

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE ALIMENTOS

**ESTUDO DAS VARIÁVEIS DE PROCESSO E AMPLIAÇÃO DE ESCALA
NA PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE POR *Bacillus subtilis* EM
MANIPUEIRA**

FRANCISCO FÁBIO CAVALCANTE BARROS
Engenheiro de Alimentos

Prof^a Dr^a GLÁUCIA MARIA PASTORE
Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia
de Alimentos, da Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos

Campinas, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

B278e Barros, Francisco Fábio Cavalcante
Estudo das variáveis de processo e ampliação de escala na
produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* em manipueira
/ Francisco Fábio Cavalcante Barros. -- Campinas, SP: [s.n.],
2007.

Orientador: Gláucia Maria Pastore
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Manipueira. 2. Biosurfactantes. 3. *Bacillus subtilis*. I.
Pastore, Gláucia Maria. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Study of process variables and scale-up of the production of biosurfactant
by *Bacillus subtilis* in cassava wastewater

Palavras-chave em inglês (Keywords): Cassava wastewater, Biosurfactants, *Bacillus subtilis*

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gláucia Maria Pastore

Alexandre Nunes Ponezi

Gabriela Alves Macedo

Yong Kun Park

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Dissertação de mestrado aprovada e defendida em de de 2007, pela
banca examinadora constituída por:

Profa. Dra. Gláucia Maria Pastore
DCA/FEA/Unicamp
Orientadora

Dr. Alexandre Nunes Ponezi
CPQBA/Unicamp

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo
DCA/FEA/Unicamp

Prof. Dr. Yong Kun Park
DCA/FEA/Unicamp

A lamparina

Uma lamparina cheia de óleo gabava-se de ter um brilho superior ao do sol. Um assovio, uma rajada de vento e ela apagou-se. Acenderam-na de novo e lhe disseram:

– Ilumina e cala-te. O brilho dos astros não conhece o eclipse.

Que o brilho de uma vida gloriosa não te encha de orgulho. Nada do que adquirimos nos pertence de verdade.

Esopo

Esopo foi um escravo que viveu na Grécia no séc. V a.C. Tornou-se famoso pelas suas fábulas, que são pequenas histórias de animais, deuses e seres inanimados, cada uma com uma lição que mostra como agir com inteligência e sagacidade. Seus personagens falam, cometem erros ou acertos, são sábios ou tolos, maus ou bons, exatamente como os homens. Dizem que Esopo era tão habilidoso em criar histórias que seu dono o libertou. Suas fábulas, contadas e readaptadas por seus continuadores, como Fedro, La Fontaine e outros, tornaram-se parte de nossa linguagem. "(As uvas) Estão verdes", dizemos quando não atingimos um objetivo; esta foi a expressão que a raposa usou quando não conseguiu alcançá-las. Ou então: "a pressa é inimiga da perfeição". Bem, mas essas já são outras histórias...

Fontes:

- <http://pt.wikipedia.org/wiki/Esopo>. Acessada em fevereiro de 2007.
- As Fábulas de Esopo. Coleção L&PM Pocket, vol. 68.

A meus pais.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a todos (não foram poucos!) que ajudaram direta ou indiretamente em algum momento na execução deste trabalho:

Profa. Gláucia, Mário Mano (Manola), Ana Paula Simiqueli, Cedenir (CD), Roger (Seu Rôger), Mário (Dr. Maróstica), Juliano (Bichão), Livia Seno (Lissa), Alexandre Ponezi, Elizabete (Bete), Elias, Renato, Adauto, Reginaldo, Dora, Beatriz (Bia), Priscila (Pri), Profa. Lúcia Durrant, Fábio Dias, Profa. Isabel, Oscar (Osmil), Pedro (Plaza), Profa. Hélia, Profa. Gabriela, Alfredo Vitali, Prof. Park, Ana Patrícia (Aninha), Ana Maria, Giselle, Éder, Mariana Schin, Janaína, Tiozinhos da prensa (Plaza), Diane (Srta-Cor-de-Rosa), Geraldo, Edilberto...

