foi realizada em espectrômetro Avance III (Bruker), com sonda BBI de 5 mm. O solvente utilizado foi o dimetilsulfóxido deuterado, à temperatura de 303 K. As análises de 1H foram realizadas a 400,13 MHz e de 13C a 100,62 MHz. Todas as análises foram realizadas seguindo as sequências de pulso descritas por Braun, Kalinowski e Berger (2006).

##### **4.9.3. Espectrometria de Massa**

Uma pequena massa do material extraído e solubilizado em uma solução MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1), sendo em seguida realizada a tomada de dados em um espectrômetro de massas microTOF II – ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics). A injeção da amostra no espectrômetro foi feita por bomba de infusão, sendo o fluxo de 300  $\mu\text{L/h}$ . O espectro foi gerado tanto no modo positivo de detecção quanto no modo negativo de detecção.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DOS RESÍDUOS BAGAÇO DE CANA (BC), FARELO DE SOJA (FS), FARELO DE MILHO (FM) E CASCA DE ARROZ (CA)

As composições centesimais dos resíduos BC, FS, FM e CA foram determinadas e os resultados estão apresentados na Tabela 19. Os teores de carboidratos obtidos no BC (61 %) e FM (42 %) mostram que estes substratos são os melhores fornecedores de fonte de carbono. O teor de proteínas do FS (47 %) apresenta este substrato como o melhor fornecedor de fonte de nitrogênio. Resíduos agroindustriais são fontes de macro e micronutrientes essenciais, para o crescimento microbiano nestes substratos é fundamental o conhecimento da relação carbono-nitrogênio (C/N), o carbono é utilizado como fonte de energia para que ocorra assimilação do nitrogênio, pois se houver esgotamento desta fonte a população de microbiana não terá como crescer, já que este elemento é requerido em grande quantidade para a síntese proteica. (MATOS, 2005). Existe uma influência significativa na utilização desses elementos pelo microrganismo, que reflete na sua capacidade de crescimento e de produção de metabólitos específicos.

A partir dessas informações podem-se criar misturas de resíduos que forneçam a nutrição necessária para microrganismos cultivados em fermentação em estado sólido. E também foi possível determinar aproximadamente as relações C/N (total) para o farelo de soja FS 1:3; farelo de milho FM 3,5:1; casca de arroz CA 19:1 e bagaço de cana de açúcar BC 30:1.

**Tabela 19** - Composição centesimal dos resíduos agroindustriais

	Umidade	Cinzas	Lípidos	Proteínas	Carboidratos
<b>Bagaço de cana</b>	22%	2%	7%	2%	61%
<b>Farelo de soja</b>	24%	4%	5%	47%	14%
<b>Farelo de milho</b>	26%	2%	12%	12%	42%
<b>Casca de arroz</b>	22%	14%	12%	2%	39%

Fonte: a própria autora 2014

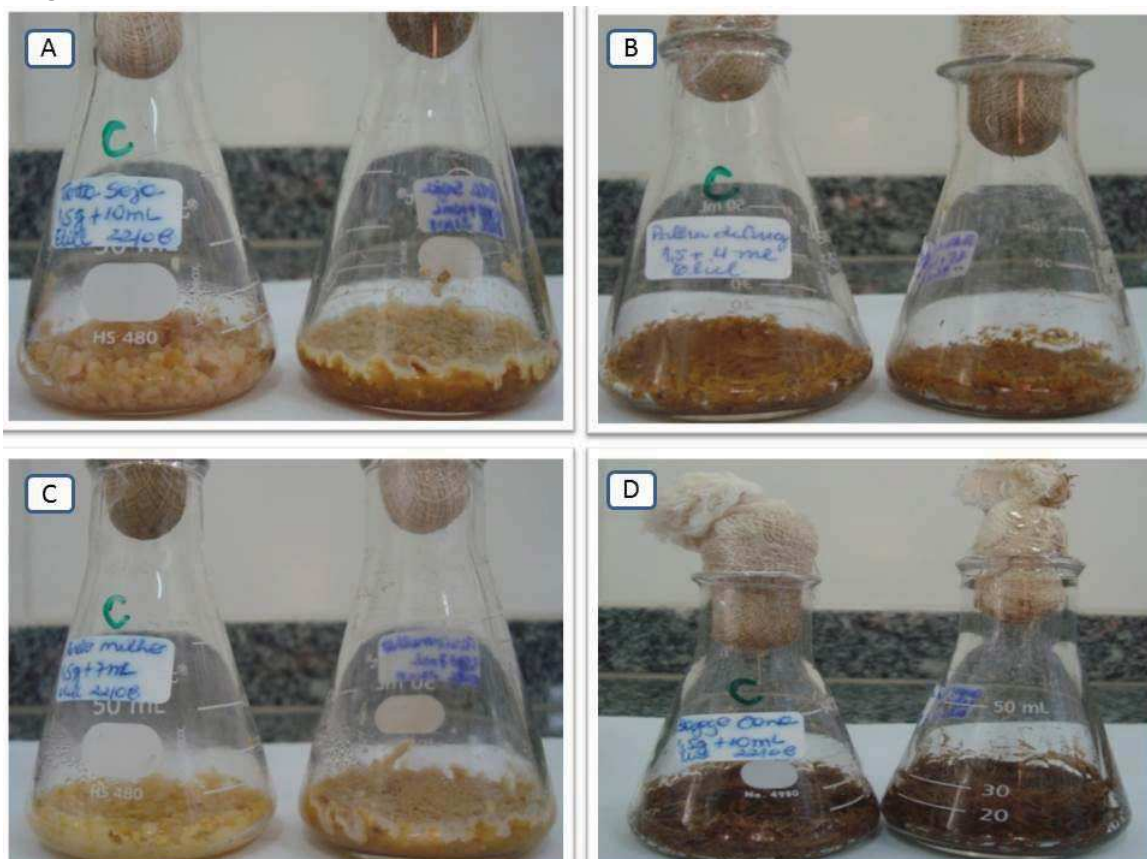
O farelo de soja que contém 47 % de proteínas (Tabela 19) é um substrato adequado para a produção de lipopeptídeos, pois a diversidade de aminoácidos presentes pode ser incorporada diretamente na porção peptídica

(PEYPOUX; MICHEL, 1992; BESSON; MICHEL, 1998; PEYPOUX; BONMATIN; WALLACH, 1999). O FS que é utilizado para formulação de ração animal, também pode ser substrato de baixo custo para FES.

## 5.2. AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DO *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b NOS RESÍDUOS FARELO DE SOJA (FS), FARELO DE MILHO (FM), CASCA DE ARROZ (CA) E BAGAÇO DE CANA (BC)

O aspecto dos cultivos do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b nos diferentes substratos lignocelulósicos (1,5 g de substrato, 4 dias de fermentação,  $28 \pm 2$  °C) é mostrado na Figura 10, que compara o frasco controle (sem inóculo) com o frasco cultivo de cada um dos resíduos. Pode se notar claramente o crescimento do microrganismo na superfície do FS (A) e em FM (B) e também é possível notar que o substrato após o desenvolvimento da bactéria escurece em comparação ao controle.

**Figura 10** - Aspecto dos cultivos preliminares em FES de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b cultivado nos resíduos FS (A), CA (B), FM (C) e BC (D), após 4 dias a  $28 \pm 2$  °C



Fonte: a própria autora 2014

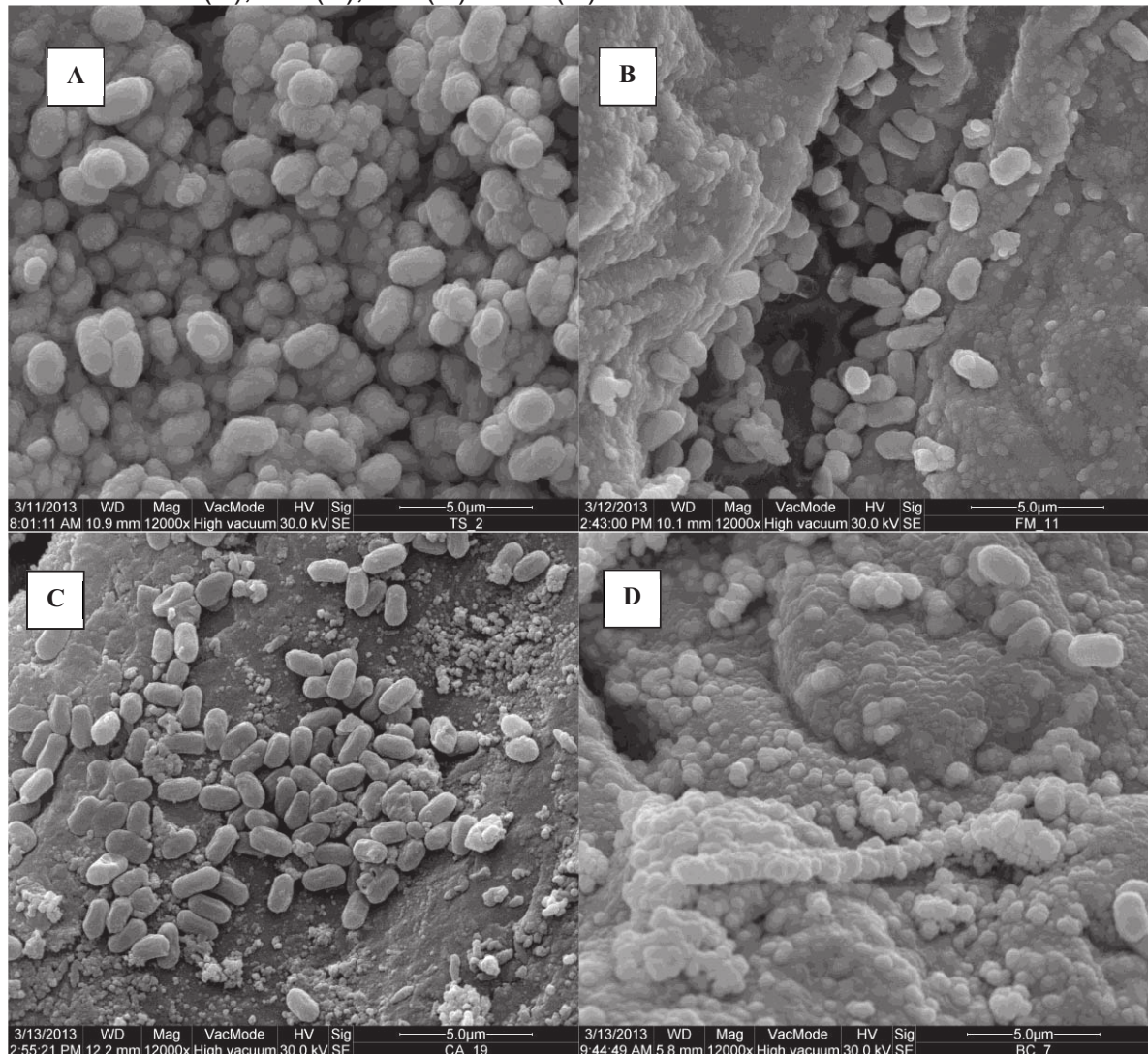
Nos cultivos com os resíduos CA (B) e BC (D) não foi possível visualizar o crescimento do microrganismo. Provavelmente a quantidade de proteínas presentes no FS 47 % (Tabela 19) no FM 12 % (Tabela 19) tenha sido fundamental para o seu desenvolvimento e os carboidratos presentes na CA 39 % (Tabela 19) no BC 61 % (Tabela 19) não estavam acessíveis e a quantidade de proteínas 2 % (Tabela 19) não tenha sido suficiente para o desenvolvimento microbiano.

O gênero *Bacillus* é relatado com produtor de diferentes lipopeptídeos a partir da utilização de diversos substratos lignocelulósicos (Mizumoto, Hirai e Shoda, 2006; Mizumoto e Shoda, 2007; Das e Mukherjee, 2007; Wang et al., 2008, Shih et al., 2008; Ano et al., 2009; Bugay et al., 2009; Zhu et al., 2012; Slivinski et al., 2012), o que confirma a importância deste estudo.

A confirmação do crescimento do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b nos referidos substratos foi determinada através de MEV. Para a obtenção das micrografias eletrônicas (MEV) foram recolhidos diretamente dos frascos de cultivo pequenas porções dos substratos fermentados. A Figura 10 apresenta as imagens com aumento de 12.000 X e é possível verificar que o microrganismo cresceu em todos os resíduos estudados, sendo que a maior concentração de células é visualizada em farelo de soja (10A). Provavelmente o alto teor de proteínas 47 % do FS (Tabela 19) tenha contribuído para o maior crescimento. É também interessante verificar que o formato das células em FS, FM e CA são semelhantes e contrastam com as imagens, obtidas em BC.

Ao compararmos a avaliação do crescimento apresentado na Figura 9 foi possível verificar que mesmo sem visualização do crescimento aparente nos resíduos, CA (C) e BC (D) o microrganismo foi capaz de se desenvolver nesses substratos como confirmado na CA (C) e BC (D) na Figura 11 embora de forma muito menos intensa.

**Figura 11** - Eletromicrografias de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b cultivado nos substratos: FS (A); FM (B); CA (C) e BC (D) com aumento 12.000X



Fonte: a própria autora 2014

A colonização dos substratos por *B. amyloliquefaciens* MO.04b foi determinada pela contagem do número de células viáveis (UFC/gss) foram plaqueadas as diluições decimais  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  os resultados determinados após 24 horas de incubação a  $28 \pm 2$  °C.

De acordo com a Tabela 20 foi possível determinar  $1.10^8$  UFC/g.s.s. nos substratos FS, FM e CA; em BC não houve desenvolvimento de células viáveis nas diluições avaliadas.

Nos extratos livres de células (ELC) destes cultivos foram também avaliados alguns parâmetros relacionados à capacidade de acesso do microrganismo aos substratos como: a concentração de açúcares totais solúveis

residuais, a concentração de açúcares redutores solúveis residuais e a concentração proteínas totais solúveis residuais (Tabela 20).

**Tabela 20** – Avaliação plaqueamento, açúcares totais, açúcares redutores e proteínas totais

Resíduos	UFC/gss		Açúcar Total g %		Açúcar Redutor g %		Proteína Total g %	
	Controle	Cultivo	Controle	Cultivo	Controle	Cultivo	Controle	Cultivo
<b>FS</b>	s/cres	1.10 <sup>8</sup>	3,5	0,3	0,1	0,09	8,4	31,4
<b>FM</b>	s/cres	1.10 <sup>8</sup>	13,2	26,1	0,7	3,8	1,2	2,6
<b>CA</b>	s/cres	1.10 <sup>8</sup>	0,02	0,01	0,07	0,05	1,4	1,4
<b>BC</b>	s/cres	ND	2,8	2,7	0,3	0,2	1,4	1,2

Fonte: a própria autora 2014

FS-farelo de soja; FM-farelo de milho; CA-casca de arroz; BC-bagaço de cana; s/cres - sem crescimento

Embora o número de células viáveis observados, (1.10<sup>8</sup> UFC/gss), tenha sido o mesmo nos resíduos FS, FM e CA ao avaliarmos os parâmetros AT, AR e PT constatamos que o *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b acessou de maneira bastante diferente os substratos.

No FS a concentração de AT e de AR apresentaram o mesmo comportamento no início do cultivo as concentrações desses açúcares era 3,5 e 0,1 g % respectivamente e após o período de incubação a concentração diminuiu para 0,3 e 0,09 g % respectivamente, mostrando o consumo desses açúcares. De maneira contrária a concentração de PT inicial era de 8,4 g % e no final do cultivo de 31,4 g % mostrando que o microrganismo foi capaz de promover o aumento das proteínas totais solúveis provavelmente pela liberação dessas do substrato farelo de soja.

No FM as concentrações de AT, AR e PT aumentaram para todos estes parâmetros que no início do cultivo eram 13,7; 0,7 e 1,2 g % e no final o cultivo as concentrações aumentaram para 26,1; 3,8 e 2,6 g % respectivamente.

Na CA as concentrações de AT e AR aumentaram para estes parâmetros que no início do cultivo eram 0,02 e 0,07 g % e no final o cultivo essas concentrações diminuíram para 0,01 e 0,05 g % respectivamente. A concentração de PT permaneceu inalterada, 1,4 g %.

No BC as concentrações dos parâmetros AT, AR e PT permaneceram quase que inalteradas iniciando com 2,8; 0,3 e 1,4 g % e finalizando com 2,7; 0,3 e 1,2 g % respectivamente, esses valores juntamente com a ausência

de crescimento mostra que este substrato não foi adequado para o cultivo do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b. Desta forma o BC excluído para os próximos experimentos.

Alguns substratos utilizados em cultivos de FES têm a tendência de compactar-se interferindo na transferência de calor e massa do sistema. Para aumentar a escala do processo, devem-se levar em conta as características que o substrato apresenta. Para processos de grande escala, é comum utilizar a aeração forçada, onde há um favorecimento do fornecimento de oxigênio e a subsequente remoção do calor metabólico. Para facilitar a passagem do ar, o substrato deve apresentar uma boa porosidade e não deve compactar durante o processo (MITCHELL; VON MEIEN; MITCHELL, 2003).

Segundo Ooijkaas (2000), alguns suportes inertes são sugeridos para serem utilizados como *bulking agent*, tais como vermiculita, perlita, amberlite, poliestireno, casca de arroz, argila, cânhamo e bagaço de cana. A utilização de um suporte inerte auxilia a diminuir a compactação que os substratos apresentam em fermentação em estado sólido, aumentando a transferência de massa e calor, assim como o crescimento do microrganismo e o conseqüente aumento da produção de biosurfactante.

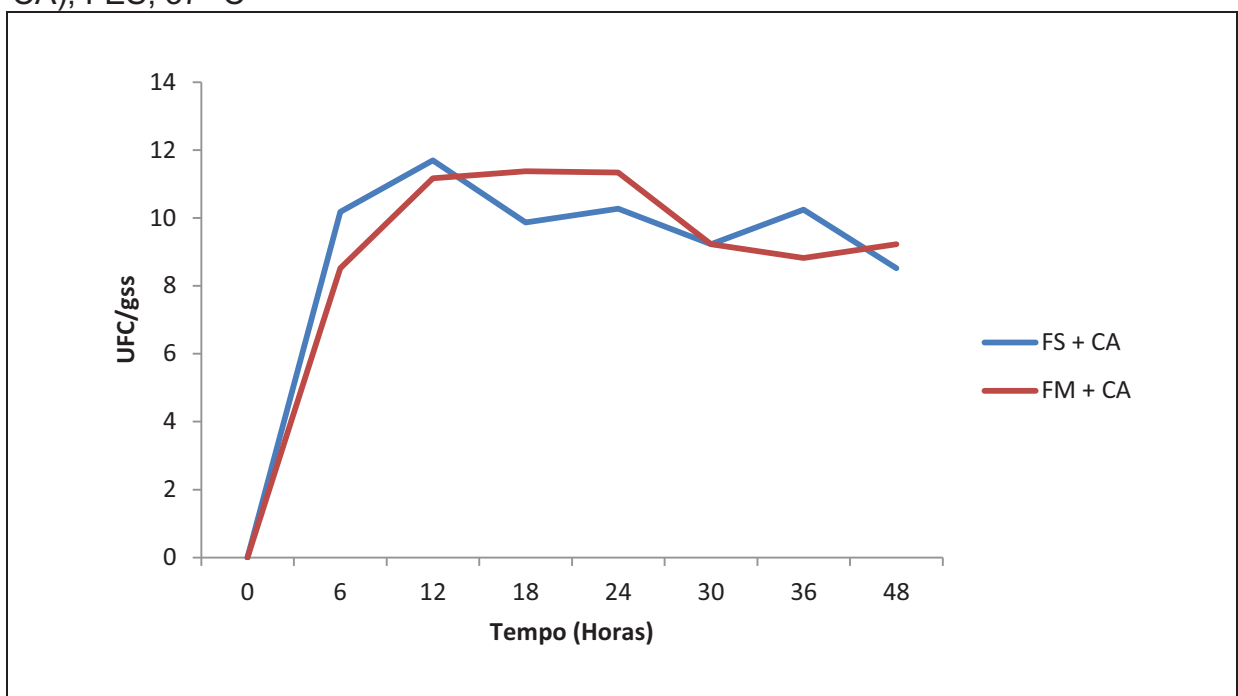
Zhu et al., (2012) obteve bons resultados para a produção de biosurfactante lipopetídeo por *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 em fermentação em estado sólido, com adição de casca de arroz como suporte inerte ao meio sólido baseado em farinha de soja.

Considerando-se os resultados obtidos, concluiu-se que FS e FM foram os melhores substratos para o cultivo de *B. amyloliquefaciens* MO.04b. Neste ponto do trabalho, optou-se pela utilização de misturas de substratos sólidos, o que promove condições necessárias para futuras produções de biosurfactantes em escala piloto, pois a utilização de FS e FM puros promovem a compactação do leito de fermentação, o que diminui a aeração do sistema e prejudica o crescimento microbiano. Assim, para os próximos experimentos, optou-se pela utilização de misturas entre FS + CA e FM + CA para avaliar o perfil de crescimento, tensão superficial, índice de emulsificação dos ELC dos cultivos de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b.

### 5.3. PERFIL DE CRESCIMENTO DE *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04B E PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS NAS MISTURAS FARELO DE SOJA MAIS CASCA DE ARROZ E FARELO DE MILHO MAIS CASCA DE ARROZ

A Figura 12 é apresenta o perfil de crescimento do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b nas misturas FS e FM adicionados de casca de arroz, foram determinados pela contagem UFC/g.s.s. entre 0 e 48 horas com intervalos de 6 horas de fermentação. Neste período foi possível verificar um pico de crescimento de  $1.10^8$  UFC/gss em 12 horas e a partir deste tempo, o desenvolvimento manteve-se relativamente constante até 48 horas.

**Figura 12** - Crescimento do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b nas misturas farelo de soja mais casca de arroz (FS + CA) e farelo de milho mais casca de arroz (FM + CA), FES, 37° C



**Fonte:** a própria autora 2014

FS = farelo de soja, CA = casca de arroz, FM = farelo de milho

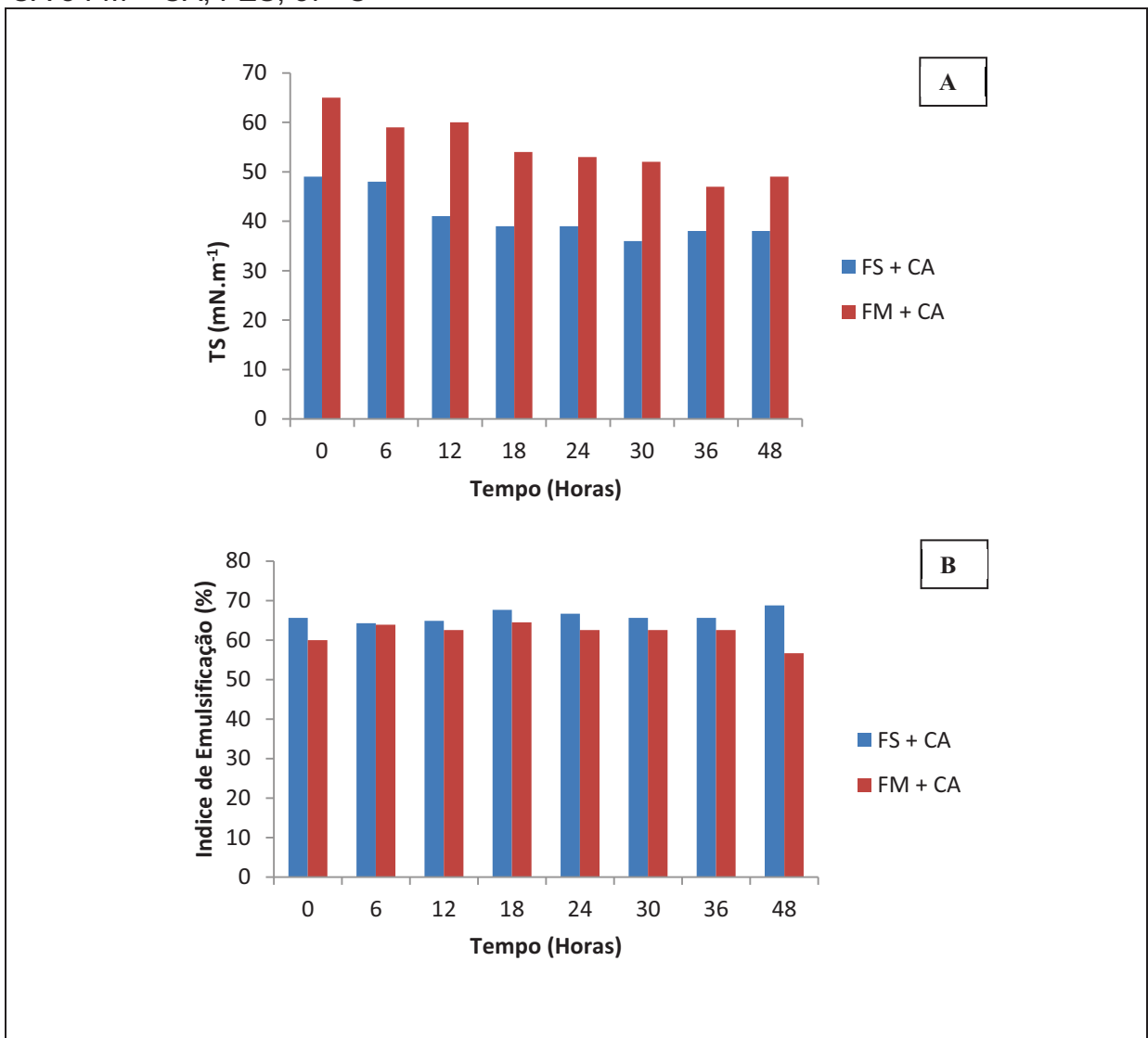
Nos extratos livres de células (ELC) dos cultivos obtidos do perfil de crescimento foram também efetuadas medidas da tensão superficial (TS). Esta medida é utilizada como critério primário para selecionar microrganismos produtores de biossurfactantes (YOUSSEF et al., 2004). O abaixamento da TS foi determinado pela comparação com o valor da tensão superficial da água que é de

aproximadamente  $72 \text{ mN.m}^{-1}$  a tensão superficial é uma importante propriedade apresentada pelos biossurfactantes (NITSCHKE et al., 2004; YOUSSEF et al., 2004). Também foram determinados os índices de emulsificação ( $IE_{24}$ ) propriedade que os biossurfactantes apresentam de emulsionar substratos insolúveis em meio aquoso e estabilizar a emulsão (TULEVA, IVANOV, CHRISTOVA, 2002).

Na Figura 13A, observa-se que a tensão superficial das amostras cultivadas em FS + CA iniciou seu abaixamento de TS a partir de 12 horas e valores entre  $30 \text{ mN.m}^{-1}$  e  $40 \text{ mN.m}^{-1}$  foram observados. O abaixamento mais pronunciado para a mistura de FS + CA foi em 30 horas com  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ . Faria (2010) quando estudou a produção de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual também determinou o abaixamento da tensão superficial da água de  $72 \text{ mN.m}^{-1}$  para  $33,4 \text{ mN.m}^{-1}$  com o lipopetideo surfactina C14 [Leu 7] e Barros e colaboradores (2002) relataram uma redução da TS da água de  $72 \text{ mN.m}^{-1}$  para  $27 \text{ mN.m}^{-1}$ , quando estudaram a produção de biossurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em resíduo de manipueira. Ainda é importante salientar que ao analisar os valores de TS na amostra do tempo 0 há um abaixamento da TS ( $50 \text{ mN.m}^{-1}$ ) em comparação com a água, porém este não é tão pronunciado. Os resultados da TS nas amostras correspondentes à mistura FM + CA apresentaram uma discreta diminuição da tensão superficial (Figura 13A) em comparação com a TS da água  $72 \text{ mN.m}^{-1}$  e comparando-se o valor da amostra no tempo 0 ( $65 \text{ mN.m}^{-1}$ ), com o valor que foi encontrado em 36 h ( $47 \text{ mN.m}^{-1}$ ), observa-se que houve uma pequena diferença o que reflete a um abaixamento relacionado à presença de biossurfactantes no meio.

O  $IE_{24}$  dos extratos obtidos nos cultivos de FS + CA e FM + CA não apresentaram resultados conclusivos e como pode ser visualizado na Figura 13B, no tempo 0, encontrou-se um valor de (61,32 %) para FS + CA e (60%) para FM + CA e a média das porcentagens obtidas é igual (66,13 %) para FS + CA e (59,07%) para FM + CA. O resultado obtido para FS + CA é superior ao obtido na amostra controle, mas isto pode evidenciar que interferentes com capacidade de emulsificação possam estar presentes no farelo de soja, pois, segundo Pedro (2012), quando o crescimento do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b foi avaliado em CA o ELC deste cultivo não apresentou capacidade emulsificante.

**Figura 13** - Determinação da tensão superficial-TS (A) e do índice de emulsificação-IE<sub>24</sub> dos ELC dos cultivos de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b nas misturas FS + CA e FM + CA, FES, 37° C



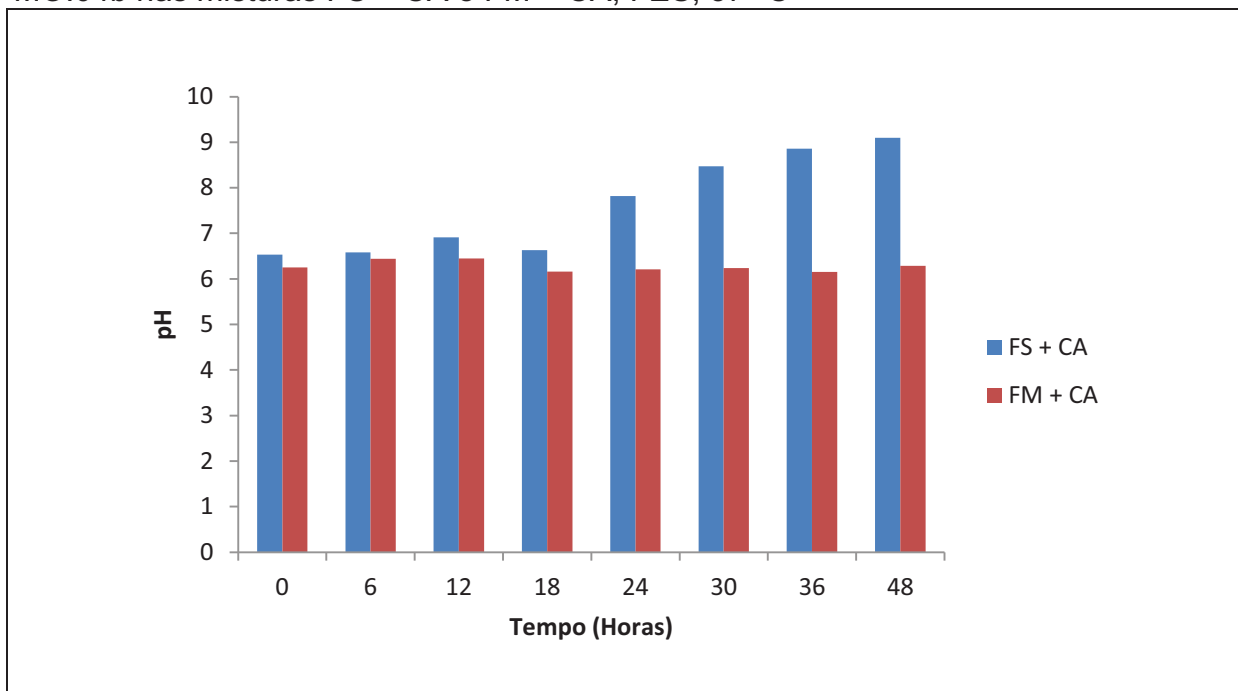
**Fonte:** a própria autora 2014

FS = farelo de soja, CA = casca de arroz, FM = farelo de milho

A Figura 14 apresenta os valores de pH finais nos tempos estudados, onde, na mistura FS + CA até 18 horas o pH se manteve constante em aproximadamente (6,66) quando comparado ao tempo 0 (6,53); e a partir de 24 horas o perfil foi crescente até 48 horas (9,1). Papi (2013) utilizando o *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b, em fermentação submersa, para produção de biossurfactantes, observou que o pH ótimo para crescimento do microrganismo e consequente produção do lipopetídeo surfactina foi 8. Segundo Lima e Silva et al. (2010) o aumento de pH durante a fermentação apresenta um efeito positivo na redução da tensão superficial e na estabilidade da emulsão.

Em comparação ao avaliarmos os cultivos de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b na mistura FM + CA (Figura 13) o perfil do pH final ficou praticamente inalterado (6,27) ao longo do tempo, embora o microrganismo seja capaz de crescer neste substrato. Provavelmente esta diferença ocorra, pois componentes da soja que são liberados durante o tempo de cultivo colaborem para o aumento do pH final do meio.

**Figura 14** - Determinação do pH nos ELC dos cultivos de *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b nas misturas FS + CA e FM + CA, FES, 37° C



**Fonte:** a própria autora 2014

FS = farelo de soja, CA = casca de arroz, FM = farelo de milho

Após a análise dos resultados, a mistura de FS + CA foi selecionado como melhor substrato para FES, e 36 horas como tempo de incubação mais adequado para a continuidade dos estudos de produção de lipopeptídeos *pelo* *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b.

#### 5.4. AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE CULTIVO PARA A PRODUÇÃO DE LIPOPEPTÍDEOS NA MISTURA FARELO DE SOJA (FS) E CASCA DE ARROZ (CA)

Definidos os resíduos mais importantes para a produção de lipopeptídeos FS e CA em gramas como *buking agent* foram avaliados e selecionados os parâmetros de cultivo: composição de sais da solução umedecedora, fontes de carbono e de nitrogênio presentes na solução umedecedora e pH inicial desta solução. Estes parâmetros podem ter influência significativa no rendimento final da produção de biossurfactantes/lipopeptídeos, pois, interferem diretamente no crescimento do microrganismo e na conseqüente produção de metabólitos.

##### 5.4.1. Avaliação e Seleção da Solução Umedecedora

A Tabela 21 mostra o efeito das duas soluções umedecedoras (MSM-1 e MSM-2) na produção de lipopeptídeos através das respostas: produção de lipopeptídeos (mg/gss) e abaixamento da tensão superficial ( $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ); o pH final também foi determinado como resposta secundária.

**Tabela 21** – Efeito das Soluções Umedecedoras na Produção de Lipopeptídeos na Mistura Farelo de Soja e Casca de Arroz, FES, 36 horas, 37° C

Substrato	pH	mg/g.s.s.	TS (mN/m)
<b>Casca de arroz + farelo de soja</b> <b>*MSM-1 Camilios-Neto (2010)</b>	7,78	33	40,0
<b>Casca de arroz + farelo de soja</b> <b>*MSM-2 Zhu et al., (2012)</b>	8,91	32	44,5

Fonte: a própria autora 2014

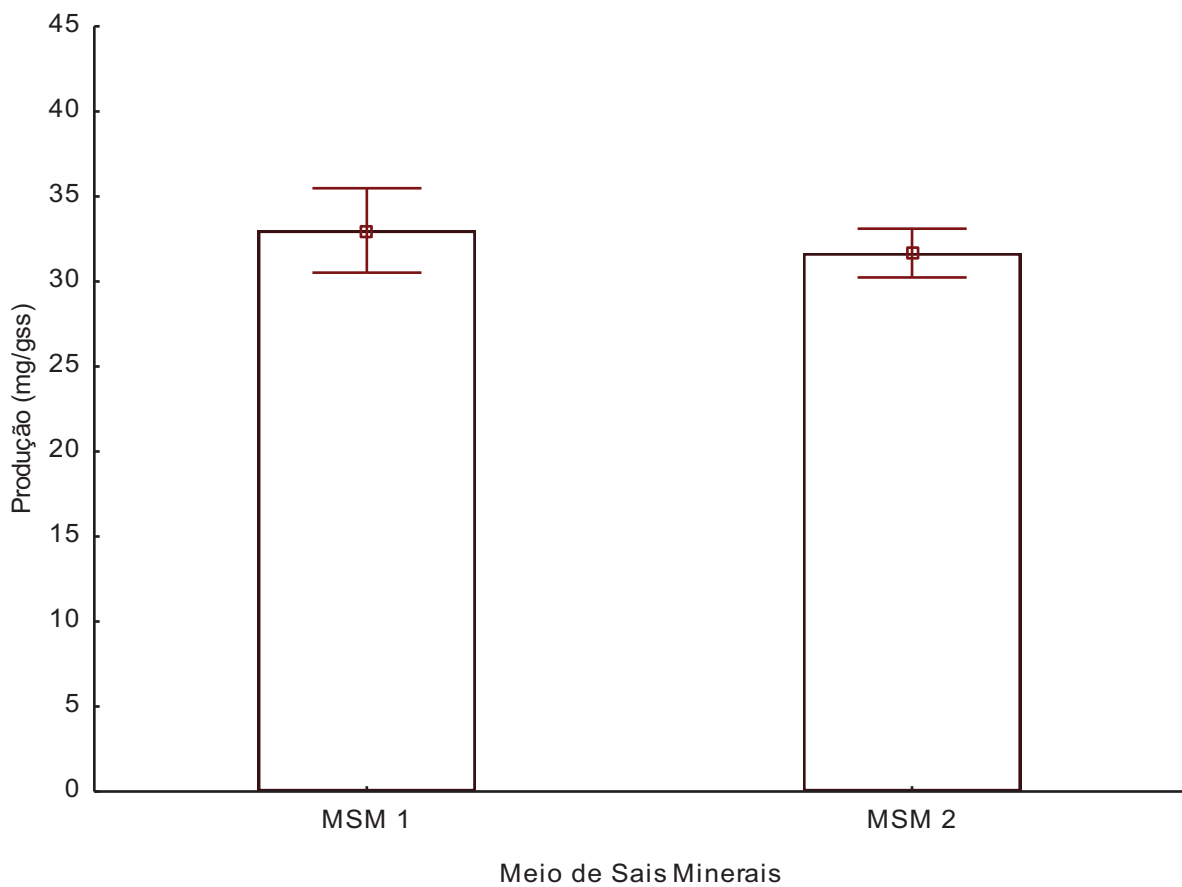
\*MSM - meio de sais minerais

Observou-se que o MSM-1 (CAMILIOS-NETO et al., 2008), promoveu o maior abaixamento da tensão superficial (40 mN/m), e a maior produção de lipopeptídeos foi de 33 mg/gss após 36 horas de cultivo. Os resultados sugerem que as diferentes concentrações de produtos contidos no meio de sais minerais influenciaram na produtividade assim como o seu abaixamento da tensão superficial.

O MSM-2 (ZHU et al., 2012) contendo sulfatos e aminoácidos, apresentou uma maior produção em relação ao MSM-1 (Figura 15). Entretanto com

o objetivo de diminuir o custo do processo bem como aumentar a produção de lipopeptídeos, o MSM-1 foi selecionado para experimentos posteriores como solução umedecedora.

**Figura 15** - Efeito das Soluções Umedecedoras MSM-1 e MSM-2 na Produção de Lipopeptídeos na Mistura FS e CA, FES, 36 horas, 37° C



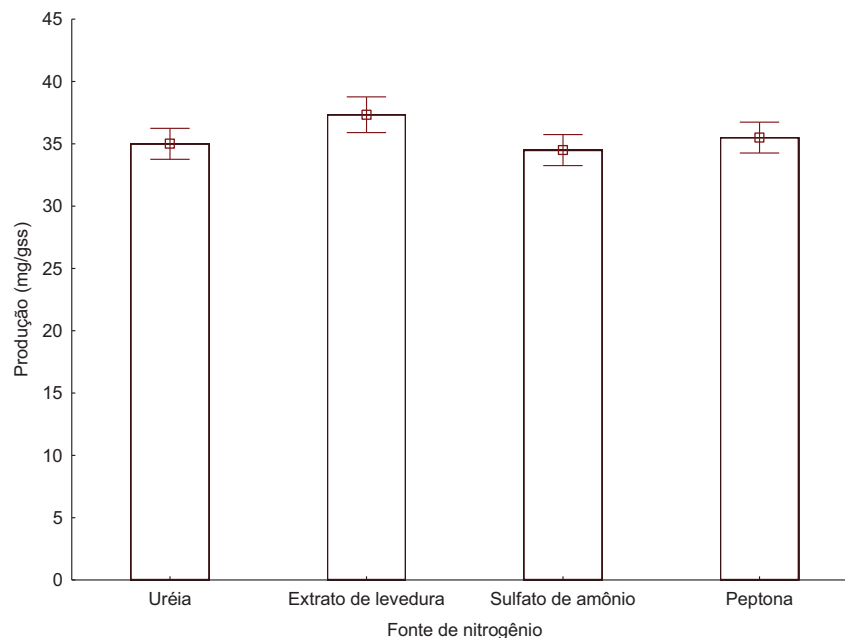
Fonte: a própria autora 2014

#### 5.4.2. Avaliação das Fontes de Carbono e Nitrogênio

O MSM-1 foi suplementado com diferentes fontes de nitrogênio, extrato de levedura, peptona, uréia e sulfato de amônio (Figura 16). O sulfato de amônio (fonte inorgânica) apresentou o menor rendimento de lipopeptídeos 34,5 mg/g.s.s., já as fontes orgânicas de nitrogênio, como a peptona (35,5 mg/g.s.s.), a

uréia (35 mg/g.s.s.) e o extrato de levedura (37,3 mg/g.s.s.), obtiveram melhores resultados de produção, assim como de um maior abaixamento da tensão superficial (Tabela 22), isso demonstra que as fontes de nitrogênio orgânicas foram mais eficientes e entre elas o extrato de levedura. Zhu, et al. (2012) avaliou as fontes de nitrogênio, peptona, extrato de levedura, sais de amônio (fosfatos, sulfatos, cloretos), nitratos e nitritos, e também encontrou o maior rendimento (49,90 mg/gss) para a produção de lipopeptídeos através do extrato de levedura.