Não posso esquecer também dos colegas de laboratório (+ predinho e faculdade):

Ana Paula (Xispita, Ana Aula...), Andréia, Luciana Blasi (Srta-Crasi-Cruz), Lísia (Líssia), Cíntia (Cinthia), Giovanna (Djoana), Michelle, Natália (Nats), Lourdes, Rosângela (Rommylda), Tiago Coroa, Elizete (Elizê), Luciana Malta, Samuel, Angélica (ou seria Iramaia?), Mariana Uenojo, Renata, Nadir, Liliane, Anderson, Profa. Helena Godoy, Prof. Marcelo Prado, Alessandra...

Aos amigos e incentivadores. O tempo passa, mas não ficam para trás:

Conceição, Raquel Abreu, Júnior Maia, Renata (Chiquinha), Josi, Fernanda, Cláudio, profa. Evânia, Juliana, Osvaldo, Júnior Muniz e Natália.

Aos meus pais:

Celeste e José (Josa).

Irmãos:

Fernando, Maria (Ciada), Flávio, Rosana, Erasmo e Neto (O seu Joaquim, qüim, qüim...).

E à minha horda de sobrinhos:

Patrícia, Priscila (comuétuonmiein?), Lívia, Lucas, Mateus, Fernando José,
Viviane, Flávio Júnior (Junicôu! Junicôu!), Breno, Vítor e Erasmo Filho.

É... Recebemos o tempo todo ajuda de tantas pessoas que não podemos dizer que qualquer trabalho é de uma só pessoa.

ÍNDICE

Apresentação

1.	Resumo	01
2.	Abstract	02
3.	Objetivos.....	03

Capítulo 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis*: USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS, AMPLIAÇÃO DE ESCALA E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO.

Resumo	04
1. Introdução	06
2. Propriedades químicas da surfactina	10
3. Perspectivas para produção utilizando resíduos agroindustriais	13
4. Potencial de uso da manipueira em processos biotecnológicos.....	15
5. Produção de biosurfactante em escala piloto e otimização de parâmetros	20
5.1. Otimização com emprego de metodologia estatística.....	21
6. Referências bibliográficas	23

Capítulo 2

OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DE MANIPUEIRA UTILIZADA COMO SUBSTRATO PARA A PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES DE *Bacillus subtilis* USANDO A METODOLOGIA DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.

Resumo	31
1. Introdução	32
2. Materiais e métodos	35
2.1. Metodologia experimental.....	35
2.1.1. Microrganismo	35
2.1.2. Preparo do substrato	35
2.1.3. Preparo do inóculo.....	36
2.1.4. Processo fermentativo	36
2.2. Delineamento experimental	37
2.3. Definição dos pontos ótimos.....	39
3. Resultados e discussão.....	40
3.1. Delineamento fatorial fracionado 2^{4-1}	40
3.2. Delineamento composto central rotacional	42
4. Conclusão	49
5. Referências bibliográficas	50

Capítulo 3

PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES DE *Bacillus subtilis* EM ESCALA PILOTO UTILIZANDO MANIPUEIRA COMO SUBSTRATO.

Resumo	54
1. Introdução	55
2. Materiais e métodos	58
2.1. Preparo do substrato	58
2.2. Caracterização do substrato.....	58
2.3. Microrganismo utilizado e conservação da cultura	59
2.4. Preparo do inóculo.....	59
2.5. Processo fermentativo	60

2.5.1. Monitoramento do processo	61
2.6. Extração do surfactante	61
2.7. Determinação da concentração micelar crítica	62
3. Resultados e discussão.....	62
3.1. Caracterização do substrato	62
3.2. Cinética do processo	64
4. Conclusão	72
5. Referências bibliográficas	72

Capítulo 4

CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES DO BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR *Bacillus subtilis* EM ESCALA PILOTO USANDO MANIPUEIRA COMO SUBSTRATO.