**Figura 16** - Efeito de fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio para a produção de lipopeptídeos na mistura FS e CA, FES, 36 horas, 37° C



**Fonte:** a própria autora 2014

Em nível de 5 % de significância (Tabela 22), o extrato de levedura mostrou diferenças significativas em relação às demais fontes de nitrogênio analisadas. Apesar de uréia e peptona, obterem resultados de produção e abaixamento da tensão superficial semelhante (Tabela 22), para resultados de produção, tanto a utilização de uréia, quanto de peptona não obtiveram diferenças significativas, portanto, para a otimização da produção, extrato de levedura foi escolhido como fonte de nitrogênio adicional.

**Tabela 22** - Efeito da fonte de nitrogênio na solução umedecedora para a produção de lipopeptídeos na mistura farelo de soja e casca de arroz, FES, 36 horas, 37° C

Fonte de Nitrogênio	pH	mg/g.s.s.	TS (mN/m <sup>-1</sup> )
Extrato de Levedura	7,71	37,3 <sup>a</sup> ± 0,58	40,0 ± 0,73
Peptona	7,29	35,5 <sup>b</sup> ± 0,50	41,3 ± 0,15
Uréia	7,49	35,0 <sup>b</sup> ± 0,77	41,3 ± 0,17
Sulfato de Amônio	7,60	34,5 <sup>b</sup> ± 0,50	44,0 ± 0,50

Fonte: a própria autora 2014

Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças significativas em nível de 5 % de significância (p<0,05).

A fonte de carbono (Figura 17) é fator preponderante para o crescimento celular, e conseqüentemente um fator fundamental para a produção de biossurfactantes. A fim de se avaliar a influência de diferentes fontes de carbono que foram adicionadas na concentração de 0,15 g aos substratos sólidos e os cultivos incubados por 36 horas na temperatura de 37 ± 2 °C. Os resultados referentes às fontes de carbono analisadas (Tabela 23), não se observou diferenças de rendimento entre glicose, sacarose e glicerol. A Tabela 23, no entanto mostra em nível de 5 % de significância diferenças no abaixamento da tensão superficial, onde o glicerol apresenta um abaixamento de tensão superficial de 35 mN/m.

**Tabela 23** – Efeito da fonte de carbono na solução umedecedora para a produção de lipopeptídeos na mistura farelo de soja e casca de arroz, FES, 36 horas, 37° C

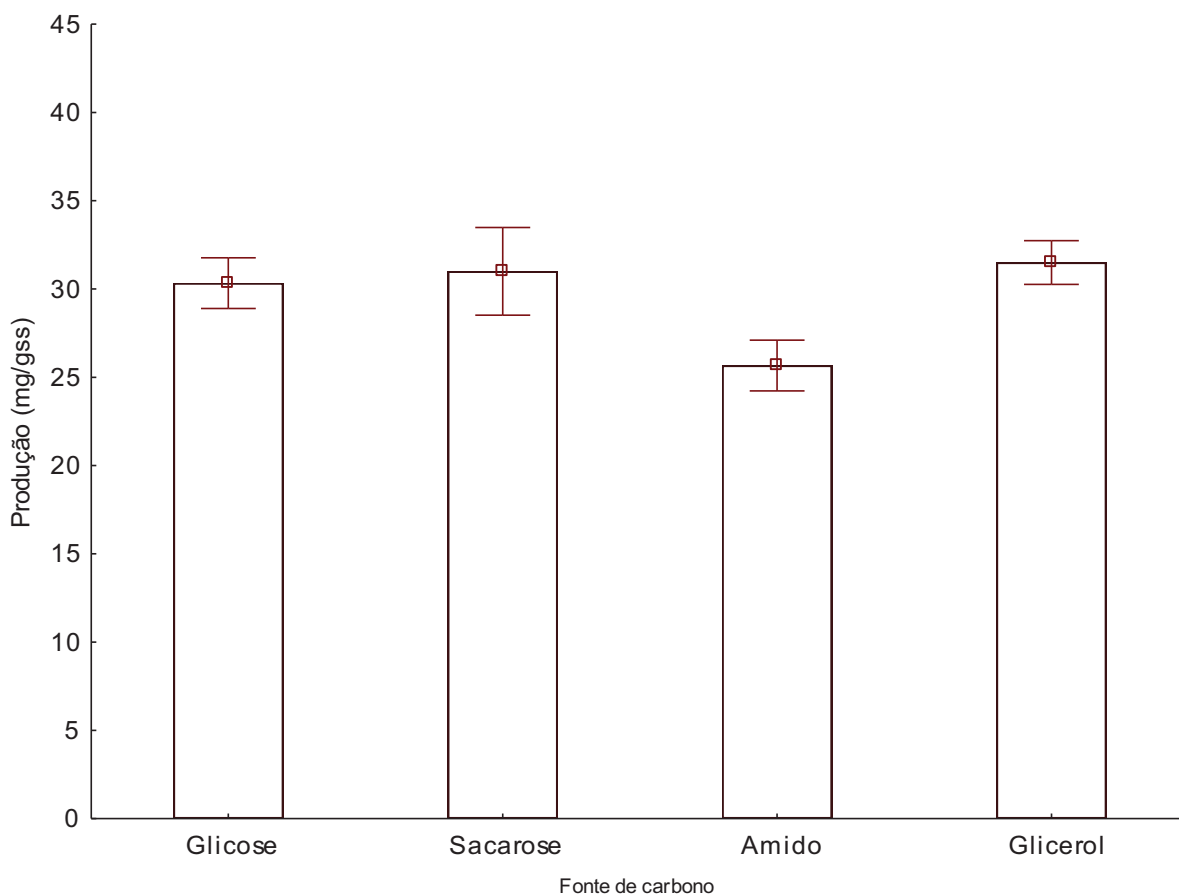
Fonte de Carbono	pH	mg/gss	TS (mN/m <sup>-1</sup> )
Glicerol	7,31	40,5 ± 1,00	35,0 <sup>a</sup> ± 0,28
Glicose	7,39	40,3 ± 0,58	36,4 <sup>a,b</sup> ± 0,75
Sacarose	7,76	31,0 ± 0,50	37,0 <sup>a,b</sup> ± 0,50
Amido	7,50	26,0 ± 0,86	37,7 <sup>b</sup> ± 0,29

Fonte: a própria autora 2014

Letras diferentes em uma mesma coluna indicam diferenças significativas em nível de 5% de significância (p<0,05).

Os resultados da TS obtidos para influência de glicose, sacarose e glicerol na produção de lipopetídeos mostram diferenças significativas em relação ao glicerol, este reduziu a tensão superficial da água de 72 mN.m<sup>-1</sup> para valores de 35 mN.m<sup>-1</sup>. Então glicerol foi selecionado como fonte de carbono para próximos experimentos.

**Figura 17** - Efeito de diferentes fontes de carbono para a produção de lipopeptídeos na mistura FS e CA, FES, 36 horas, 37° C

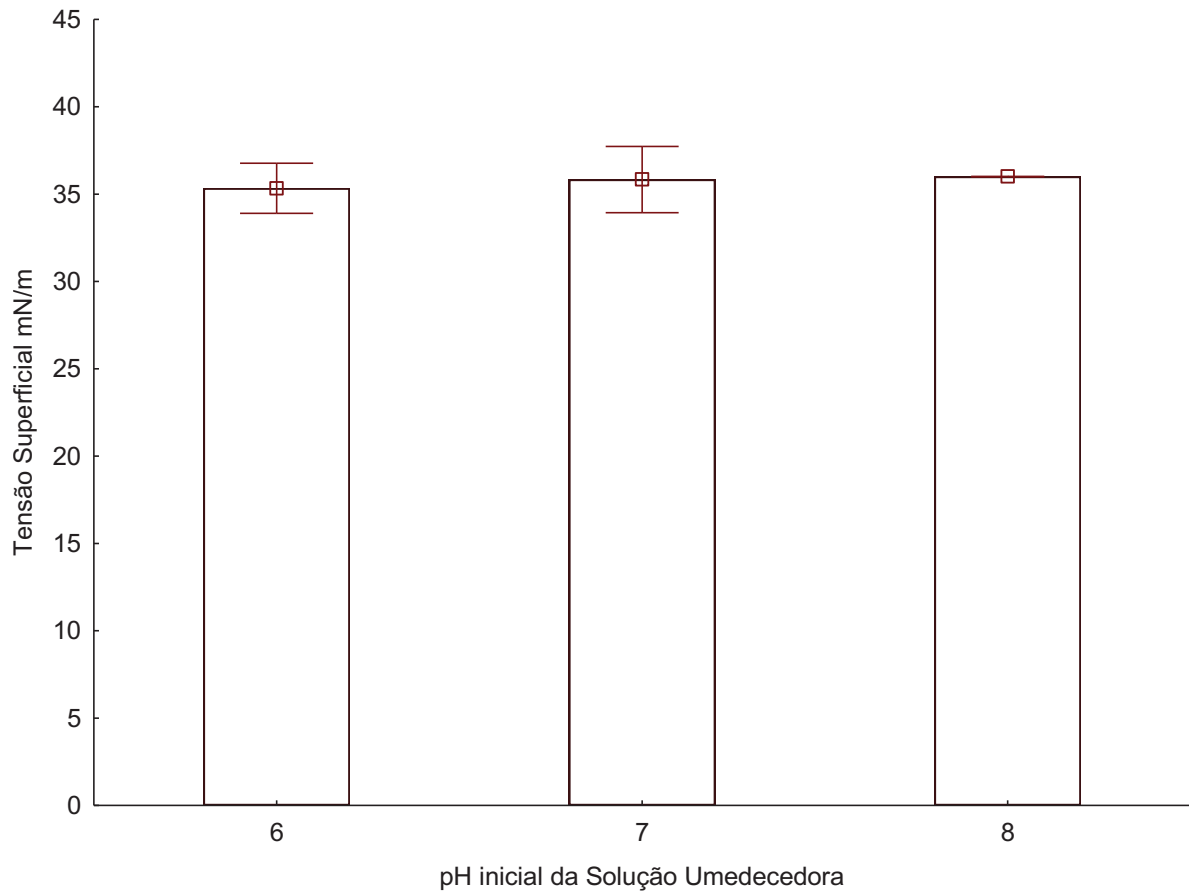


Fonte: a própria autora 2014

#### 5.4.3. Avaliação do pH inicial

O pH da solução umedecedora suplementado com glicerol e extrato de levedura também foi avaliado. A Figura 18 mostra que a variação de pH inicial da solução umedecedora não mostrou diferença significativa de produção para o lipopeptídeo. Considerando isso, para continuação do trabalho, optou-se por utilizar o pH 6 para realização dos experimentos de otimização.

**Figura 18** - Efeito do pH inicial para o meio MSM-1 para a produção de lipopeptídeos na mistura FS e CA, FES, 36 horas, 37° C



Fonte: a própria autora 2014

### 5.5. ANÁLISE EXPLORATÓRIA PARA A OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO LIPOPEPTÍDEOS POR PLANEJAMENTO FATORIAL E ANÁLISE POR METODOLOGIA DE SUPERFÍCIE DE RESPOSTA

Após a seleção e avaliação dos parâmetros de cultivos, foi elaborado um planejamento fatorial para verificar a interação que estes parâmetros apresentam na melhora e eficiência da produção, já que possuem influência significativa no crescimento celular e conseqüentemente na produção de metabólitos específicos (NAJAFI, et al., 2010, 2011). Então, a fim de otimizar o meio de cultivo para produção de lipopetideos por fermentação em estado sólido foram realizados planejamentos experimental do tipo Box-Behnken (1960).

### **5.5.1. Primeira Rodada de Experimentos: Planejamento Fatorial Box-Behnken 3<sup>4</sup>**

A análise de variância dos dados obtidos na primeira rodada de experimentos mostrou que o modelo proposto não foi significativo em nível de 5 %, apresentando um baixo valor de  $R^2$ , que indica a explicação de somente 59,45 % da variância, logo este modelo não pode ser utilizado para fins preditivos. A otimização das variáveis dependentes e independentes mostra que há possibilidade de fixar a variável casca de arroz, e que as variáveis, farelo de soja, extrato de levedura e glicerol necessitam terem seus níveis alterados. Para a próxima rodada de experimentos, a casca de arroz foi fixada no valor de 3,75 g, as outras variáveis independentes tiveram seus níveis alterados para 7,50 g de farelo de soja, 1,75 g de extrato de levedura e 1,75 g de glicerol.

### **5.5.2. Segunda Rodada de Experimentos: Planejamento Fatorial Box-Behnken 3<sup>3</sup>**

A análise de variância para a segunda rodada de experimentos mostrou que o modelo proposto foi significativo em nível de 5 %, apresentando um alto valor de  $R^2$  que indica a explicação de 89,37 % da variância, logo este modelo pode ser utilizado para fins preditivos. A otimização das variáveis dependentes e independentes, no entanto mostra que a variável independente, farelo de soja deve aumentar sua concentração para encontrar que a variável dependente encontre sua região de ponto ótimo. Para a próxima rodada de experimentos o nível da variável independente farelo de soja foi alterada para 5,00 g, e as variáveis extrato de levedura e glicerol permaneceram em 1,75 g.

### **5.5.3. Terceira Rodada de Experimentos: Planejamento Fatorial Box-Behnken 3<sup>3</sup>**

A análise de variância para a terceira rodada de experimentos mostrou que o modelo proposto é significativo em nível de 5 %, apresentando um baixo valor de  $R^2$  isto indica a explicação de 93,28 % da variância, logo este modelo pode ser utilizado para fins preditivos. A otimização das variáveis dependentes e

independentes, no entanto mostra que o farelo de soja, e o extrato de levedura devem diminuir suas concentrações para que a variável resposta encontre sua região de ponto ótimo. Para a próxima rodada de experimentos, a variável farelo de soja e extrato de levedura tiveram seus níveis alterados para 4,00 g, 1,50 g e 1,75 g respectivamente.

#### 5.5.4. Quarta Rodada de Experimentos: Planejamento Fatorial Box-Behnken $3^3$

Para a quarta rodada de experimentos foram investigadas o efeito de 3 variáveis independentes sobre a produção de lipopetídeos, para isso, utilizou-se um planejamento fatorial  $3^3$ , com 5 repetições no ponto central (Tabela 25) (Box e Behnken, 1960), as repetições no ponto central servem para estimar a variância do erro. As variáveis independentes estudadas (em 3 níveis) foram farelo de soja ( $X_1$ ), extrato de levedura ( $X_3$ ) e glicerol ( $X_4$ ) (Tabela 24).

**Tabela 24** - Variáveis independentes e níveis utilizados no planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$

Variáveis	Níveis		
	-1	0	1
$X_1$ = Farelo de soja (g)	2,50	4,00	5,50
$X_2$ = Extrato de levedura (g)	1,25	1,50	1,75
$X_3$ = Glicerol (g)	1,50	1,75	2,00

**Tabela 25** - Variáveis codificadas, decodificadas e resultados da produção de lipopetídeos para o planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$  com 5 pontos centrais

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas			Variável Resposta Produção mg/g.s.s.
	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$X_1$	$X_2$	$X_3$	
	Farelo de Soja	Extrato de Levedura	Glicerol	Farelo de Soja	Extrato de Levedura	Glicerol	
1	-1	-1	0	2,50	1,25	1,75	30
2	1	-1	0	5,50	1,25	1,75	35
3	-1	1	0	2,50	1,75	1,75	37
4	1	1	0	5,50	1,75	1,75	31
5	-1	0	-1	2,50	1,50	1,50	36
6	1	0	-1	5,50	1,50	1,50	34
7	-1	0	1	2,50	1,50	2,00	31
8	1	0	1	5,50	1,50	2,00	34
9	0	-1	-1	4,00	1,25	1,50	33
10	0	1	-1	4,00	1,75	1,50	43
11	0	-1	1	4,00	1,25	2,00	41
12	0	1	1	4,00	1,75	2,00	29
13 (C)	0	0	0	4,00	1,50	1,75	41
14 (C)	0	0	0	4,00	1,50	1,75	41

15 (C)	0	0	0	4,00	1,50	1,75	41
16 (C)	0	0	0	4,00	1,50	1,75	44
17 (C)	0	0	0	4,00	1,50	1,75	45

Na equação canônica representada (2), ajustada aos dados experimentais, a variável dependente  $\hat{Y}$  representa a produção de lipopetídeos e  $x_1$ ,  $x_2$  e  $x_3$ , representam as variáveis independentes, [farelo de soja], [extrato de levedura], [glicerol], respectivamente. Os termos com asterisco são significativos em nível de 5 %. Em adição todos os termos significativos exceto as interações entre farelo de soja e extrato de levedura e extrato de levedura e glicerol, apresentam coeficientes positivos, indicando que eles influenciam positivamente a produção de lipopetídeos em fermentação em estado sólido. Os termos significativos apresentaram baixos valores de p variando de 0,01 % para o termo quadrático de farelo de soja ( $x_1$ ) até 1,10 % para o glicerol ( $x_3$ ) quadrático e para a interação binária entre farelo de soja e glicerol, indicando uma grande influência destes produtos na produção de lipopetídeos por fermentação em estado sólido.

$$\hat{Y} = 42,41935^* - 0,16149x_1 - 6,03729^*x_1^2 + 0,06090x_2 - 3,19639^*x_2^2 - 1,35779x_3 - 2,69071^*x_3^2 - 2,75432^*x_1x_2 + 1,28054x_1x_3 - 5,53226^*x_2x_3 \quad (2)$$

A análise de variância (Tabela 26) mostrou que o modelo proposto é significativo em nível de 5 %, apresentando um elevado valor de  $R^2$  ajustado, indicando que ele consegue explicar 95,8 % da variância e, além disso, o desvio da regressão, desconsiderando os termos de interação farelo de soja e glicerol, e os termos extrato de levedura e glicerol, foi de 86,5 %, indicando que o modelo pode ser utilizado para fins preditivos.

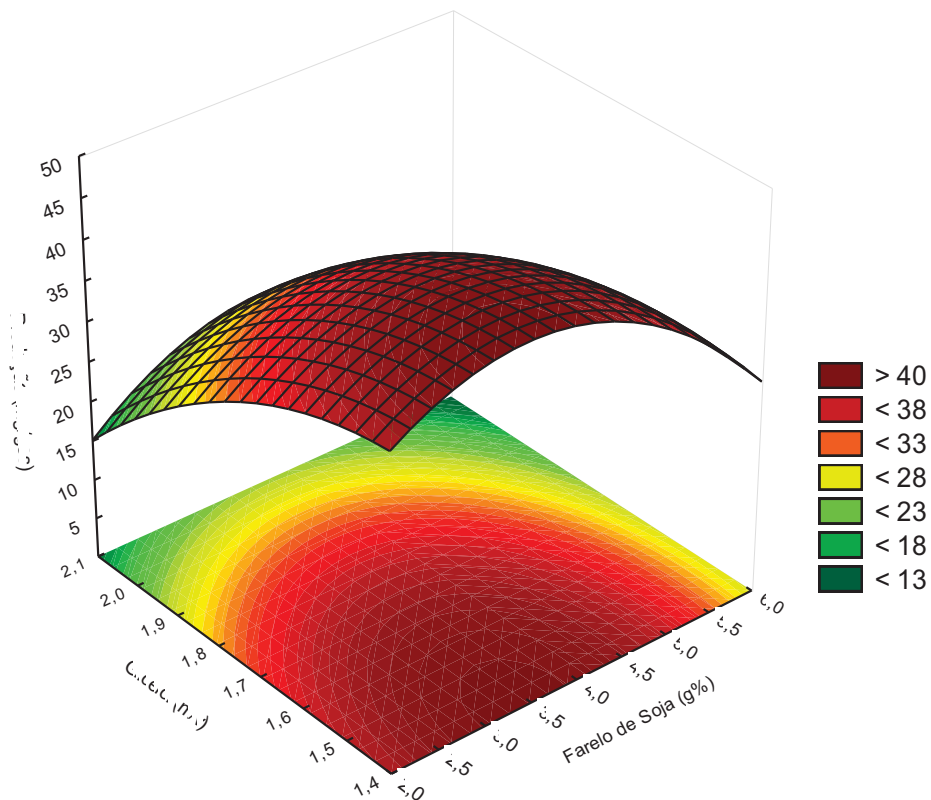
**Tabela 26** - Análise de variância dos dados obtidos pelo planejamento fatorial Box-Behnken  $3^3$

	GL	SQ	QM	Fcalc.	Ftab.
<b>Modelo</b>	9	423,3946	47,0438	11,9774 *	6,00
<b>Falta de ajuste</b>	3	2,8138	0,9379	0,2388 (NS)	6,59
<b>Erro puro</b>	4	15,7107	3,9277		
<b>Total</b>	16	441,9191			