Resumo	78
1. Introdução	79
2. Materiais e métodos	81
2.1. Produção do biosurfactante	81
2.2. Estudo da atividade superficial	82
2.3. Estudo da estabilidade térmica	82
2.4. Estudo da estabilidade frente ao pH	82
2.5. Estudo da estabilidade frente a força iônica	83
2.6. Estudo da atividade emulsificante.....	83
3. Resultados e discussão.....	84
3.1. Atividade superficial.....	84
3.2. Estudos de estabilidade.....	85
3.3. Índice de emulsificação e estabilidade de emulsão	91
4. Conclusão	97
5. Referências bibliográficas	98

Conclusões e considerações finais

1. Conclusões.....	101
2. Considerações finais	102

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Composição da manípueira em diversos estudos	16
--	----

Capítulo 2

Tabela 1. Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado.....	37
Tabela 2. Valores utilizados no DCCR.....	39
Tabela 3. Matriz do delineamento fatorial fracionado 2^{4-1} e resposta tensão superficial (mN/m).....	40
Tabela 4. Matriz do DCCR com três variáveis e resposta em medida de tensão superficial (mN/m).....	42
Tabela 5. Coeficientes de regressão para a resposta analisada.....	43
Tabela 6. Análise de variância (ANOVA)	44
Tabela 7. Comparação entre resultado experimental e resultados preditos pelo modelo.....	45

Capítulo 3

Tabela 1. Características químicas da manípueira.....	62
---	----

Capítulo 4

Tabela 1. Índice de emulsificação (IE) de diferentes emulsões de hidrocarbonetos com biossurfactante de <i>Bacillus subtilis</i> LB5a (BS) e dodecil sulfato de sódio (SDS)	92
Tabela 2. Índice de emulsificação (IE) em diferentes óleos vegetais do biossurfactante de <i>Bacillus subtilis</i> LB5a e dodecil sulfato de sódio (SDS) e da lecitina de soja (LS).....	95
Tabela 3. Composição de ácidos graxos dos óleos utilizados no experimento.....	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Isômero mais comum da surfactina	11
Figura 2. Fluxograma de produção da farinha de mandioca	17
Figura 3. Esquema de uma fábrica de farinha	18
Figura 4. Produção de Mandioca no Brasil de 1996 a 2005.....	19

Capítulo 2

Figura 1. Comparação entre os valores preditos e experimentais	46
Figura 2. Superfície de resposta e curvas de contorno para tensão superficial do meio em função do tempo de centrifugação (min) e da aceleração centrífuga ($G \times 10^3$).....	46
Figura 3. Superfície de resposta e curvas de contorno para tensão superficial do meio em função do tempo de centrifugação (min) e da temperatura de aquecimento ($^{\circ}C$)	48
Figura 4. Superfície de resposta e curvas de contorno para tensão superficial do meio em função da aceleração centrífuga ($G \times 10^3$) e da temperatura de aquecimento ($^{\circ}C$)	48

Capítulo 3

Figura 1. Cinética de produção de biossurfactantes e consumo de açúcares por <i>Bacillus subtilis</i> LB5a em manipueira	66
Figura 2. Cinética de crescimento da cultura de <i>Bacillus subtilis</i> LB5a em manipueira ...	67

Figura 3. Cinética da produção de biossurfactante de <i>Bacillus subtilis</i> LB5a em manipueira	69
Figura 4. Relação entre as medidas de tensão superficial do meio de cultura e da espuma coletada	70
Figura 5. Determinação da concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante através da medida da tensão superficial (mN/m) de diluições sucessivas.....	71

Capítulo 4

Figura 1. Determinação da concentração micelar crítica (CMC).....	85
Figura 2. TS, CMD^{-1} e CMD^{-2} do biossurfactante submetido a tratamento térmico a 100°C09	87
Figura 3. TS, CMD^{-1} e CMD^{-2} do biossurfactante submetido a tratamento térmico a 121°C09	87
Figura 4. Efeito da concentração salina sobre a atividade superficial de diferentes concentrações de biossurfactante.....	88
Figura 5. Tensão superficial (TS), Diluição micelar crítica 1/10 (CMD^{-1}) e Diluição micelar crítica 1/100 (CMD^{-2}) em função do pH.....	89
Figura 6. Índice de emulsificação (IE) de diferentes emulsões de hidrocarbonetos com biossurfactante de <i>Bacillus subtilis</i> LB5a (BS) e dodecil sulfato de sódio (SDS)	93
Figura 7. Emulsões (E_{24}) de solução 1mg/ml de biossurfactante com hidrocarbonetos: 1 (pentano), 2 (hexano), 3 (benzeno), 4 (tolueno), 5 (octano), 6 (decano), 7 (diesel) e 8 (gasolina)	93