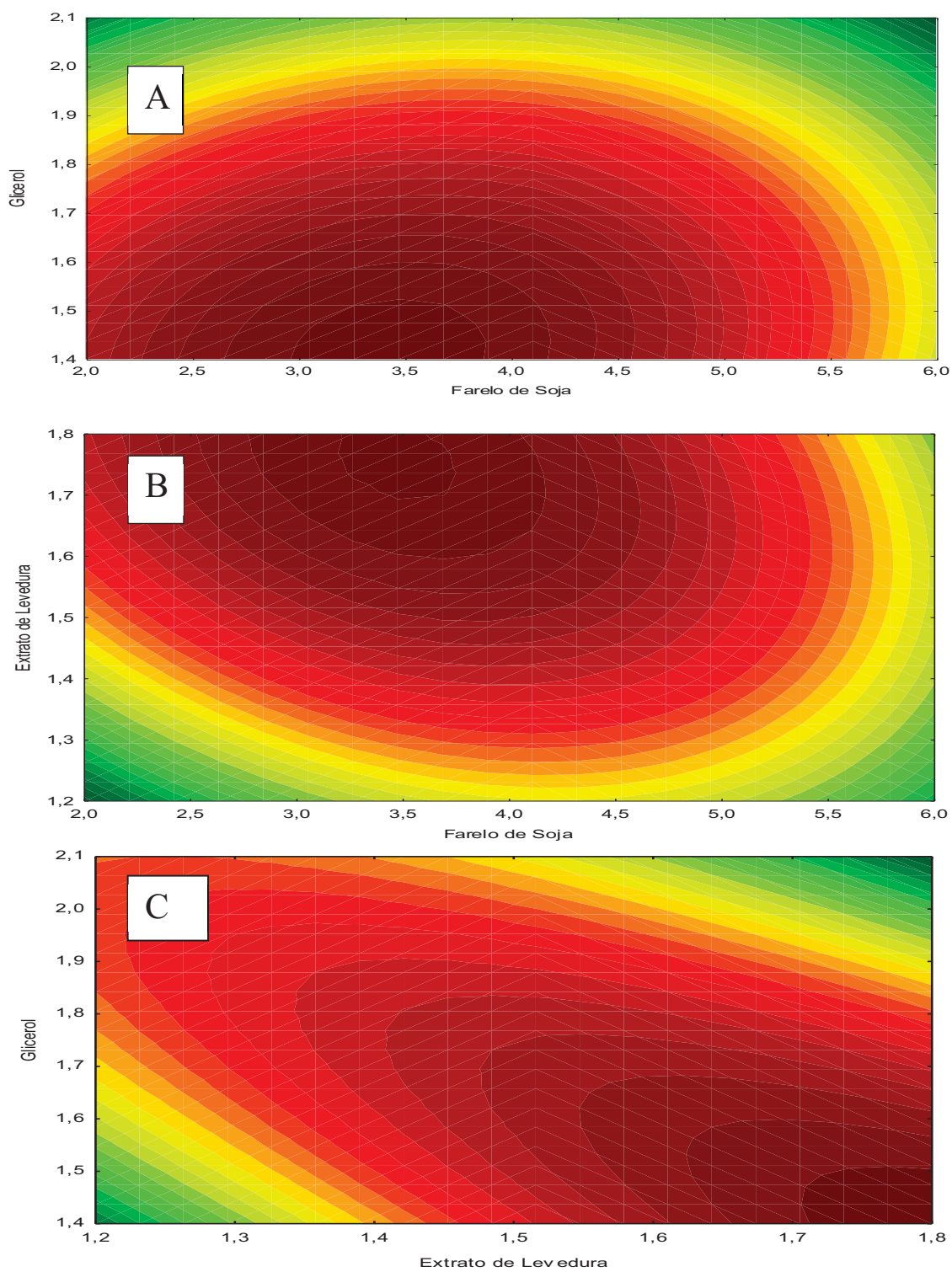
\* significativo para  $p < 0,05$ , Coeficiente de determinação ( $R^2$ ) = 0,95808, Falta de ajuste (p) = 0,865, (NS) não significativo

A região de combinação binária entre as variáveis “farelo de soja”, “glicerol” e “extrato de levedura” pode ser observada por meio da superfície de resposta (Figura 19) e das curvas de contorno apresentadas na Figura 20 (a,b,c) para a variável dependente “produção”. Os pontos que levam ao máximo do rendimento, 44,072 mg/gss, correspondem a uma concentração de 3,25 g de farelo de soja, e 1,75 g de extrato de levedura e 1,50g de glicerol, estando farelo de soja e extrato de levedura fora da faixa experimental das variáveis independentes.

**Figura 19** - Superfície de resposta da produção de lipopetideos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em fermentação em estado sólido, fixando-se a concentração de extrato de levedura em 1,75 g. As variáveis independentes são o glicerol 1,75 g e o farelo de soja 4,00 g (nesta figura foram utilizados os valores originais das variáveis). A variável resposta é a produção de lipopetideos em 36 horas de cultivo é expressa em mg/gss

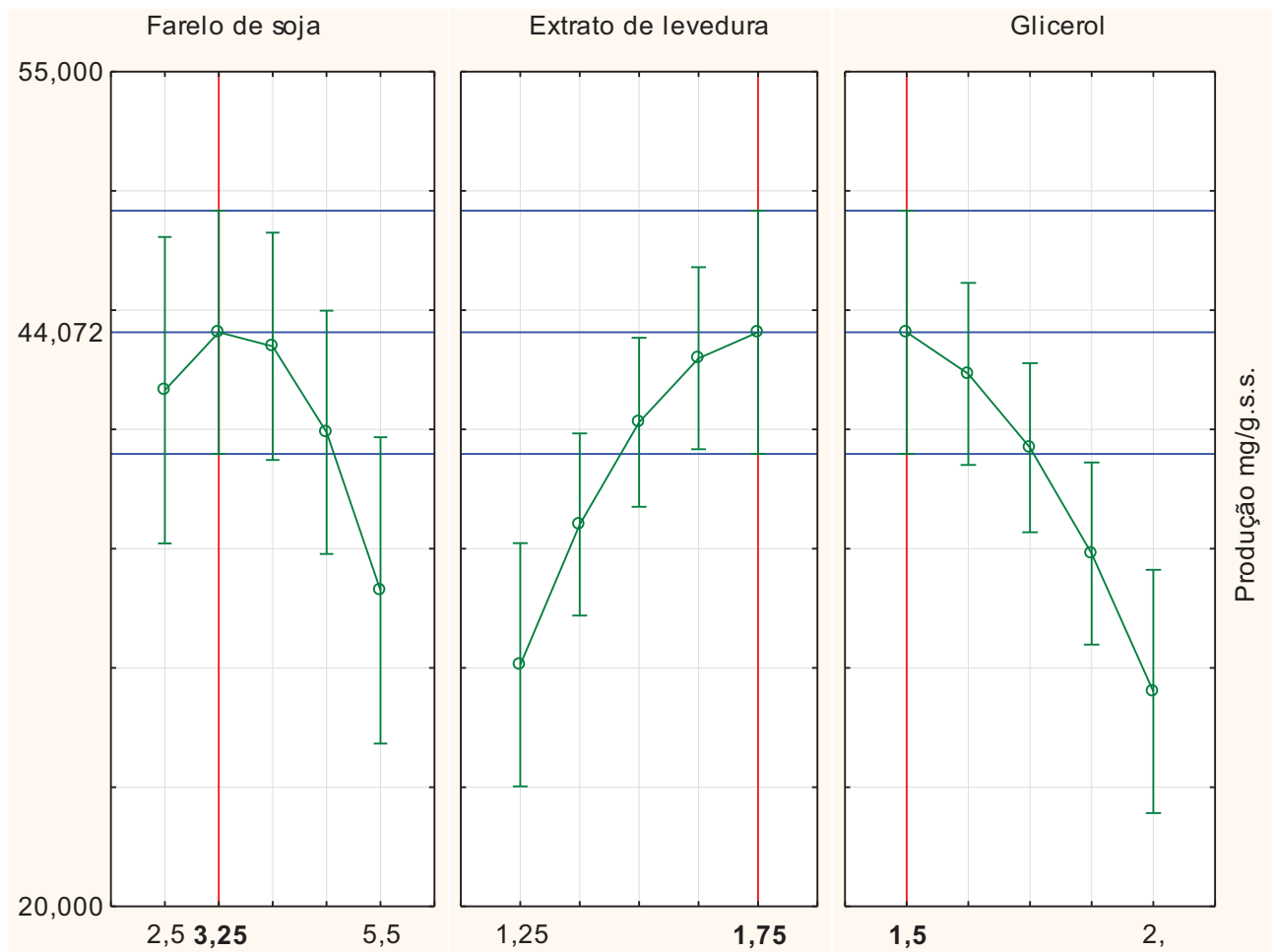


**Figura 20** - Curvas de contorno para a resposta “produção de lipopetídeos” em função de (A) glicerol, (B) extrato de levedura e (C) farelo de soja.



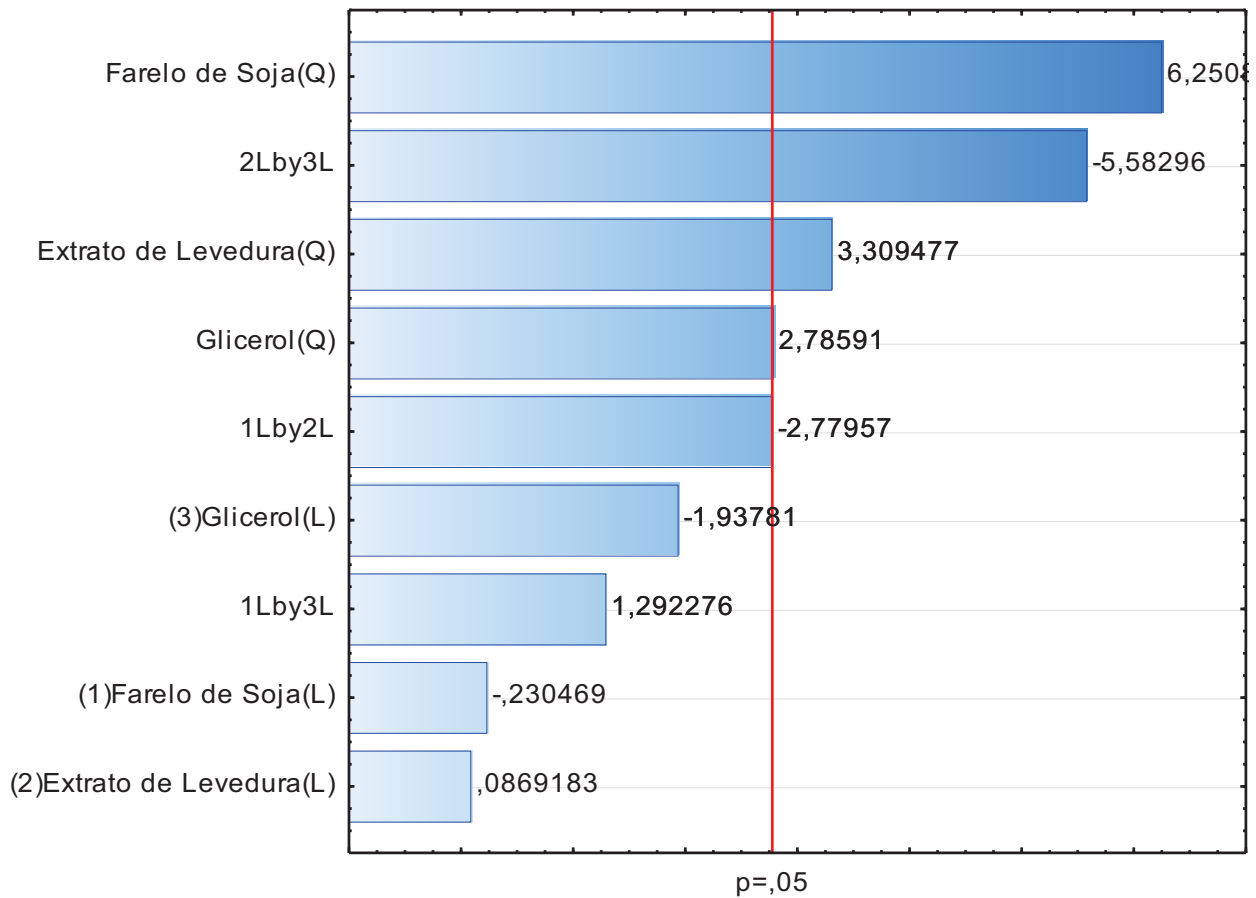
A Figura 21 mostra a otimização da equação preditiva que representa a produção de lipopetídeos com utilização de farelo de soja como meio principal, extrato de levedura e glicerol como fontes de nitrogênio e carbono adicionais respectivamente. Pode-se observar que o valor de produção máximo pode ser obtido quando se usa 3,25 g de farelo de soja, 1,75 g de extrato de levedura e 1,50 g de glicerol.

**Figura 21** – Parâmetros de desejabilidade estimada na condição máxima de produção dos lipopetídeos utilizando o software estatística 10.0



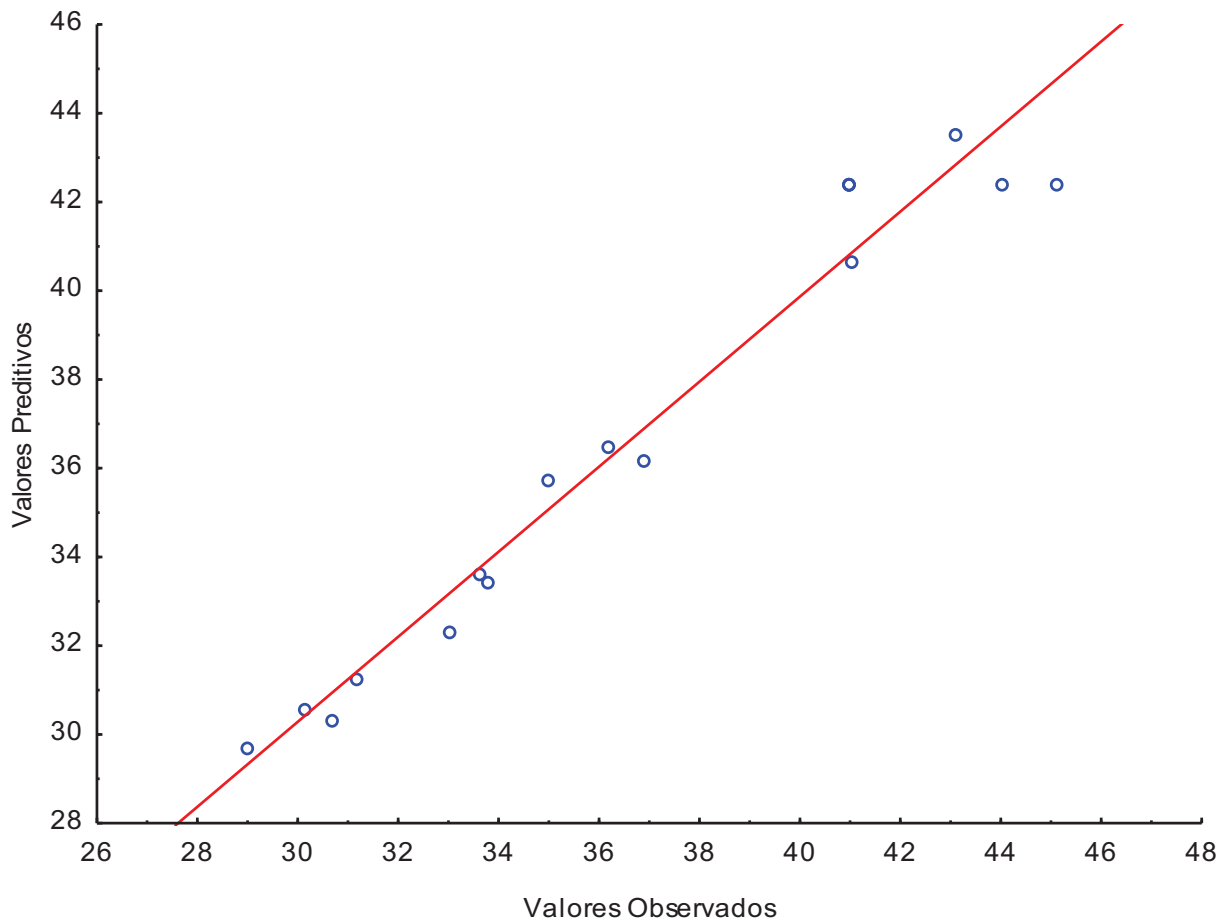
A Figura 22 apresenta o gráfico de Pareto contendo todos os termos mostra as variáveis mais significativas e sua ordem de importância no modelo preditivo obtido. Os valores ao lado do retângulo representam os valores da estatística do teste t.

**Figura 22** - Gráfico de Pareto mostrando a significância das variáveis farelo de soja, extrato de levedura e glicerol



Os valores previstos versus os valores observados podem ser visualizados na Figura 23, confirmando que o modelo proposto descreve bem os dados experimentais, visto que os pontos caem próximos a linha reta.

**Figura 23** - Valores preditivos versus valores observados



## 5.6. CARACTERIZAÇÃO DO LIPOPETIDEO PRODUZIDO POR *Bacillus amyloliquafaciens* MO.04B

### 5.6.1. Análise por Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-TF)

Bandas de absorção puderam ser visualizadas no espectro de infravermelho produzido por *Bacillus amyloliquafaciens* MO.04b (Figura 24) quando compactado em pastilhas de KBr. Foi possível observar a banda em aproximadamente  $3435\text{ cm}^{-1}$ , resultante do estiramento da ligação N-H presente nos peptídeos. A banda em aproximadamente  $1643\text{ cm}^{-1}$  foi devido ao estiramento da ligação N-CO, e em aproximadamente  $1552\text{ cm}^{-1}$ , da deformação angular da ligação N-H combinado com o estiramento da ligação C-N. As bandas de absorção nas

frequências de aproximadamente  $2923\text{ cm}^{-1}$ ,  $2856\text{ cm}^{-1}$ ,  $1466\text{ cm}^{-1}$  e  $1402\text{ cm}^{-1}$  são em decorrência do estiramento da ligação C-H, indicando a presença de uma cadeia alifática no biossurfactante extraído. A banda em  $1730\text{ cm}^{-1}$  está associada à absorção do grupo carbonila presente na lactona (Tabela 26).

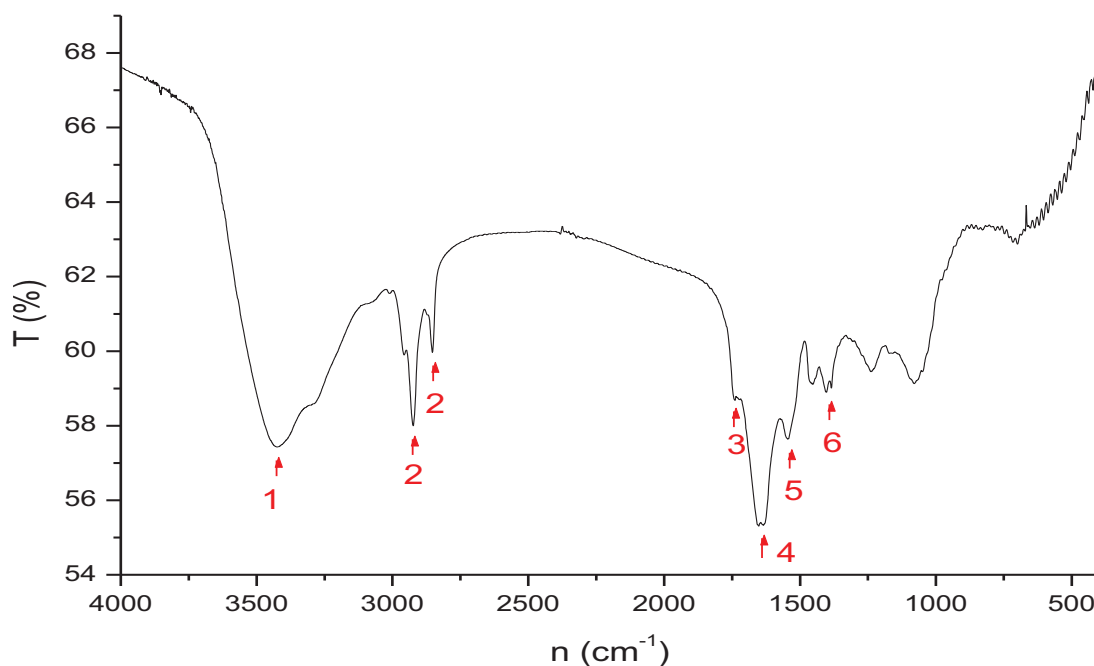
As informações obtidas a partir da análise no infravermelho são indicativas da presença de um ou mais biossurfactantes com natureza lipopeptídica. Os surfactantes lipoprotéicos, incluindo surfactina, iturina, fengicina, liquenisina, micosubtilisina e bacilomicina, produzidos por espécies de *Bacillus* são talvez os mais conhecidos por suas atividades antibióticas (MAIER, 2003; STELLER; VALTER, 2000). Esses compostos se caracterizam pela presença de peptídeos ligados a ácidos graxos com os aminoácidos dispostos em uma estrutura cíclica (MAIER, 2003).

Estes resultados mostram que o biossurfactante possivelmente possui uma porção alifática e um grupo peptídico em sua estrutura química. Oliveira e colaboradores (2013) encontraram picos semelhantes para biossurfactante extraído de *Bacillus subtilis* LAMI005, sendo o espectro comparado com um padrão de surfactina (Sigma-Aldrich, 95 % de pureza). Os autores chegaram à conclusão que o biossurfactante extraído se tratava de surfactina.