Figura 8. Índice de emulsificação (IE) em diferentes óleos vegetais do biossurfactante de *Bacillus subtilis* LB5a (BS), dodecil sulfato de sódio (SDS) e da lecitina de soja (LS) 96

Figura 9. Emulsões (E_{24}) de solução 1mg/ml de biossurfactante com óleos vegetais: 1 (algodão), 2 (babaçu), 3 (gergelim), 4 (girassol), 5 (milho), 6 (oliva), 7 (palma) e 8 (soja) 96

1. RESUMO

A bactéria *Bacillus subtilis* tem a capacidade de produzir biossurfactantes do grupo dos lipopeptídeos, dentre os quais, o que mais se destaca é a surfactina, um dos que possui maior atividade superficial. Esse composto é capaz de reduzir a tensão superficial da água a 20°C de 72 para 27 mN/m em concentrações menores que 20 µM. A aplicação de resíduos industriais como substrato para produção de biossurfactante de *Bacillus subtilis* tem sido estudada como forma de reduzir custos associados à produção destes.

A manipueira, que é o resíduo líquido da produção de farinha e fécula, tem sido apontada como potencial meio de cultura para processos biotecnológicos, incluindo produção de biossurfactantes. Esse uso tem significativa relevância quando se consideram os resultados de redução de tensão superficial e de produtividade obtidos.

Este trabalho estudou o processo produtivo, as propriedades e a estabilidade de biossurfactante produzido pela linhagem LB5a de *Bacillus subtilis* em escala piloto utilizando manipueira como substrato. O composto produzido foi capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m além de apresentar concentração micelar crítica de 12 mg/l. Manteve estabilidade frente à temperatura de 100°C por 140 minutos e 121°C por 60 minutos. Também foi estável na faixa de pH de 6 a 10 e suportou concentrações salinas testadas (de até 20%). A eficiência da extração primária realizada através da coleta de espuma mostrou bons resultados, sendo perfeitamente aplicável ao processo.

Além disso, os parâmetros envolvidos no preparo da manipueira foram otimizados visando um melhor aproveitamento do substrato. Os resultados apontam temperatura de aquecimento ótima de 95°C (máxima temperatura testada), tempo de aquecimento de 1 minuto, a aceleração centrífuga de 17,85 G x 10³ e o tempo de centrifugação de 14,86 minutos.

Os resultados apresentados são bastante animadores em relação à possibilidade de aplicações do biossurfactante produzido em diversos setores. Além de permitir um melhor aproveitamento da manipueira.

Palavras-chave: Manipueira, biossurfactante, Bacillus subtilis.

2. ABSTRACT

The bacteria *Bacillus subtilis* is well known by their capacity of production surfactants lipopeptides. Among these, the most studied is surfactin, a powerful surfactant that reduces the superficial tension of the water from 72 to 27 mN/m in concentrations less than 20 μ M. The application of industrial wastewaters as substrate for production of biosurfactant by *Bacillus* has been studied in order to reduce manufacturing costs. Manipueira is the residue from cassava industrialization process to the production of flour and starch. It has been pointed as potential culture medium for biotechnological processes, including production of biosurfactants.

This work studied the productive process, the properties and the stability of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* strain LB5a in pilot scale using manipueira as substrate. The produced compounds were capable of reducing the superficial tension of the water from 72 to 27 mN/m beyond presenting critical micelar concentration of 12 mg/l. It remaining stable on temperature of 100 $^{\circ}$ C during 140 minutes and 121 $^{\circ}$ C during 60 minutes. It was also stable in the range of pH from 6 to 10 and in saline concentrations (until 20%). The efficiency of the primary extration by foam collection showed good results, being perfectly applicable to the process.

Moreover, the involved parameters in the preparation of the manipueira has been optimized with the objective of better using of the substrate. The results presented the optimal points of heating temperature was 95 $^{\circ}$ C (maximum tested temperature), warm up time of 1 minute, the acceleration centrifugal of 17,85 G x 10³ and the centrifugalization time of 14,86 minutes.