**Tabela 27** - Representação das bandas obtidas no espectro de infravermelho

1	3435	Estiramento N-H
2	2923 – 2856	Estiramento C-H
3	1730	Estiramento O-C=O (lactona)
4	1643	Estiramento N-CO
5	1552	Deformação angular N-H
6	1466; 1402	Estiramento C-H

**Figura 24** - Espectro infravermelho do lipopetideo produzido por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b



### 5.7. RMN e Espectrometria de Massa: caracterização do Lipopetideo Produzido por *Bacillus amyloliquafaciens* MO.04b

As análises de caracterização obtidas através do RMN e Espectrometria de Massa apresentaram resultados inconclusivos, isto pode ser devido ao fato de que as amostras necessitem ainda de uma purificação, pois a produção de biossurfactante/lipopetideo por fermentação em estado sólido apresenta a presença de alguns interferentes em seu extrato, avaliação que deve ser feita em próximos estudos.

## 6. CONCLUSÕES

- Os melhores substratos para o crescimento do *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b foram o farelo de soja e o farelo de milho onde foi possível visualizar a grande proliferação celular na superfície do meio;
- Os substratos farelo de soja e farelo de milho foram também os substratos mais acessados pelo microrganismo de acordo com as concentrações de açúcares totais (AT) e das proteínas totais (PT) residuais solúveis determinadas nas amostras controle e cultivos. Em farelo de soja houve um aumento de 3,7 vezes do valor inicial (8,4 g% para 31,4 g%) nas proteínas totais e em farelo de milho um aumento de 2 vezes do valor inicial (13,2 g% para 26,1 g%) nos açúcares totais;
- A mistura farelo de soja e casca de arroz foi selecionada para a produção de lipopeptídeos, pois, os extratos dos cultivos nessa mistura apresentaram os menores valores de tensão superficial  $30 \text{ mN.m}^{-1}$ ;
- Os parâmetros de cultivo foram selecionados quanto a produção de lipopeptídeos foram: MSM-1 melhor solução umedecedora (33 mg/gss), extrato de levedura melhor fonte de nitrogênio (37,5 mg/gss), glicerol como melhor fonte de carbono (35 mg/gss) e pH inicial da solução umedecedora;
- A otimização da produção de lipopeptídeos, 44 mg/gss, foi alcançada na quarta rodada de planejamentos fatoriais utilizando as seguintes condições 3,25 g de farelo de soja, 3,75 g de casca de arroz, 1,75 g de extrato de levedura e 1,5 g de glicerol;
- A caracterização dos lipopeptídeos produzidos por IV-TF sugeriu a presença de surfactina na amostra, pois, o perfil obtido dessa amostra foi bastante semelhante com o perfil do padrão de surfactina obtido por esta mesma metodologia;

- As análises de RMN e de Espectrometria de massa não foram conclusivas, provavelmente pela complexidade da amostra indicando a necessidade de estudos de purificação.

## REFERÊNCIAS

- ABOUSEOUD, M., MAACHI, R., AMRANE, A., BOUDERGUA, S., NABI, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination** v. 223, p. 143–151. 2008
- Aldrich, S. (2011). Disponível em:<"www.sigma-aldrich.com.">, acesso em out/2012.
- ANANDARAJ, B.; THIVAKARAN, P. Isolation and Production of Biosurfactant Producing Organism from Oil Spilled Soil. **Bioscience Technology**, v. 1, n. 3, 120-126, 2010
- ANNA, L.M.S.; SEBASTIAN, G.V.; MENEZES, E.P.; ALVES, T.L.M.; SANTOS, A.S.; PEREIRA, N. Jr.; FREIRE, D.M.G. Production of biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n.2, pp. 159–166, 2002.
- ANO, T.; JIN, G.Y.; MIZUMOTO, S.; RAHMAN, M.S.; OKUNO, K.; SHODA, M. Solid state fermentation of lipopeptide antibiotic iturin A by using a novel solid state fermentation reactor system. **Journal of Environmental Sciences Supplement**, p. 102-165, 2009
- AZUMA T., DEMAINE A. L. Interactions between gramicidin S and its producer, *Bacillus brevis*. **Journal Industrial Microbiology**, v.17,p. 56–61, 1996
- ANTUNES, A.A.; SILVA, M.L.R.B.; SILVA, C.A.A.; CAMPOS-TAKAKI, G.M. Characterization of *Chromobacterium Violaceum* isolated from Paca River, Pernambuco, Brasil. **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, n.1, p.48-55, 2006.
- ARIMA, K., KAKINUMA, A., TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptide lipid surfactante produced by *Bacillus subtilis*, isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation, **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 31, p. 488-494, 1968.
- ASSELINEAU, C.; ASSELINEAU, J. Trehalose containing glycolipids. **Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids**, v. 16, p. 56-99, 1978.
- BANAT, I.M.; MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl Microbiol Biotechnology**, v.53, p. 495-508, 2000.
- BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; MARÓSTICA-JUNIOR, M.R.; PASTORE, G.M. Surfactina: Propriedades Químicas, Tecnológicas e Funcionais para Aplicações em Alimentos. **Química Nova**, v. 30, n.2, p.409-414, 2007.
- BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G.M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manipueira. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, p. 979-985, 2008.

- BATALHA, M.O. **Sistemas Agroindustriais: definições e correntes metodológicas**; In: Batalha M.O. (coord.); "Gestão Agroindustrial"; vol I; 2a. ed.; Ed. Atlas S.A.; São Paulo; 1999, 47p.
- BATALHA, M.O.; SCARPELLI, M. Gestão Agroindustrial e Tecnologia da Informação: Sugestões para uma Agenda de Pesquisa. Anais do Workshop Agrosoft – O Agronegócio na Sociedade da Informação. Brasília-DF, 2002
- BEEBE, J. L.; UMBREIT, W. W. Extracellular Lipid of *Thiobacillus thiooxidans*. **Journal of Bacteriology**, v.108, n.1, p. 612-614, 1971.
- BENICASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie van Leeuwenhoek**, 85:1-8, 2004.
- BERTRAND, J.C.; BONIN, P.; GOUTX, M.; GAUTHIER, M.; MILLE, G. The potential application of biosurfactants in combating hydrocarbon pollution in marine environments. **Research in Microbiology**, v. 145, n. 1, 1994
- BESSON, F.; MICHEL, G. Biosynthesis of iturin and surfactin by *Bacillus subtilis*: evidence for amino acid activating enzymes. **Biotechnology Letters**, v. 14, p. 1013-1018, 1992.
- BOGNOLO, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. Colloids and Surfaces, **Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 152, n.1, p. 41-52, 1999
- BONILLA, M.; OLIVARO, C.; CORONA, M.; VAZQUEZ, A.; SOUBES, M. Production and Characterization of a new Bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 456-463, 2005
- BOX, G.; BEHNKEN, D. "Some new three level designs for the study of quantitative variables", **Technometrics**, v. 2, p. 455-475, 1960.
- BRANDÃO, M.S.B., Substâncias Tensoativas. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 8, p.30-34, 1999
- BRAUN, S.; KALINOWSKI, O.; BERGER, S. **150 and more basic NMR experiments**, VCH Weinheim, Germany, 2006
- BUGAY, C.; CAMILIOS-NETO, D.; MEIRA, J. A.; TIBURTIUS, E.; ZAMORA, P. P.; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. "Production of rhamnolipids in solid-state cultivation: Characterization, downstream processing and application in the cleaning of contaminated soils" **Biotechnology Journal**, v. 4, n. 5, p. 748-755, 2009
- BUENO, S. M. **Bactérias Produtoras de Biossurfactantes: Isolamento, Produção, Caracterização e Comportamento num Sistema Modelo**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto, SP. 89 p. 2008.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 50, p. 520, 1998.

CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Current Opinion in Microbiology**, v. 7, p. 262-266, 2004.

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**, v. 81, ed. 3, p. 441-448, 2008.

CASAS, J. A., GARCIA-OCHOA, F. "Sphorolipids production by *Candida bombicola*: Medium composition and culture methods." **Journal of Bioscience and Bioengineering** v.88, n.5, p. 488-494, 1999

CASTIGLIOLI, G.L.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.; Produção de Biosurfactante por *Aspergillus fumigatus* utilizando resíduos agroindustriais como substrato. **Química Nova**, v. 32, p. 63-71, 2011.

CAVALERO, D. A.; COOPER, D. G. - The effect of medium composition on the structure and physical state of sphorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. **Journal of Biotechnology**. v.103, n.1, p.31-41, 2003.

**CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA**. Disponível em :< <http://www.cepea.esalq.usp.br/>> acesso em 03/10/2012

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

CHANDRAN, P.; DAS, N. Characterization of Sphorolipid Biosurfactant Produced by Yeast Species Grown on Diesel Oil. **International Journal of Science and Nature**, v. 2, n. 1, p. 63-71, 2011

CHANTAWANNAKUL, P.; ONCHAROEN, A.; KLANBUT, K.; CHUKEATIROTE, E.; LUMYONG, S. Characterization of Proteases of *Bacillus subtilis* strain 38 isolated from Traditionally Fermented Soybean in Northern Thailand, **Science Asia**, Thailand, v. 28, p. 241-245, 2002.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I.B.; Microbial Surfactants and Their Use in Field Studies of Soil Remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

CHUANG, Y.H., LIU C.H., TZOU Y.M., CHANG J.S., CHIANG P.N., WANG M.K. Comparison and characterization of chemical surfactants and bio-surfactants intercalated with layered double hydroxides (LDHs) for removing naphthalene from contaminated aqueous solutions. **Colloids Surfactants** v. 366, p. 170-177, 2010

CIRIGLIANO, M C; CARMAN, G M. Isolation of a bioemulsifier from *Candida Lipolytica*. **Applied Environmental Microbiology** v 48 n.(4), p.747, 1984

COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V. "Obtenção e aplicação de biossurfactantes." **Vetor Rio Grande** v.13. p. 85-103, 2003

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Applied and Environmental Microbiology**,v. 53, n.2, p.224, 1987

COOPER, D.G.; ZAJIC, J.E.; Surface-active compounds from microorganism. **Advances in Applied Microbiology**, v. 26, p. 229-252, 1980.

COOPER, D.G.; PADDOCK, D.A. Production of a Biosurfactant from *Torulopsis bombicola* **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47,p. 173-176 1984.

COSTA, S. G. V. A. O.; NISTSCHCKE, M.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. N.; CONTIEIROS, **Journal Process Biochemistry**, v.41, p. 483-488, 2006.

COSTA, S. G. V. A. O. Estudo da Produção de Metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: Ramnolipídios e polihidroxicanoatos (PHA's). Rio Claro, Universidade Estadual Paulista. **Doutoramento em Ciências Biológicas, área Microbiologia Aplicada**: 135, 2010

COUTO, S. R.; SANROMÁN, M. A. Application of solid-state fermentation to food industry – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 76, p. 291-302, 2005.

DAS, K.; MUKHERJEE, A.K. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants, **Process Biochemistry**, v.42, p.1191-1199, 2007.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin, **Chemosphere**, v.72, p.1229-1234, 2008.

DAVILA A.M.; MARCHAL, R.; VANDECASTEELE, J.P. Sophrose lipid fermentation with differentiated substrate supply for growth and production phases. **Applied Microbiology Biotechnology** v.47, p. 496 - 501, 1997

DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C. "The production of Surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism." **Enzyme and microbial technology** v.25, p. 322 – 329, 1999.

DELEU, M.; PAQUOT, M. From renewable vegetables resources to microorganisms: new trends in surfactants. **Computers Rendus Chimie**. v. 7, p. 641–646, 2004.

DEMAJOROVIC, Jacques. A evolução dos modelos de gestão de resíduos sólidos e seus instrumentos. **Artigo do Caderno Fundap**, n. 20, mai/ago, 1996

DESAI, J.D.; DESAI, A.J. In: **Biosurfactants: production, properties, applications**; KOSARIC, N., ed. Marcel Decker: New York, 1993, cap. 3

DESAI, A.J.; BANAT, I.M. Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons. **Current Science**. v. 57, p. 500-501, 1997.

DEZIEL, E., LEPINE, F., DENNIE, D., BOISMENU, D., MAMER, O.A., VILLEMUR, R. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* strain 57RP grown on mannitol ornaphthalene. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.1440, p.244-252, 1999

DOMÍNGUEZ-MANZANO J; OLMO-RUIZ C; BAUTISTA-GALLEGO J; ARROYO-LOPEZ, FN; GARRIDO-FERNÁNDEZ A & JIMENÉZ-DIAZ, R. Biofilm formation on abiotic and biotic surfaces during Spanish style green table olive fermentation. **Internation Journal of Food Microbiology**, 157, p.230-238. 2012

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. **World Journal Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 61-69, 2003.

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, p.350–356, 1956.

EDWARDS, K.R., LEPO, J.E., LEWIS, M.A.. Toxicity comparison of biosurfactants and synthetic surfactants used in oil spill remediation to two estuarine species. **Marine Pollution Bulletin**. v.46, p.1309-1316. 2003.

FAN, L.T.; GHARPURAY, M. M.; LEE, Y. H. Cellulose Hydrolysis. Germany: **Springer-Verlag**, v.3, p.1-68, 1987.

FARIA, A.F. **Produção, purificação e caracterização química de biosurfactantes produzidos por *Bacillus subtilis* em glicerina residual**, Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos, UNICAMP), 2010.

FROST; SULLIVAN. Market Forecast: Microbial biosurfactants. **Industrial Bioprocessing**, p. 1, 2002

GHOJAVAND, H.; VAHABZADEH, F.; ROAYAEI, E.; SHAHRAKI, A.K. Production and properties of a biosurfactant obtained from a member of the *Bacillus subtilis* group (PTCC 1696). *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 324, p.172–176, 2008.

GOMES, M. **Gênero *Bacillus* spp.** Disponível em: <<http://www6.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Bacillus%204-2012-1.pdf>>. Acesso em: 26 set. 2012.

GORLACH-LIRA, K.; PEDROZA, M.L.V.; BURDZIEJ-POKOJSKA, A.; ROZYCKI, H.;

DAHM, H. Response surface analysis on the effect of temperature and pH on Growth and proteolytic activity of thermophilic *Bacillus sp.* **Brazilian Archives Biology and Technology**, v. 53, n. 5, Curitiba, Sept./Oct. 2010.

GRANZOTTO, G.; MARCELINO, P.R.F.; DEKKER-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 of Microbiology**.

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

HISATISUKA, K.; NAKAHARA, T.; SANO, N.; YAMADA, K. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*: its function in hydrocarbon fermentation. **Agricultural and biological Chemistry**, 35:686-692, 1971

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation – are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 301-306, 2005.

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

HOMMEL, R. K.; HUSE K. Regulation of sophorose lipid production by *Candida* (Torulopsis) apicola. **Biotechnology. Letters**. v.15, p.853–858, 1993.

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors Affecting Biosurfactant Production by Oil Degrading Aeromonas spp. **Isolated from a Tropical Environment Chemosphere**, v. 61, p. 985–992, 2005.

INOH, Y.; KITAMOTO, D.; HIRASHIMA, N.; NAKANISHI, M.; Biosurfactant MEL-A dramatically increases gene transfection via membrane fusion. **Journal of Controlled Release**. v. 94, p. 423-431, 2003

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo, p.523, 1985.

**INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA**. Disponível em:< <http://www.ibge.gov.br/home/>>, acesso em 26/09/2012.

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

JONES, D.B. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of protein. U. S., Dep. Agric., Circ., Washington, v.183, p.1-21, 1931.

KAKINUMA, A.; SUGINO, H.; ISONO, M.; TAMURA, G.; ARIMA, K. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 33, p. 973-976, 1969

KIM, S.H.; LIM, E.J.; LEE, J.D.; LEE, T.H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology Applied Biochemistry**. v.31, p. 249-253, 2000.

KIM, J., YOO, S., OH, D., KWEON, Y., PARK, D., LEE, C., GIL, G. Selection of a *Streptococcus equi* Mutant and Optimization of Culture Conditions for the Production of High Molecular Weight Hyaluronic Acid. **Enzyme and Microbial Technology**. v.19,p.440-445, 1996

KOSARIC, N.; CAIRNS, W.L.; GRAY, N.C.C. **In biosurfactants and biotechnology. Surfactant science series**. New York, 1987, cap. 11.

KRONEMBERGER, F. D. A. (2007). **Produção de Ramnolipideos por PA1 em biorreator com oxigenação por contactor de membranas**. COPPE. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro: 153.

Krüß. Processor Tensiometer K12. Hamburg. Manual, **1994**.

KUMAR, A.S.; MODY, K.; JHA, B. Evaluation of biosurfactant/bioemulsifier production by a marine bacterium. **Bulletin of Environmental contamination and Toxicology**, v. 79, p.617-621, 2007.

LANG, S. WULLBRANDT, D. Rhamnose lipids – biosynthesis, microbial production and application potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 51, p. 22-32, 1999.

LANG, S.; PHILIP, C.J. Surface-Active lipids in Rhodococci. **Antonie van Leeuwenhock**, 71:59-70, 1998.

LAUFENBERG, G.; KUNZ, B.; NYSTROM, M. Transformation of vegetable waste into value added products: (A) The upgrading concept; (B) Practical implementations. **Bioresource Technology**, v.87, n.2, p.167-198, 2003.

LEE, L.; TIN, S.; KELLEY, S.T. Culture-independent analysis of bacterial diversity in a child-care facility. **BioMedical Central**, v.7, n1-2, p. 12-20, 2002.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo: vol. 3; Edgard Blucher Ltda, p. 593, 2001.

LIMA e SILVA, T. A. de, MOURA de LUNA, J., MORAES FILHO, M. A., BASILE TAMBOURGI, E., CAMPOS TAKAKI, G. M. de. Produção de biossurfactante por *Pseudomonas fluorescens* UCP 1514 utilizando milhocina como substrato. **Exacta**. V. 8, n.1, p. 19-26, 2010

LIN, S.C. Biosurfactants: Recent Advances. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v.66, p.109, 1999

LIN, S.C.; SHAMAR, M.M.; GEROGIOU, G. Production and deactivation of biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. **Biotechnology Program**, v.9, p. 138-145, 1993.

LIU, X.; REN, B.; CHEN, M.; WANG, H.; KOKARE, C. R.; ZHOU, X.; WANG, J.; DAI, H.; SONG, F.; LIU, M.; WANG, J.; WANG, S.; ZHANG, L. Production and Characterization of a Group of Bioemulsifiers from the Marine *Bacillus velezensis* strain H3. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 87, p. 1881-1893, 2010 (a)

LIU, Z.F., ZENG, G.M., WANG, J. ZHONG, H. DING, Y., YUAN, X.Z.. Effects of monorhamnolipid and Tween 80 on the degradation of phenol by *Candida tropicalis*. **Process Biochem.** 45. 805-809, 2010 (b)

MAIER, R. Biosurfactants: Evolution and Diversity in bacteria. **Advances in Applied Microbiology**, 52:101-116, 2003.

MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA. S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 58, p. 428-434, 2002.

MANEERAT, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 675-683, 2005.

MATOS, A. T. de, Tratamento de Resíduos Agroindustriais. Fundação Estadual do Meio Ambiente. Universidade Federal de Viçosa. Maio, 2005. Disponível em <[http://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:02Uxef2I42wJ:scholar.google.com/+rela%C3%A7%C3%A3o+carbono+nitrogenio+res%C3%ADduos+agroindustriais&hl=pt-BR&as\\_sdt=0,5](http://scholar.googleusercontent.com/scholar?q=cache:02Uxef2I42wJ:scholar.google.com/+rela%C3%A7%C3%A3o+carbono+nitrogenio+res%C3%ADduos+agroindustriais&hl=pt-BR&as_sdt=0,5)> acesso em 01/03/2014

MARTINS, V. G.; KALIL, S. J. Co-produção de lipases e biossurfactantes em estado sólido para utilização em biorremediação de óleos vegetais e hidrocarbonetos. **Química Nova** 31(8): p. 1942 – 1947, 2008.

MERCADE, M.E.; MANRESA, M.A.; ROBERT, M.; ESPUNY, C.; GUINEA, J. Olive oil Mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. **Bioresource Technology**, v. 431, p. 1-6, 1997.

MESQUITA, A.C. **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes**. Dissertação de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004

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.

MITCHELL, D.A.; VON MEIEN, O.F.; KRIEGER, N. Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 137-147, 2003.

- MIZUMOTO, S.; SHODA, M. Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A, production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 76, p. 101-108, 2007.
- MIZUMOTO, S.; HIRAI, M.; SHODA, M. Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 72, p. 869-875, 2006.
- MONTEIRO, S.A.; SASSAKI, G. L.; SOUZA, L. M.; MEIRA, J. A.; ARAÚJO, J. M.; MITCHELL, D. A.; RAMOS, L. P.; KRIEGER, N. Molecular and Structural Characterization of the Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* DAUPE 614. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 147, p. 1-13, 2007.
- MOO-YOUNG, M.; MOREIRA, A.R.; TENGEDY, R.P. **Principles of the solid substrate fermentation. In: Filamentous Fungi**. 4. Ed. JE Smith, DR Berry and B Kristianse, EArnold. (eds.). p. 117 – 144, 1983
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 11, p. 509-515, 2006.
- MULLIGAM, C.N., Environmental applications for biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 183-198, 2005
- MULLIGAN, C.N.; GIBBS, B.F. In **Biosurfactants: production, properties, application: KOSARIC**, N. ed.; Marcel Decker. New York, 1993, cap. 13.
- NAJAFI, A.F.; RAHIMPOUR, M.R.; JAHANMIRI, A.H.; ROOSTAAZAD, R.; ARABIAN, D.; SOLEIMANI, M.; JAMSHIDNEJAD, Z. Interactive optimization of biosurfactant production by *Paenibacillus alvei* ARN63 isolated from a Iranian oil well, **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v.82, p.33-39, 2011.
- NAJAFI, A.F.; RAHIMPOUR, M.R.; JAHANMIRI, A.H.; ROOSTAAZAD, R.; ARABIAN, D.; GHOBADI, Z. Enhancing biosurfactant production from an indigenous strain of *Bacillus mycoides* by optimizing the growth conditions using a surface responding methodology, **Chemical Engineering Journal**, v.163, p.188-194, 2010.
- NAVON-VENEZIA, S. ; ZOSIM, Z.; GOTTLIEB, A.; LEGMANN, R.; CARMELI, S.; RON, E.Z.; ROSENBERG, E. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 61, n. 9, p. 3240-3244, 1995
- NELSON, N.A. Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. **Journal of Biochemistry**. v.153, p. 376-380, 1944.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Quimica Nova**, v. 25, nº 5, p. 772-776, mar. 2002.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O.; HADDAD, R.; GONÇAVES, L.A.G.; EBERLIN, M.; CONTIERO, J. Oil waste as unconventional substrate for rhamnolipid

biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnological Progress**, v. 21, p. 1562-1566, 2005.

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**, v. 80, p. 517-519, 1995.

OLIVEIRA, J.M.; MEI, L.H.I. Surfactantes Reativos Não-Iônicos em Polimerização em Emulsão de Látices de Acetato de Vinila-Vinil Neodecanoato: Influência nas Propriedade de Barreira à Água. **Ciência e Tecnologia**, v.19, n.1, p.22-30, 2009.

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

OOIJKAAS, L.P.; WEBER, F.J.; BUITELAAR, R.M.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. Defined media and inert supports: their potential as solid-state fermentation productions systems. **Trends in Biotechnology**, v. 18, p. 356-360, 2000.

ORTIZ, A. TERUELA, A.J.; ESPUNYB, J.M.; MARQUÉS, A.; MANRESAB, A.; ARANDA, J.F. Interations of a bacterial biosurfactant trehalose lipid with phsphatidylserine membranes. **Chemistry and Physics of Lipids**. 158:46-53, 2009.

PAPI, M. C. **Biossurfactantes de *Bacillus amyloquefaciens* MO.04b: Produção, Otimização e Caracterização Molecular**. 2013. 112f Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; MITCHELL, D. New developments in solid state fermentation: l-bioprocesses and products. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 1153-1169, 2000.

PARRA, J.L.; GUINEA, J.; MANRESA, M.A. Chemical characterization and physico-chemical behavior of biosurfactants. **Surfactants and Detergents Technical**. JAOCS, 66(1), 1989.

PATTANATHU, K.S.M.R.; EDWARD, G. Production, characterization an applications of biosurfactants – *Review*. **Asian Network for Scientific Information**, v. 7, n. 2, p. 360–370, 2008

PEDRO, E. M. **Resíduos Agroindustriais Potenciais para a Produção de Biossurfactantes**. 2012. 70p. Monografia de Especialização em Bioquímica Aplicada-Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR

PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Controlle biosynthesis of Val7- and Leu7-surfactins. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 36, p. 515-517, 1992.

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

PHETRONG, K.; H-KITTIKUN, A.; MANEERAT, S. Production and Characterization of Bioemulsifer from a Marine Bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 30, n. 3, p. 297-305, maio/jun. 2008.

PINTO, G.A.S., et al. Fermentação em Estado Sólido: Uma alternativa para o aproveitamento e valorização de resíduos agroindustriais tropicais. Comunicado técnico. **Embrapa**, ago, 2005. ISSN 1679-6535  
PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação Cinética da Produção de Biossurfactantes Bacterianos. **Química Nova**, v.32, n.8, p.2104-2108, 2009.

**POLINUTRI NUTRIÇÃO ANIMAL**. Disponível em: < <http://www.polinutri.com.br/> > acesso em 03/10/2012.

PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; SUMAETH C.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R. Structural and Physicochemical Characterization of Crude Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 Isolated from Petroleum-Contaminated Soil. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1589-1595, 2008

PRIYA, T.; USHARANI, G. Comparative study for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Botany Research International** v.2 n.(4) p. 284 – 287, 2009

RAHMAN, K.S.; RAHMAN, T.J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Program**, v. 18, p. 1277-1281, 2002

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture method to study fungal growth in solid fermentation. **European Journal Applied Microbiology Biotechnology**, v. 9, p. 199-209, 1980.

RAU, U., HAMMEN, S., HECKMAN, R., WRAY, V. e LANG, S. Sophorolipids: a source for novel Compounds. **Industrial Crops Products**, 13:85\_92, 2001

REDDY, K.R.; CHINTHAMREDDY, S. Comparison of extractants for removing heavy metals from contaminated clayey soils. **Soil and Sediment Contamination**, v.9, p. 449-462, 2000.

REISA, R. S.; ROCHA, S. L. G. Effects of carbon and nitrogen sources on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production. **Process Biochemistry** v.45: p. 1504 – 1511, 2010.

ROCHA, J.M.S. Aplicações de Agentes Tensoativos em Biotecnologia. **Boletim de Biotecnologia**, p. 5-11, 1999

RODRIGUES, L.; BANAT, I.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: Potential applications in Medicine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 57:609-618, 2006.

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

ROUSSOS S.; RAIMBAULT M.; SAUCEDO-CASTANEDA G.; LONSANE B. K. Efficient leaching of cellulases produced by *Trichoderma harzianum* in solid state fermentation. **Biotechnology Techniques**, v. 6, p. 429-432, 1992.

RUTZ, D.; JANSSEM R. Biofuel Technology Handbook, WIP Renewable Energies, ISBN Contract No. EIE/05/022/SI2.420009, München, Germany.2008

SABATINI, D.A.; McINERNEY, M.J.; YOUSSEF, N.; NGUYEN, T.; Evaluation of sub-micellar synthetic surfactants versus biosurfactants for enhanced LNAPL recovery. **Final Report**, p. 1-57, 2006

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-PR

SATO, K.; SHIGETOSHI, S. **Small-scale solid-state fermentations**. In: Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. A.L. Demain & J.E. Davies (eds) 2nd ed.ASM Press, Washington DC, pp. 61-79, 1999

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, P.O. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.

**SECRETARIA DA AGRICULTURA E ABASTECIMENTO (SEAB)**. Disponível em:<<http://www.agricultura.pr.gov.br/>> , acesso em 01/10/2012.

SHABTAIT, Y; GUTNICK D. L. Enhanced Emulsan Production in Mutants of *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 Selected for Resistance to Cetyltrimethylammonium Bromide. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 146-151, jul. 1986

SHAFFER, C.D.; STEPHENS, G.E.; THOMPSON, B.A.; FUNCHES, L.; BERNAT, J.A.; CRAIG, C.A.; ELGIN, S.C.R. Heterochromatin protein 2 (HP2), a partner of HP1 in *Drosophila* heterochromatin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 14332-14337, 2002.

SHALIGRAM, N.S. ; SINGHAL, R.S.: Surfactin – A Review on Biosynthesis, Fermentation,Purification and Applications. **Food Technology Biotechnology**. v.48 (2) p. 119–134, 2010

SHIH, I.-L.; KUO, C.-,Y.; HSIEH, F.-C.; KAO, S.-S.; HSIEH, C. Use of surface methodology to optimize culture conditions for iturin A production by *Bacillus subtilis*

in solid-state fermentation. **Journal of de Chinese Institute of Chemical Engineers**, v. 39, p. 635-643, 2008.

SILVA, T. A. L.; ARAUJO, H. W. C.; TAMBOURGI, E. G.; SILVA, C. A. A, TAKAKI, G. M. C. Potencial Biotecnológico de uma Nova Linha de *Pseudomonas fluorescens* na Produção de Biossurfactante Utilizando Petróleo como Substrato. **Exacta**, v. 7, n. 1, p. 31-37, jan./mar. 2009.

SLIVINSKI, C. T.; MALLMANNA, E.; ARAÚJO, J. M. De; MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. **Process Biochemistry** v.47, p.1848–1855, 2012.

SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; LÉPINE F.; DÉZIEL, E. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, p. 718-725, 2005.

SOCCOL, C.R., VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 205-218, 2003

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

SOUMEN, M.; PALASHPRIYA, D.; RAMKRISHNA, S. Towards commercial production of microbial surfactants, **Trends Biotechnology**, v. 24, p. 509–515, 2006

STELLER, S. ; VALTER, J. ; **Journal Chromatography B**. v.737, p. 267, 2000

TAHZIBI, A.; KAMAL, F.; ASSADI, M. M. Improved Production of Rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* Mutant. **Iranian Biomedical Journal**, v. 8, n. 1, p. 25-31, jan. 2004

TECHAOEI, S.; LUMYONG, S.; PRATHUMPAI, S.; SANTIARWARN, D.; LEELAPORNPISID, P. Screening Characterization and Stability of Biosurfactant Produced by *Pseudomonas aeruginosa* SCMU 106 Isolated from Soil Northern Thailand. **Asian Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 4, p. 340-351, 2011.

THANIYAVARN, J.; CHONGCHIN, A.; WANITSUKSOMBUT, N.; THANIYAVARN, S.; PINPHANICHAKARN, P; LEEPIPATIBOON, N.; MORIKAWA, M.; KANAYA, S. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* A41 using palm oil as carbon source. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 52, p. 215-222, 2006.

TIMOFIECSYK, F. R.; PAWLOWSKY, U. Minimização de resíduos na indústria de alimentos:revisão.**Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 18, n. 2, jul./dez. 2000

TULEVA, B.K., IVANOV, G.R., CHRISTOVA, N.E. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. **Zeitschrift für Naturforschung C. A Journal of Biosciences**. V. 57 n.3-4, p. 356-360, 2002

- UCHIDA, Y.; MISAVA, S.; NAKAHARA, T.; TABUCHI, T. Factors affecting the production of succinoltrehalose lipids by *Rhodococcus erythropolis* SD-74 grown on n-alkanes. **Agricultural and Biological Chemistry**. v.53 p.765–769, 1989
- VEENANADIG, N.K.; GOWTHAMAN, M.K.; KARANTH, N.G.K. Scale up studies for the production of biosurfactant in packed column bioreactor. **Bioprocess Engineering**, v. 22, p. 95-99, 2000
- VOLLBRECHT, E.; RAU, U.; LANG, S. Microbial conversion of vegetable oils surfaceactive di-, tri- and tetrasaccharide lipids (biosurfactants) by the bacterial strain *T. sukamurella* spec. **Fett/LIPID**, v. 101, p. 389 – 394, 1999
- VOLLENBROICH, D.; OZEL, M.; VATER, J.; KAMP, R.M.; PAULI, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by biosurfactant surfactin produced by *Bacillus subtilis*. **Biologicals**, v. 25, p. 289-297, 1997.
- VOLLENBROICH, D.; PAULI, G.; OZEL, M.; VATER, J. Antymycoplasma properties and applications in cell culture of surfactin, a lipopeptides antibiotic from *Bacillus subtilis*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.63, n.1, p.44-49; 1997.
- WANG, Q.; CHEN, S.; ZHANG, J.; SUN, M.; LIU, Z.; YU, Z. Co-producing lipopeptides and poly- $\gamma$ -glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 3318-3323, 2008.
- WALENCKA, E.; ROZALSKA, S.; SADOWSKA, B.; ROZALSKA, B. The influence of *Lactobacillus acidophilus*-derived surfactants on staphylococcal adhesion and biofilm formation. **Folia Microbiológica**, v. 53, n.1, p. 61-66, 2008
- 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* ATCC21332. **Process Biochemistry**, v. 42, p.40-45, 2007
- WU, Z.; LEE, Y. Y. Inhibition of the enzymatic hydrolysis of cellulose by ethanol. **Biotechnology Letters**, v.19, p.977-979, 1997.
- YAKIMOV M.M., TIMMIS K.N., WRAY V., FREDRICKSON H.L.. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS 50. *Applied Environmental Microbiology* v. 61, p.1706 – 1713, 1995
- YOUSSEF, N.H., DUCAN, K.E., NAGLE, D. P., SARVAGE, K. N., KNAPP, R.M., MCIRNEY, M.J. Comparison of methods to detect biosurfactant production by diverse microorganisms. **Journal Microbiological Methods**, v.56, p. 339-347, 2004
- ZAWAWI, R. B. M. Production of biosurfactant by locally isolated bacteria from petrochemical waste. *Chemistry. Malaysia, Universiti Teknologi Malaysia*. **MSC Thesis**. 2005

ZHU, Z.; ZHANG, G.; LUO, Y.; RAN, W.; SHEN, Q. Production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation using soybean flour and rice staw as substrate. **Bioresource Technology**, v.112, p.254-260, 2012.

ZHOU, J. Y.; DIALLO, S.; DAUPHIN, C. H.; PROGNON, P.; HAMON, M. **Journal Chromatography** .v.721, p.75, 1996

**ANEXO 1**  
**Descrição detalhada da determinação da composição centesimal**

## Teor de Umidade

O teor de umidade foi determinado pelo método de secagem em estufa com circulação de ar. Foram pesadas 5 g de cada substrato lignocelulósico em papel de filtro previamente pesado. Os materiais foram colocados em estufa a 105° C, até que o peso fosse constante. Onde a % de umidade foi dada pela equação 3 abaixo:

$$\% \text{ Umidade} = \frac{(100 \times N)}{P} \quad \text{Equação 3}$$

onde:

N = Perda de peso em gramas [(cápsula + amostra úmida) - (cápsula + amostra seca)]

P = massa da amostra (g)

## Proteínas Totais

Os valores para proteína foram calculados a partir dos teores de nitrogênio total, usando os fatores de conversão recomendado por Jones (1931). O fator geral de 6,25 foi usado para calcular as proteínas nos itens que não possuíam um fator de conversão específico. Este método envolve três etapas consecutivas (digestão, destilação e titulação) cujo objetivo é liberar o nitrogênio da amostra e em seguida transformá-lo em amônia.

Na determinação de proteínas, pesou-se 1 grama da amostra em papel manteiga (pela ausência de nitrogênio). Transferiu-se para um tubo de Kjeldahl, juntamente com 4,0 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0g de uma mistura catalítica (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e Se, numa proporção de 2:1).

Os tubos de Kjeldahl foram colocados em bloco digestor, até a solução se tornar clara (aproximadamente 2 horas), resfriada em seguida; logo após foi acrescentado com cuidado, 2 mL de água destilada e 1 mL do indicador fenolftaleína. Adaptou-se o tubo ao conjunto de destilação, mergulhando a extremidade afilada do condensador em 40 mL de ácido clorídrico (0,02 mol.L<sup>-1</sup>), contendo (não seria contido) em Erlenmeyer de 250 mL e 3 gotas do indicador misto de Patterson composto de vermelho de metila e azul de metileno na proporção de

5:1. Titulou-se o excesso de HCl ( $0,02 \text{ mol.L}^{-1}$ ) com solução de NaOH ( $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ ). A porcentagem do nitrogênio total (% N) foi expressa pela equação 4 abaixo:

$$\% N = \frac{(Vx 0,028)}{P} \quad \text{Equação 4}$$

V = diferença entre o volume de HCl ( $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ ) adicionado e o volume NaOH ( $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ ) gastos na titulação da amostra em mL;

0,028 = Miliequivalente grama do N versus a concentração da solução versus a porcentagem;

P = massa da amostra em gramas.

A porcentagem de proteína (% P) foi determinada utilizando-se a equação 5 a seguir;

$$\% P = \% N \times 6,25 \quad \text{Equação 5}$$

onde:

N = teor de nitrogênio total

6,25 = fator de conversão

### Lípidios Totais

Os lipídios totais foram determinados pelo método de extração em Soxhlet. A extração da fração lipídica foi realizada com o solvente éter de petróleo sob aquecimento a  $65 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , em chapa elétrica, por 6 horas. Após este período, o excesso de solvente foi extraído por rotaevaporação, os balões foram então transferidos para estufa  $105 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , onde foi mantido por cerca de 1 hora (até a eliminação total do solvente). Em seguida, os balões foram resfriados até temperatura ambiente em dessecador, logo após foram pesados para a quantificação dos lipídios totais segundo a equação abaixo:

$$\% \text{ lipídeos} = \frac{100 \times \text{lipídeos (g)}}{\text{amostra (g)}} \quad \text{Equação 6}$$

### **Cinzas**

O teor de cinzas foi determinado por incineração em mufla, foram pesados 5 g de amostra em cadinho de porcelana, estas amostras foram queimadas com bico de bunsen, após isso, foram levadas a mufla na temperatura de 550° C por 24 horas. Em seguida, baixou-se a temperatura da mufla para 80° C para iniciar o resfriamento. Onde a % de cinzas é dada pela equação 7 abaixo:

$$\% \text{ Cinzas} = \frac{(100 \times N)}{P}$$

Equação 7

onde:

N = Massa em gramas de cinzas [(cadinho + cinzas) – cadinho inicial]

P = massa da amostra (g)

### **Carboidratos Totais**

O teor de carboidratos foi estimado pela diferença entre 100 % e a soma das porcentagens de umidade, proteínas, lipídeos totais e cinzas.

**ANEXO 2**  
**Análise exploratória: Resultados das rodadas 1,2 e 3 dos experimentos**

## Primeira Rodada de Experimentos

**Tabela 1** - Variáveis Codificadas, Decodificadas e Resultados da Produção de Lipopetideos para o Planejamento Fatorial Box-Behnken  $3^4$  com 5 Pontos centrais

Ensaio	Variáveis Codificadas				Variáveis Decodificadas				Produção mg/gss
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	
	FS	CA	EL	G	FS	CA	EL	G	
1	-1	-1	0	0	2,50	0	0,15	0,15	28
2	1	-1	0	0	7,50	0	0,15	0,15	31
3	-1	1	0	0	2,50	5,00	0,15	0,15	31
4	1	1	0	0	7,50	5,00	0,15	0,15	36
5	0	0	-1	-1	5,00	2,50	0	0	41
6	0	0	1	-1	5,00	2,50	0,30	0	54
7	0	0	-1	1	5,00	2,50	0	0,30	49
8	0	0	1	1	5,00	2,50	0,15	0,30	64
9	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15	42
10	-1	0	0	-1	2,50	2,50	0,15	0	24
11	1	0	0	-1	7,50	2,50	0,15	0	31
12	-1	0	0	1	2,50	2,50	0,15	0,30	27
13	1	0	0	1	7,50	2,50	0,15	0,30	64
14	0	-1	-1	0	5,00	0	0	0,15	32
15	0	1	-1	0	5,00	5,00	0	0,15	38
16	0	-1	1	0	5,00	0	0,30	0,15	35
17	0	1	1	0	5,00	5,00	0,30	0,15	48
18	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15	45
19	-1	0	-1	0	2,50	2,50	0,00	0,15	36
20	1	0	-1	0	7,50	2,50	0,00	0,15	50
21	-1	0	1	0	2,50	2,50	0,30	0,15	7
22	1	0	1	0	7,50	2,50	0,30	0,15	37
23	0	-1	0	-1	5,00	0	0,15	0	27
24	0	1	0	-1	5,00	5,00	0,15	0	40
25	0	-1	0	1	5,00	0	0,15	0,30	26
26	0	1	0	1	5,00	5,00	0,15	0,30	37
27	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15	59
28	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15	33
29 (C)	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15	39
30 (C)	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15	56
31 (C)	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15	42
32 (C)	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15	50
33 (C)	0	0	0	0	5,00	2,50	0,15	0,15	62

## Segunda Rodada de Experimentos

**Tabela 2** - Variáveis Codificadas, Decodificadas e Resultados da Produção de Lipopetideos para o Planejamento Fatorial Box-Behnken  $3^3$  com 5 Pontos centrais  
FS = farelo de soja; EL = extrato de levedura; G = glicerol