The results showed that the biosurfactant produced have potential applications in several industrial sectors, beyond allowing one better exploitation of the manipueira.

Keywords: Cassava wastewater, biosurfactant, Bacillus subtilis.

3. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- O estudo da ampliação de escala para produção de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato;
- Estudo das propriedades e da estabilidade do produto obtido;
- Otimização de parâmetros relacionados ao pré-tratamento do substrato.

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

BIOSURFACTANTES PRODUZIDOS POR Bacillus subtilis: USO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS, AMPLIAÇÃO DE ESCALA E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO.

RESUMO

Os biossurfactantes, como os demais agentes de atividade superficial, possuem como principal característica a redução da tensão superficial e interfacial entre dois líquidos imiscíveis. Além disso, estes compostos possuem outras características que aumentam o seu potencial de utilização, tais como: biodegradabilidade, baixa toxicidade, tolerância a altas temperaturas, pH e força iônica, capacidade de emulsificação, solubilização e possibilidade de serem sintetizados a partir de substratos renováveis. Tais características conferem a esses compostos uma ampla gama de utilizações que vão desde a indústria petroquímica, de produtos de limpeza e higiene pessoal até a indústria de alimentos em aplicação como emulsificantes, por exemplo. Um dos grupos de biossurfactantes mais estudados é o dos lipopeptídeos e, entre eles, os produzidos por cepas de *Bacillus subtilis*, dentre os quais se destaca a surfactina, um dos mais poderosos em termos de redução de tensão superficial. Entre as propriedades descritas destacam-se também sua estabilidade em

condições extremas de pH, temperatura, salinidade e presença de enzimas proteolíticas além de importantes atividades antimicrobianas e biológicas.

O principal obstáculo à aplicação dos biossurfactantes pela indústria, em geral, é o seu alto custo de produção. No entanto, a elevada atividade superficial da surfactina implicaria na utilização de baixas concentrações de uso, o que dilui os custos em produtos de alto valor agregado. Além disto, a utilização de substratos alternativos é apontada como uma das soluções para este problema. Contudo, estes processos ainda não estão bem elucidados. A utilização de subprodutos e/ou resíduos agroindustriais representa uma alternativa para a diminuição do custo de produção, além de contribuir para a redução da poluição gerada pela descarga destes efluentes no ambiente.

A manipueira é um resíduo com elevado teor de carboidratos que é descartada durante o processamento da mandioca para produção de farinha e fécula. Seu tratamento causa elevação nos custos industriais, enquanto seu descarte, direto ao solo ou em cursos de água, causa sérios danos ambientais. Sua utilização como meio de cultura em diversos processos biotecnológicos, inclusive para produção de biossurfactantes, tem se mostrado bastante adequada, tanto em termos de produtividade como pelo fato de não ser necessária suplementação nutritiva. Além disso, o volume de produção brasileira de mandioca, estimado 26,6 milhões de toneladas (2005), que resulta numa produção de, aproximadamente, 6 milhões de toneladas caracteriza a manipueira como um abundante meio de cultura.

1. INTRODUÇÃO

Surfactante é uma palavra derivada da contração da expressão “surface active agent”, termo que significa, literalmente, agente de atividade superficial. Em outras palavras, um surfactante é um composto orgânico caracterizado pela capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido (Waters, 1991; Jönsson et al, 1998). Esta capacidade é derivada do fato destes compostos serem anfifílicos, o seja, a molécula é constituída por duas partes, uma hidrofílica e outra hidrofóbica (Waters, 1991; Lang, 2002). O termo interface denota o limite entre duas fases imiscíveis, enquanto o termo superfície indica que uma das fases é gasosa. Outra propriedade fundamental dos surfactantes é a tendência de formar agregados chamados micelas que, geralmente, formam-se a baixas concentrações em água. A concentração mínima na qual se inicia a formação de micelas chama-se concentração micelar crítica (CMC), sendo esta uma importante característica de um surfactante (Jönsson et al, 1998). Estas propriedades tornam os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (Kosaric, 1992; Banat, 2000), o que os habilita como importantes insumos industriais em diversos setores industriais tais como petróleo, petroquímica, alimentos e bebidas, cosméticos, farmacêuticas, mineração, metalurgia, agroquímica, fertilizantes, ambiental, papel entre outras (Kosaric, 1992; Desai et al, 1997; Banat 2000; Banat et al, 2000; Mulligan, 2005).