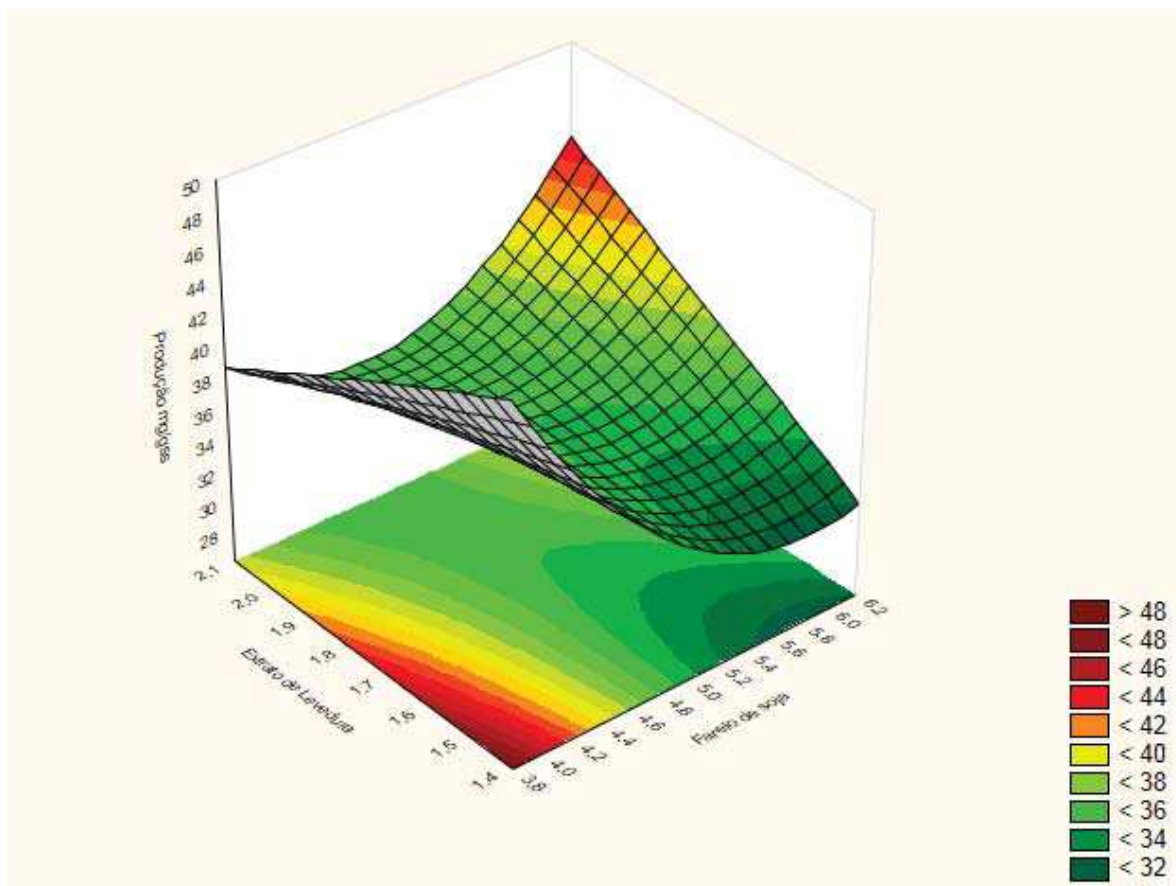
Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas			Produção mg/gss
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	
	FS	EL	G	FS	EL	G	
1	-1	-1	0	5,00	1,50	1,75	30
2	1	-1	0	10	1,50	1,75	23
3	-1	1	0	5,00	2,00	1,75	30
4	1	1	0	10	2,00	1,75	21
5	-1	0	-1	5,00	1,75	1,50	31
6	1	0	-1	10	1,75	1,50	24
7	-1	0	1	5,00	1,75	2,00	30
8	1	0	1	10	1,75	2,00	21
9	0	-1	-1	7,50	1,50	1,50	23
10	0	1	-1	7,50	2,00	1,50	25
11	0	-1	1	7,50	1,50	2,00	24
12	0	1	1	7,50	2,00	2,00	24
13 (C)	0	0	0	7,50	1,75	1,75	23
14 (C)	0	0	0	7,50	1,75	1,75	24
15 (C)	0	0	0	7,50	1,75	1,75	20
16 (C)	0	0	0	7,50	1,75	1,75	21
17 (C)	0	0	0	7,50	1,75	1,75	25

### Terceira Rodada de Experimentos

**Tabela 3** - Variáveis Codificadas, Decodificadas e Resultados da Produção de Lipopetideos para o Planejamento Fatorial Box-Behnken  $3^3$  com 5 Pontos centrais  
FS = farelo de soja; EL = extrato de levedura; G = glicerol

Ensaio	Variáveis Codificadas			Variáveis Decodificadas			Produção mg/gss
	X <sub>1</sub> FS	X <sub>2</sub> EL	X <sub>3</sub> G	X <sub>1</sub> FS	X <sub>2</sub> EL	X <sub>3</sub> G	
1	-1	-1	0	4,00	1,50	1,75	46
2	1	-1	0	6,00	1,50	1,75	33
3	-1	1	0	4,00	2,00	1,75	39
4	1	1	0	6,00	2,00	1,75	39
5	-1	0	-1	4,00	1,75	1,50	42
6	1	0	-1	6,00	1,75	1,50	32
7	-1	0	1	4,00	1,75	2,00	36
8	1	0	1	6,00	1,75	2,00	40
9	0	-1	-1	5,00	1,50	1,50	28
10	0	1	-1	5,00	2,00	1,50	38
11	0	-1	1	5,00	1,50	2,00	37
12	0	1	1	5,00	2,00	2,00	31
13 (C)	0	0	0	5,00	1,75	1,75	33
14 (C)	0	0	0	5,00	1,75	1,75	37
15 (C)	0	0	0	5,00	1,75	1,75	37
16 (C)	0	0	0	5,00	1,75	1,75	34
17 (C)	0	0	0	5,00	1,75	1,75	35

**Figura 1** - Superfície de resposta para a produção de lipopetídeos por *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b em função da concentração de extrato de levedura e farelo de soja.



**ANEXO 3**

**Primeira versão do artigo científico a ser submetido a revista Brazilian Journal  
of Microbiology**

## Title

Soybean meal and rice husk for the production of lipopeptides

by *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b

## Authors and Affiliations

Juliana Barion Massi<sup>1</sup>; Marcelo Rubens Machado<sup>1</sup>; Doumit Camilios Neto<sup>1</sup>; Dionísio Borsato<sup>2</sup>; Fabiana Moreira Guillen Gasparin<sup>1</sup>; Maria Inês Rezende<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina

<sup>2</sup> Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina

## Abstract

The lipopeptides biosurfactant production by *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b in solid state fermentation (SSF) was optimized using agro-industrial solid waste residues. Scanning electron microscopy of the fermented solid substrate revealed bacterial growth on all residues that confirmed the ability of the microorganism to perform SSF. Soybean meal (substrate) and rice husk (bulking agent) were found efficient and selected for lipopeptide biosurfactant production. The mineral solution (MS1) was supplemented with different carbon and nitrogen sources. The results indicated that glycerol and yeast extract were the significant and the optimum values for these significant variables were determined by the Box-Behnken design. The optimal lipopeptides biosurfactant production of 44.07 mg.g-DS<sup>-1</sup> was obtained when the medium contained 3.25 g of soybean meal, 2.5 % of rice husk, 1.5 g % of glycerol and 1.75 g % of yeast extract. The empirical model developed through RSM in terms of effective operational factors mentioned above was found to be adequate to describe the lipopeptide production. FT-IR spectrum of partially purified lipopeptides biosurfactant showed bands characteristic of peptides and aliphatic chains like surfactin, the most biosurfactant discovered so far produced by different *Bacillus* species. This study suggests an

environmentally friendly, “green” chemicals and economical way to convert soybean meal and rice husk into biosurfactant.

Key-words: agro-industrial waste; solid state fermentation; biosurfactant; agent bulking; optimization

## Introduction

The biosurfactants are amphiphilic compounds with emulsifying, wetting, solubilizing, detergent and phase-dispersing properties (Pacwa-Plociniczak et al., 2011). Their hydrophilic part is usually composed of sugars, amino acids, or polar functional groups like carboxylic acid groups. The hydrophobic part is typically an aliphatic hydrocarbon chain of  $\beta$ -hydroxy fatty acids. Microorganisms like bacteria, yeasts and fungi are known to produce various types of biosurfactants (Adbel-Mawgoud et al., 2010).

These compounds are attracting much attention because they represent ecological alternatives to their synthetic counterparts: exhibit lower toxicity, potentially high activities, and stability at extremes of temperature, pH and salinity. They have a wide variety of structures, and they can be produced from renewable feedstocks with agricultural residues. Most importantly, they are biodegradable, making them environmentally friendly, “green” chemicals (Slivinsky et al., 2012; Adbel-Mawgoud et al. 2010; Kiran et al., 2010; Joshi et al., 2008; Desai and Banat 1997).

Based on the nature of their chemical structures, biosurfactants are categorized in to four main groups: lipopeptides and lipoproteins, phospholipids, polymeric surfactants, and glycolipids. Lipopeptides are effective biosurfactants wick are usually produced by *Bacillus* strain (Najafi et al., 2011). They are composed of peptides linked to fatty acids with the peptide moiety often being cyclic and either being neutral or having a negative charge (Maier, 2003). There is keen interest in using them for therapeutic applications due activity against bacteria, viruses,

mycoplasmas and tumors, or act as immunomodulators or enzyme inhibitors (Slivinski et al., 2012).

The Brazil generates 597 million tons of agro-industrial waste per year (Ferreira-Leitão et al., 2010) and new solutions aiming for the appropriate utilization of these valuable resources it is possible with microorganisms producers of biosurfactants (Zhu et al., 2012, 2013a; Slivinsky et al., 2012; Nawawi et al., 2010; Joshi et al., 2008).

Agro-industrial waste with high content of carbohydrates, or lipids meet the requirement for use substrate for biosurfactant production (Makkar and Cameotra, 1999).

So the objective of the current work were to investigate the lipopeptides biosurfactant production by *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b in solid state fermentation using soybean meal and rice husk as substrate.

## Materials and methods

### Microorganism

The strain *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b originally isolated from contaminated soil near the Getúlio Vargas Refinery - REPAR (Parana/Brazil) and identified by Granzotto et al., (2012) was selected as the producer of biosurfactant from 45 microorganisms. Cultures were stored in DYGS medium with 2 % agar (w/v) and glycerol at -18 °C. Loopfull of cells the strain stock was taken from frozen and inoculated in 50 mL Erlenmeyer flasks containing 10 mL of mineral solution (compositions in g.L<sup>-1</sup> : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 3.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7.0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0.2; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1.0) with glucose 0.2 % (w/v) (Camilios-Neto, 2010), and agitated at 180 rpm at 37 ± 2 °C. After grown for 24 h, *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b in this medium was used as seed culture and 1.10<sup>8</sup> CFU/mL (colony forming unit) was used as inoculum.

### Bacterial growth in agro-industrial substrates

The substrates, soybean meal (SM), corn bran (CB) were obtained from Granosul Agroindustrial (Cambe, State of Parana, Brazil), rice husk (RH) from Yara Rice Machine

Yara (Londrina, State of Parana, Brazil) and sugarcane bagasse (SB) were obtained from Biochemistry and Biotechnology Department of the State University of Londrina. Solid state fermentation were undertaken in 50 mL Erlenmeyer flasks, containing 1.5 g of SM or CB or RH or SB moistened with mineral solution (Camilios-Neto, 2010), 10 mL, 5 mL, 4 mL, 10 mL, respectively for approximately 80 % humidity. The flasks were incubated at  $28 \pm 2$  °C for 72 h. The fermentation was interrupted for adding of 10 mL saline solution (0.85 g %) and the mixture was stirred in shaker 180 rpm for 30 minutes at room temperature. The suspensions obtained were made serial dilutions and transferred by the "pour plate" method to Petri dishes containing DYGS medium. The plates were incubated at  $28 \pm 2$  °C for 24 h for determining CFU/mL. From the supernatant of these cultures were determined: total soluble sugars (Dubois, 1956), soluble reducing sugars (Somogyi, 1945; Nelson, 1944) and total soluble proteins (Hartree, 1972). Samples of fermented substrates were processed according to Dominguez-Manzano et al. (2012) and Sella et al. (2012) for evaluation by Scanning Electron Microscopy-SEM (Quanta 200 FEI Philips for up approach 50,000).

#### Preparation of solid-state fermentation and lipopeptides biosurfactant production

The solid state fermentation were developed in 250 mL Erlenmeyers flasks containing the substrates soybean meal (5.0 g), rice husk (2.5 g) and the mineral solution (MS1) used in seed culture (Camilios-Neto, 2010), or the mineral solution in according Zhu et al. (2012), contained ( $\text{g L}^{-1}$ ), KCl 3.0;  $\text{MnSO}_4$  3.0;  $\text{CuSO}_4$  3.0;  $\text{FeSO}_4$  3.0, e L-phenylalanine 3.0. The mineral solution selected was supplemented with different carbon sources (glycerol, glucose, sucrose and starch)  $1.5 (\text{g L}^{-1})$  and nitrogen source (urea, yeast extract, peptone and ammonium sulphate  $1.5 (\text{g L}^{-1})$  and pH (6, 7 and 8). The fermentation was carried out water content 80 % at  $37 \pm 2$  °C por 36 h.

#### Optimization of lipopeptides biosurfactant production

A central composite design (CCD) with three coded levels (-1,0,+1) and five replicates at the center point was designed to find the optimal composition for lipopeptides production. On the basis of a preliminary investigation the concentration of rice husk was fixed in 3.75 g and the independent variables for this experiment were selected as the concentration of soybean meal (represented by the coded variable  $X_1$ ); yeast extract (represented by the coded variable  $X_2$ ) and glycerol (represented by the coded variable  $X_3$ ). The minimum and maximum ranges of each variable were given in Table 1.

Table 28- Independents variables and levels used in experimental design

Variables Independents	Leves		
	-1	0	1
$X_1$ = Soybean meal (g)	2.50	4.00	5.50
$X_2$ = Yeast extract (g)	1.25	1.50	1.75
$X_3$ = Glycerol (g)	1.50	1.75	2.00

The second order polynomial equation that defines predicted response ( $\hat{Y}$ ) in terms of the independent variables ( $X_1, X_2$  e  $X_3$ ), was given below:

$$\hat{Y} = \beta_0 - \beta_1 X_1 - \beta_{11} X_1^2 + \beta_2 X_2 - \beta_{22} X_2^2 - \beta_3 X_3 - \beta_{33} X_3^2 - \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 - \beta_{23} X_2 X_3 \quad (1)$$

where  $\beta_0$  is intercept term,  $\beta_1, \beta_2, \beta_3$  linear coefficients,  $\beta_{11}, \beta_{22}$  e  $\beta_{33}$  quadratic coefficients and  $\beta_{12}, \beta_{13}$  e  $\beta_{23}$  interactive coefficient estimates. The optimum levels of variables for maximal lipopeptides production were obtained by solving the regression equation and analysis the response surface contour plots. The graphs were plotted using Statistica 10.0.

#### Extraction and characterization of the lipopeptides biosurfactant

For isolation and quantification of lipopeptides, the fermented substrates were mixed with 15 mL distilled water. The samples were mixed thoroughly and shaken at 180 rpm for 1 h at room temperature, followed by centrifuging the whole content at 10,000 rpm for 10 min at 4 °C to remove the insoluble materials. Six moles per liter of HCl was added to the cell-free supernatant to a final pH of 2.0 and stored at 4 °C overnight for precipitation of lipopeptides that were recovered by centrifugation at 9,000 rpm for 20 min and extracted with

dichloromethane. The solution was dried using a rotary vacuum evaporator. The residue was re-suspended in water, neutralized with solution NaOH 1 M and lyophilized to powder form. The lipopeptides recovery was expressed as amount in mg per gram of initial dry substrates ( $\text{mg}\cdot\text{g}\text{-DS}^{-1}$ ). The surface tension was determined using a Du-Nouy Tensiometer (Kruss K12, Germany) at 25 °C, using the ring correction mode of the instrument. FT-IR spectra of the dried lipopeptides was recorded by FT-IR/NIR Spectrometer (Perkin Elmer). Samples were milled with KBr to form a very fine powder. The powder was then compressed into a thin pellet to be analyzed by FT-IR spectra measurement in wave numbers range of 400 - 4000  $\text{cm}^{-1}$ . The mapping of IR spectra was carried out by using Microcal Origin 6.0 software.

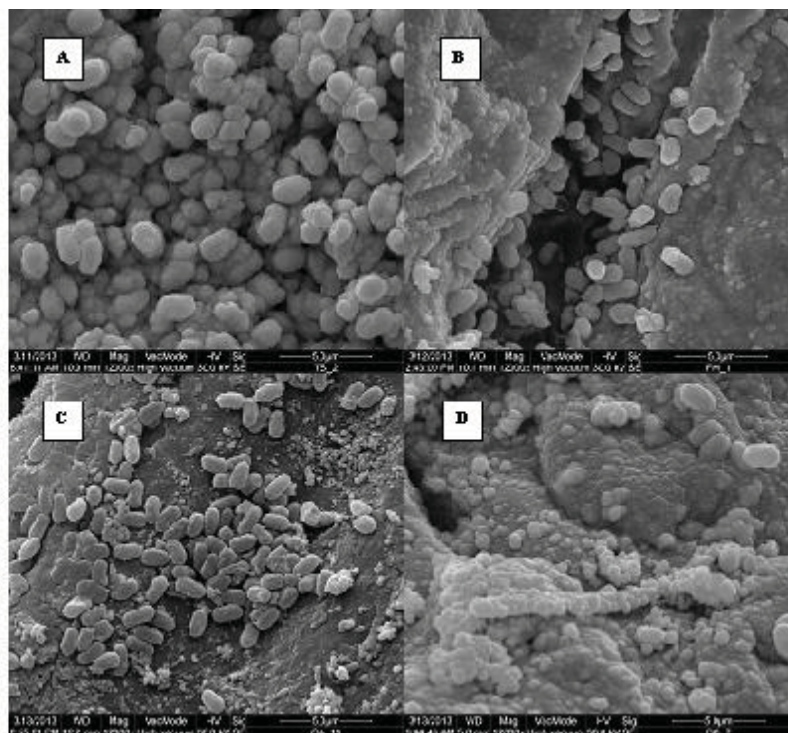
## Results and discussion

### Pre-screening of substrates and mineral solution for SSF

*Bacillus* species are often used for the production of lipopeptides, and the use agro-industrial byproducts as substrate in the production of these biosurfactants by solid state fermentation (SSF) have been related as one possible strategy for reducing production costs (Mizumoto et al., 2006; Mizumoto and Shoda, 2007; Das and Mukherjee, 2007; Wang et al., 2008, Shih et al., 2008; Ano et al., 2009; Bugay et al., 2009; Zhu et al., 2012; Slivinski et al., 2012).

The growing of *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b on soybean meal (SM), corn bran (CB); rice husk (RH) and sugarcane bagasse (SB) are shown in Figure 1. Scanning electron microscopy (SEM) of the fermented solid substrate revealed bacterial growth on the all substrates that confirmed ability of *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b to SSF with these substrates.

Figure 25- Electromicrographs of *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b cultivated on substrats: A-soybean meal (SM), B-corn bran (CB); C-rice husk (RH) and D-sugarcane bagasse (SB), 12.000X



The number of viable cells corresponds to  $\text{CFU.g-DS}^{-1}$  (i.e.g-dry-solids<sup>-1</sup>) on agro-industrial substrates after inoculation of the decimal dilutions in DYGS medium and incubation for 24 hours at  $28 \pm 2$  °C were shown in Table 1. In this study were determined also the total sugars, reducing sugars and total proteins contents from 0 and 36 h that reflect the metabolic state (Zhu et al., 2013b) of the *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b and the rates of consumption, transformation and utilization of the substrates (Table 2).

Table 2- Bacterial biomass, total sugars, reducing sugars and total protein before growth on agro-industrial substrates, SM-soybean meal; CB-corn bran; RH-rice husk; SB-sugarcane bagasse

Substrates	CFU g-DS <sup>-1</sup>		Total Sugars g %		Reducing Sugars g %		Total Protein g %	
	T <sub>0</sub>	T <sub>36</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>36</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>36</sub>	T <sub>0</sub>	T <sub>36</sub>
<b>SM</b>	s/cres	1.10 <sup>8</sup>	3,5	0,3	0,1	0,09	8,4	31,4
<b>CB</b>	s/cres	1.10 <sup>8</sup>	13,2	26,1	0,7	3,8	1,2	2,6
<b>RH</b>	s/cres	1.10 <sup>8</sup>	0,02	0,01	0,07	0,05	1,4	1,4
<b>SB</b>	s/cres	<10 <sup>6</sup>	2,8	2,7	0,3	0,2	1,4	1,2

T<sub>0</sub> = 0 h of culture; T<sub>36</sub> = 36 h of culture

The wide range of solid materials used in SSF can be classified into two great categories: inert materials, which only act as an attachment place for the microorganism and non-inert materials, which not only function as an attachment place but also supply some nutrients to the microorganisms. The selection of an adequate support for performing solid state cultivation is essential, since the success of the process depends on it (Rodríguez-Couto and Sanromán 2005). Agricultural waste are known for containing high levels of carbohydrates and of lipids both of which are necessary for the production of biosurfactants (Acorsini et al., 2012). The high nutritional content of these substrates, together with their availability and low price, make them use products to be used as culture medium or nutrient supplements for microorganisms in diverse industrial fermentation processes (Gudiña et al., 2015). In according Table 2 the *Bacillus amyloliquefaciens* MO.04b grown in all substrates except on SB.

Parameters as temperature, pH, aeration, water activity and moisture, bed properties, nature of solid substrate are factors affecting SSF processes (Singania et al., 2009). The oxygen limitation within the biofilm is unavoidable, even when the O<sub>2</sub> concentration in the gas phase at the surface of the biofilm is high. Of course, this limitation is intrinsic to all SSF processes, regardless of bioreactor type (Mitchel et al., 2003).

The bulking agents also called the bulking particles are very effective to control the air supply, pH, moisture, bulk density and carbon to nitrogen ratio and different bulking agents such as rice bran, rice husk, cotton waste, maize straw, have been related (Batham et al., 2013) to control the aeration. Slivinski, et al. (2012) obtained good results for the production of a surfactina by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid state fermentation on okara by adding sugarcane bagasse as a bulking agent. In the studies of Zhu et al. (2012) soybean flour served as the best substrate among the tested solid substrates for *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 for lipopeptides production and the addition of rice straw as bulking agent, improved

the production greatly as compared with the other combinations. So we decide to research the rice husk as a bulking agent on the cultivars of *B. amyloliquefaciens* MO.04.

The production of lipopeptides obtained with mineral solution MS1 was 33.0 mg.g-DS<sup>-1</sup> and with MS2 was 32 mg.g-DS<sup>-1</sup>. The analyses of statistical significance were done using Tukey test with a confidence level of above 95 % and there was no difference. Thus MS1 was chosen for this study because of simplicity and was supplemented with different carbon (Table 3) and nitrogen (Table 4) sources

Table 3- Effect of carbon source on production of lipopeptides in medium containing soybean meal, rice husk and MS1 on solid state fermentation for 36 h, at 37 ± 2 °C. Different letters in the same column were significant ( $p < 0.05$ )

Carbon source	pH	Lipopeptides Production (mg.g-DS <sup>-1</sup> )	Surface Tension (mN.m <sup>-1</sup> )
Glycerol	7,31	40.6 <sup>a</sup> ± 1,00	35.0 <sup>a</sup> ± 0,28
Glucose	7,39	40.3 <sup>a</sup> ± 0,58	36.4 <sup>a,b</sup> ± 0,75
Sacharose	7,76	31.0 <sup>a,b</sup> ± 0,50	37.0 <sup>a,b</sup> ± 0,50
Starch	7,50	26.0 <sup>a</sup> ± 0,86	37.7 <sup>b</sup> ± 0,29

Table 4- Effect of nitrogen on production of lipopeptides in medium containing soybean meal, rice husk and MS1 on solid state fermentation for 36 h, at 37 ± 2 °C. Different letters in the same column were significant ( $p < 0.05$ )

Nitrogen source	pH	Lipopeptides Production (mg.g-DS <sup>-1</sup> )	Surface Tension (mN.m <sup>-1</sup> )
Yeast extract	7,71	37.3 <sup>a</sup> ± 0.58	40,0 <sup>a</sup> ± 0.73
Peptone	7,29	35.5 <sup>b</sup> ± 0,50	41,3 <sup>a</sup> ± 0.15
Urea	7,49	35.0 <sup>b</sup> ± 0.77	41,3 <sup>a</sup> ± 0.17
Amonium sulphate	7,60	34.5 <sup>b</sup> ± 0.50	44.0 <sup>a</sup> ± 0.50

Both glycerol and glucose served as the best carbon sources, while there were no significant changes in decrease surface tension and the glycerol was selected. Among the tested nitrogen

compounds, yeast extract performed best as nitrogen source. Therefore, glycerol and yeast extract were selected for the optimization.

Some researchers have confirmed the feasibility of using agricultural wastes in SSF as substrates for biosurfactants production (Nawawi et al., 2010) for its simplicity and closeness to the nature way of life for many microorganisms and was considered to be a potential way to produce value-added product. Although submerged fermentation (SmF) is mostly carried out for the production of secondary metabolites Zhu et al. (2012).

#### Optimization of lipopeptides biosurfactant production in SSF

Carbon sources, nitrogen sources and salinity strongly influences cell growth and the accumulation of metabolic products, thus the optimization of these parameters can improve the biosurfactant production. Therefore, RSM using Box-Behnken design was applied to determine the optimal levels of the significant variables (Table 5).

Table 5- Results of experimental desing matrix for production lipopeptides biosurfactant optimization by using Box-Behnken desing in seventeen trials

Run	Original variables			Coded values of variables			Response Lipopeptides Production mg.g-DS <sup>-1</sup>
	x <sub>1</sub> Soybean meal g	x <sub>2</sub> Yeast extract g %	x <sub>3</sub> Glycerol g %	X <sub>1</sub> Soybean meal g	X <sub>2</sub> Yeast extract g %	X <sub>3</sub> Glycerol g %	
1	-1	-1	0	2,50	1,25	1,75	30
2	1	-1	0	5,50	1,25	1,75	35
3	-1	1	0	2,50	1,75	1,75	37
4	1	1	0	5,50	1,75	1,75	31
5	-1	0	-1	2,50	1,50	1,50	36
6	1	0	-1	5,50	1,50	1,50	34
7	-1	0	1	2,50	1,50	2,00	31
8	1	0	1	5,50	1,50	2,00	34
9	0	-1	-1	4,00	1,25	1,50	33
10	0	1	-1	4,00	1,75	1,50	43
11	0	-1	1	4,00	1,25	2,00	41
12	0	1	1	4,00	1,75	2,00	29
13	0	0	0	4,00	1,50	1,75	41
14	0	0	0	4,00	1,50	1,75	41
15	0	0	0	4,00	1,50	1,75	41
16	0	0	0	4,00	1,50	1,75	44
17	0	0	0	4,00	1,50	1,75	45

The Table 5 presents the original and coded values of independent variables and the lipopeptides biosurfactant observed experimentally (Y) and those predicted ( $\hat{Y}$ ) by the following adjusted equation:

$$\hat{Y} = 42.41935* - 0.16149x_1 - 6.03729*x_1^2 + 0.06090x_2 - 3.19639*x_2^2 - 1.35779x_3 - 2.69071*x_3^2 - 2.75432*x_1x_2 + 1.28054x_1x_3 - 5.53226*x_2x_3 \quad (2)$$

Eq. (2) adjusted well to the results ( $R^2 = 0.95808$ ).

Factors with *P*-values of less than 0.05 were considered to have a significant effect on the response.

The terms with an asterisk are significant at the 5% level. In addition all significant terms, except the interactions between soybean meal and yeast extract and yeast extract and glycerol, have positive coefficients, indicating that they positively influence the production of lipopeptides in solid state fermentation. The soybean meal and glycerol interactively and independently increase the production of lipopeptides. The analysis of variance (Table 6) showed that the model is significant at the 5 % level, presenting a high adjusted R<sup>2</sup> value, indicating that it can explain 95.8 % of the variance and, in addition, the deviation of the regression disregarding the interaction terms soybean meal and glycerol, and the terms yeast extract and glycerol was 86.5 %, indicating that the model can be used for predictive purposes.

Table 6- Analysis of variance (ANOVA) of the quadratic model for the Box-Behnken design

	Degrees of freedom	Sum squares	Mean square	<i>F</i> -value	<i>F</i> -tab
Model	9	423,3946	47,0438	11,9774 <sup>a</sup>	6,00
Lack of fit	3	2,8138	0,9379	0,2388 <sup>b</sup>	6,59
Pure error	4	15,7107	3,9277		
Total	16	441,9191			

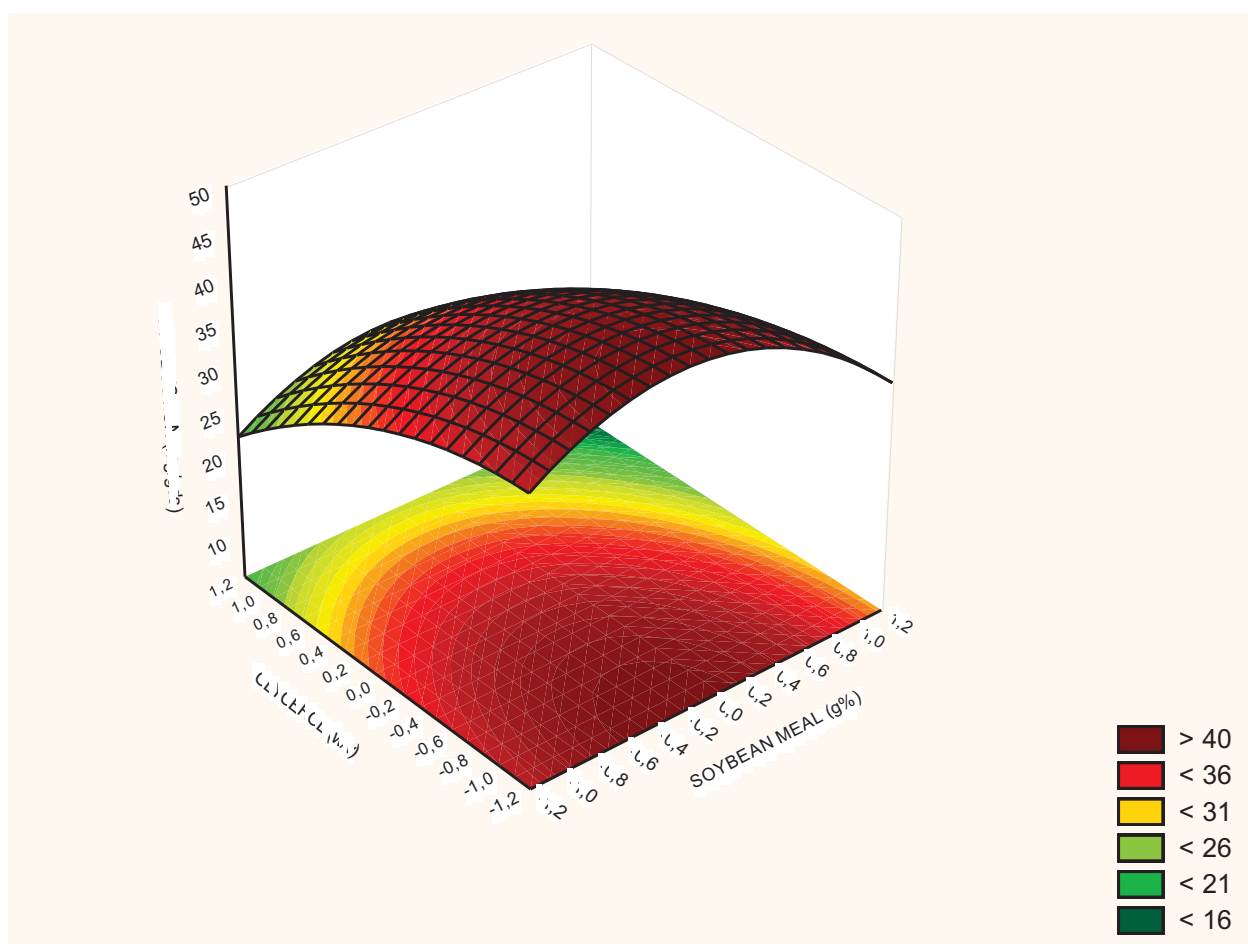
$(R^2) = 0,95808$ , adequate precision = 86,50.

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  were considered to be significant;

<sup>b</sup> not significant.

The region combination of binary variables "soybean meal", "glycerol" and "yeast extract" may be observed through the response surface (Figure 2). The points that lead maximum yield 44.07 mg.g-DS-1, corresponding to a concentration of 3.25 g of soybean meal and 1.75 g % of yeast extract and glycerol 1.50 g %.

Figure 2- Response surface curve of interaction versus glycerol and soybean meal on lipopeptides production

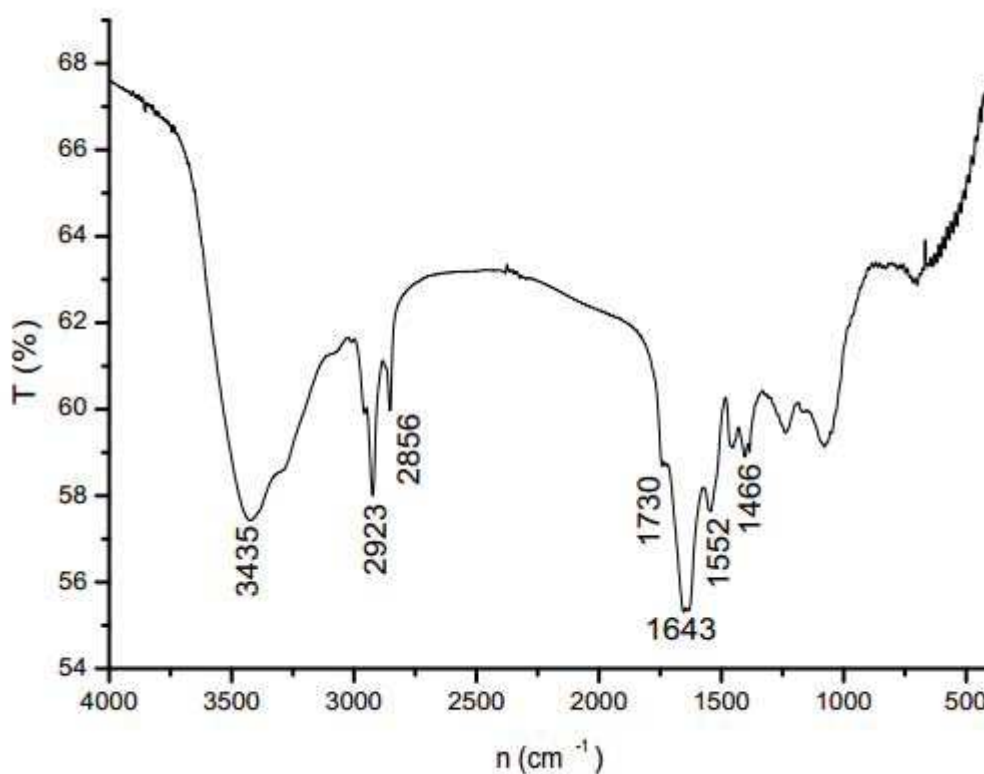


#### Characterization of the lipopeptides biosurfactant

The IR spectrum of partially purified surfactant showed bands characteristic of peptides at  $3435 \text{ cm}^{-1}$  (NH stretching mode) and  $1643 \text{ cm}^{-1}$  (stretching mode of the CO-N bond) (Figure

3). The absorption band at  $1552\text{ cm}^{-1}$  corresponds to angular deformation of the connecting NH combined with the stretching of the CN bond. The bands  $2923\text{-}2856$ ,  $1466$ ,  $1402\text{ cm}^{-1}$  reflect aliphatic chains of the fraction. Also absorption around  $1730\text{ cm}^{-1}$  is characterized as lactone. Cyclic lipopeptides produced by bacilli like surfactin (produced by *Bacillus subtilis*) and lichenysin (produced by *Bacillus licheniformis*) are, the most effective biosurfactant discovered so far (Najafi, et al., 2011; Joshi et al. 2008).

Figure 3- IR spectrum profile of dried biosurfactant produced by *B. amyloliquefaciens* grown on soybean meal and rice hull in SSF



#### Acknowledgements

Research scholarships were granted to Juliana Barion Massi by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), a Brazilian government agency to finance research.

## References

- Abdel-Mawgound AM, Lépine F, Déziel E (2010) Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol* 86: 1323-1336.
- Accorsini FR, Mutton MJR, Lemos EGM, Benicasa M (2012) Biosurfactants production by yeasts using soybean oil and glycerol as low cost substrate. *Braz J Microbiol* 43(1):116-125.
- Ano T, Jin GY, Mizumoto S, Rahman MS, Okuno K, Shoda M (2009) Solid state fermentation of lipopeptide antibiotic iturin A by using a novel solid state fermentation reactor system. *J Environ Sci*:S102-165.
- Batham M, Gupta R, Tiwari A (2013) Implementation of Bulking Agents in Composting: A Review. *J Bioremed Biodeg* 4:7
- Bugay C. (2009) Biosurfactantes produzidos por *Bacillus sp.*: estudos de produção e caracterização. Curitiba, Brazil, 82p. (M.Sc. Dissertation. Universidade Federal do Paraná. UFPR).
- Camilios Neto D, Meira JA, Araújo JM, Mitchell, DA, Krieger N (2008) Optimization of the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA 614 in solid-state culture. *Appl Microbiol Biotechnol* 1(3):441-448.
- Rodríguez-Couto S, Sanroman MA (2005) Application of solid state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochem Eng J* 22:211-219.
- Das K, Mukherje AK (2007) Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source: Some industrial applications of biosurfactants. *Process Biochem* 42:1191-1199.
- Desai JD, Banat IM (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol R* 61:47-64.

- Domínguez-Manzano J, Olmo-Ruiz C, Bautista-Gallego J, Arroyo-López FN, Garrido-Fernández A, Jiménez-Díaz, R (2012) Biofilm formation on abiotic and biotic surfaces during Spanish style green table olive fermentation. *Int J Food Microbiol* 157:230-238.
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350-356.
- Ferreira-Leitão V, Gottschalk LMF, Ferrara MA, Nepomuceno AL, Molinari HBC, Bon EPS (2010) Biomass residues in Brazil: availability and potential uses. *Waste Biomass Valor* 1:65-76.
- Granzoto G, Marcelino PRF, Dekker-Barbosa AM, Rodrigues EP, Rezende MI, Oliveira ALM (2012) Culturable bacterial pool from aged petroleum-contaminated soil: Identification of oil-eating *Bacillus* strains. *Ann Microbiol* 62:1681-1690
- Gudiña EJ, Rodrigues AI, Alves E, Domingues MR, Teixeira JA, Rodrigues LR (2015) Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. *Bioresour Technol* 177:87-93
- Hartree, E.F (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem* 48:422-427.
- Joshi S, Bharucha C, Jha S, Yadav S, Nerurkar A, Desai AJ (2008) Biosurfactant producing using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresour Technol* 99:195-199.
- Kiran GS, Thomas TA, Selvin J, Sabarathnam B, Lipton AP (2010) Optimization and characterization of a new lipopeptide biosurfactant produced by marine *Brevibacterium aureum* MSA13 in solid state fermentation. *Bioresour Technol* 101:2389-2396.
- Makkar RS Cameotra SC (1999) Biosurfactant production by microorganism on unconventional carbon sources. *J Surfactants Deterg* 2(2):237-241.
- Maier RM (2003) Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria. *Adv Appl Microbiol* 52:101-121.

- Mitchell DA, Von Meien OF, Krieger N (2003) Recent developments in modeling of solid-state fermentation: heat and mass transfer in bioreactors. *Biochem Eng J* 13:137-147.
- Mizumoto S, Hirai M, Shoda M (2006) Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 72:869-875.
- Mizumoto S, Shoda M (2007) Medium optimization of antifungal lipopeptide, iturin A production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation by response surface methodology. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:101-108.
- Najafi AR, Rahimpour MR, Jahanmiri AH, Roostaazad R, Arabian D, Soleimani M, Jamshidnejad Z (2011) Interactive optimization of biosurfactant production by *Paenibacillus alvei* ARN63 isolated from an Iranian oil well. *Colloids Surf B* 82:33-39.
- Nawawi WMFW, Jamal P, Alam MZ (2010) Utilization of sludge palm oil as novel substrate for biosurfactant production. *Bioresour Technol* 101: 9241-9247.
- Nelson NA (1944) Colorimetric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *J Biochem* 153:376-380.
- Pacwa-Plociniczak M, Grazyna AP, Piotrowska-Segget K, Cameotra SS (2011) Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int J Mol Sci* 12: 633-654.
- Rodrigues Neto J, Malavolta Jr VA, Victor O (1986) Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. citri tipo B. *Summa Phytopathol* 12:16. Sella SRBR, Guizelini BP, Zanelo PH, Vanderberghe LPS, Ribeiro CAO, Minozoo JC, Soccol CR (2012) Development of a low-cost sterilization biological indicator using *Bacillus atrophaeus* by solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol* 93:151-158.
- Singhaniaa RR, Patel AK, Soccol CR, Pandey A (2009) Review. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochem Eng J* 44:13-18.
- Shih I-L, Kuo C-Y, Hsieh F-C, Kao S-S, Hsieh C (2008) Use of surface methodology

to optimize culture conditions for iturin A production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. J Chinese Inst Chem Eng 39:635-643.

Slivinski CT, Mallmann E, de Araújo JM, Mitchell DA, Krieger (2012) Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. Process Biochem 47:1848-1855.

Somogyi MA (1945) A new reagent for determination of sugars. Journal of Biological Chemistry 160: 61-68.

Wang Q, Chen S, Zhang J, Sun M, Liu Z, Yu Z (2008) Co-producing lipopeptides and polyglutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. Bioresour Technol 99:3318-3323.

Zhu Z, Zhang G, Luo Y, Ran W, Shen Q (2012) Production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation using soybean flour and rice staw as substrate. Bioresour Technol 112: 254-260.

Zhu Z, Zhang F, Wei Z, Ran W, Shen Q (2013a) The usage of rice straw as a major substrate for the production of surfactin by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation. J Environ Manage 127:96-102.

Zhu Z, Li R, Yu G, Ran W, Shen Q (2013b) Enhancement of lipopeptides production in two-temperature-stage process under SSF conditions and its bioprocess in the fermenter. Bioresour Technol 127:209-215.