A produção mundial de surfactantes excede 5 milhões de toneladas por ano (Fabry, 1991) sendo que sua utilização se concentra na indústria de petróleo, na

indústria de cosméticos, nas indústrias de produtos de higiene e de produtos de limpeza (Waters, 1991; Banat, 2000), sendo que os setores de petróleo, para extração de petróleo adsorvido à rocha (MEOR), e o de limpeza, para a fabricação de detergentes de uso doméstico, são os que utilizam a maior parte dos surfactantes produzidos.

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo (Banat et al, 2000; Mulligan, 2005). Entretanto, o aumento da preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levou à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes (Kosaric 1992; Banat, 2000).

Compostos de origem microbiana que exibem atividade superficial são denominados biossurfactantes, consistindo em subprodutos de seus respectivos sistemas metabólicos (Cameotra et al, 2004) sendo geralmente extracelulares ou associados à membrana (Bognolo, 1999; Mulligan, 2005; Van Dyke et al, 1991). Estas substâncias são produzidas por uma grande variedade de microorganismos entre os quais bactérias, leveduras e fungos (Healy et al 1996; Mulligan, 2005). Contudo a maioria destes compostos, no entanto, são originados de bactérias (Desai et al, 1993; Healy et al 1996; Maier, 2003) e arqueobactérias (Maier; 2003). Estes microorganismos têm sido isolados do solo, água marinha, sedimentos do mar e áreas contaminadas por óleos. Diversas evidências indicam que biossurfactantes são produzidos, em alguns casos, em grande quantidade nestes ambientes, uma delas é a presença de espuma e emulsões em áreas de derramamento de óleos em oceanos, bem como seu efeito positivo no aumento da recuperação terciária de óleo (Maier, 2003).

A biodegradabilidade (Van Dyke et al, 1991; Kosaric, 1992; Lin, 1996; Banat et al 2000) e baixa toxicidade dos biossurfactantes constituem vantagens adicionais sobre os ingredientes sintéticos e, conseqüentemente, tornam-se potenciais substitutos dos emulsificantes convencionais em alimentos e cosméticos (Kachholz et al, 1987; Desai et al, 1997; Banat et al, 2000). Por serem considerados naturais e apropriados para aplicação ambiental (Holmberg, 2001; Mulligan, 2005), esses compostos apresentam maior apelo de mercado.

Os primeiros relatos envolvendo a utilização de biossurfactantes datam de 1949, quando Jarvis e Johnson detectaram as atividades antibiótica e hemolítica de um ramnolípido e de 1968, quando Arima et al descobriram a existência de um novo composto biologicamente ativo produzido por *Bacillus subtilis*, o qual, devido a sua grande atividade superficial, foi denominado surfactina tendo sua estrutura elucidada posteriormente (Kakinuma et al 1969 A, Kakinuma et al 1969 B, Kakinuma et al 1969 C; Kakinuma et al, 1969 D). Mais tarde, foi registrada a produção de biossurfactante em meios hidrofóbicos, o que levou a estudos de sua aplicação em tratamento de resíduos de petróleo (Itoh et al, 1971), recuperação de petróleo (Van Dyke et al, 1991; Banat et al, 2000), biorremediação e dispersão no derramamento de óleos (Banat, 1995; Van Dyke et al, 1991; Prince, 1993; Morán et al, 2000).

Os biossurfactantes compreendem uma grade diversidade de compostos quimicamente diferentes, mas, de modo geral, podem ser classificados em: glicolípdeos, lipossacarídeos, lipopeptídeos, fosfolípdeos e ácidos graxos/lípdeos neutros, como os ácidos ustilágico e corinomicólico (Jazic et al, 1984; Bognolo, 1999; Lang, 2002; Maier, 2003), e alguns polímeros além de surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (Desai et al, 1993; Maier, 2003), dentre os quais os

lipopeptídeos que são reconhecidos os mais efetivos entre eles (Jazic et al, 1984). Os surfactantes lipoprotéicos são, talvez, os mais conhecidos por suas atividades antibióticas, sendo mais bem caracterizados aqueles produzidos por *Bacillus* sp, incluindo surfactina, iturina, fengicina, liquenisina e bacilomicina (Arima et al, 1968; Cooper et al 1981; Sheppard et al, 1987; Razafindralambo et al, 1996; Kim et al, 1997; Davis et al, 1999). Esse tipo de composto se caracteriza pela existência de peptídeos ligados a ácidos graxos, sendo que a porção protéica da molécula pode ser neutra ou aniônica e os aminoácidos são freqüentemente dispostos em uma estrutura cíclica (Desai et al, 1997; Peypoux, 1999; Maier, 2003).

A surfactina, substância produzida por linhagens do *Bacillus subtilis*, é um dos mais efetivos biosurfactantes conhecidos, contudo, apesar da elucidação de diversas propriedades da surfactina na década de 60, somente nos anos 80 foi que ela chamou a atenção de diversos pesquisadores como uma alternativa atraente para substituir os surfactantes sintéticos, os quais podem ser mais danosos ao ambiente (Peypoux et al, 1999). Surfactantes produzidos por diferentes linhagens de *Bacillus subtilis*, além de serem obtidos por processos menos agressivos sob o ponto de vista ambiental, apresentaram efeitos significativos na biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (Morán et al, 2000, Oliveira et al, 2000; Makkar et al, 2003; Cubitto et al, 2004), remoção de óleo de areia contaminada (Morán et al, 2000, Nitschke, 2004; Costa, 2005), formação de emulsões estáveis em óleos vegetais (Costa, 2005), bem como na degradação do pesticida endosulfan (Awashti et al, 1999) e biorremediação de solos altamente contaminados por zinco e cobre (Mulligan et al, 1999; Mulligan et al, 2001).

2. PROPRIEDADES QUÍMICAS DA SURFACTINA

A surfactina é conhecida por ter excepcional atividade superficial, reduzindo a tensão superficial da água (20°C) de 72 para 27 mN/m (Arima et al, 1968; Cooper et al, 1981; Bognolo, 1999; Peypoux et al, 1999; Lang, 2002) em concentrações menores de 20 µM (Peypoux et al, 1999), além de reduzir a tensão interfacial do sistema água/hexadecano de 43 mN/m para valores <1 mN/m (Cooper et al, 1981; Lang 2002). Quando é comparada a outros biossurfactantes (Cooper et al, 1981; Haferburg, 2003) e a alguns surfactantes sintéticos como dodecilsulfato de sódio (SDS), e brometo de trimetil amônio (BTA) (Kim et al, 1997), a surfactina possui maior capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial além de apresentar menores valores de concentração micelar crítica (CMC).

A surfactina é produzida por várias cepas de *Bacillus subtilis* (Arima et al, 1968, Sen 1997; Kim et al, 1997, Kowall et al, 1998; Nitschke, 2004; Costa, 2005) e sua estrutura geral, como demonstrada na Figura 1, é a de um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo β-hidróxi, cuja cadeia pode variar de 13 a 15 átomos de carbono, permitindo a existência de diferentes compostos homólogos e isômeros (Kakinuma et al, 1969; Kluge et al, 1988; Kowall et al, 1998; Lang, 2002). O principal ácido graxo conjugado é o ácido 3 hidroxí-13-metil-tetradecanóico (Kluge et al, 1988, Kowall et al, 1998) ligado por ligação lactona, tal como os demais (Kakinuma et al, 1969 A; Peypoux et al, 1999).

A surfactina natural é uma mistura de isoformas que se diferenciam ligeiramente em suas propriedades físico-químicas devido a variações no tamanho da cadeia e a ligação do seu componente hidroxí ácido graxo e a substituições dos

aminoácidos componentes do anel (Kowall et al, 1998). Estas variações dependem da linhagem (Kowall et al, 1998; Hsieh et al, 2004) e das condições nutricionais e ambientais (Kowall et al, 1998, Davis et al, 1999).

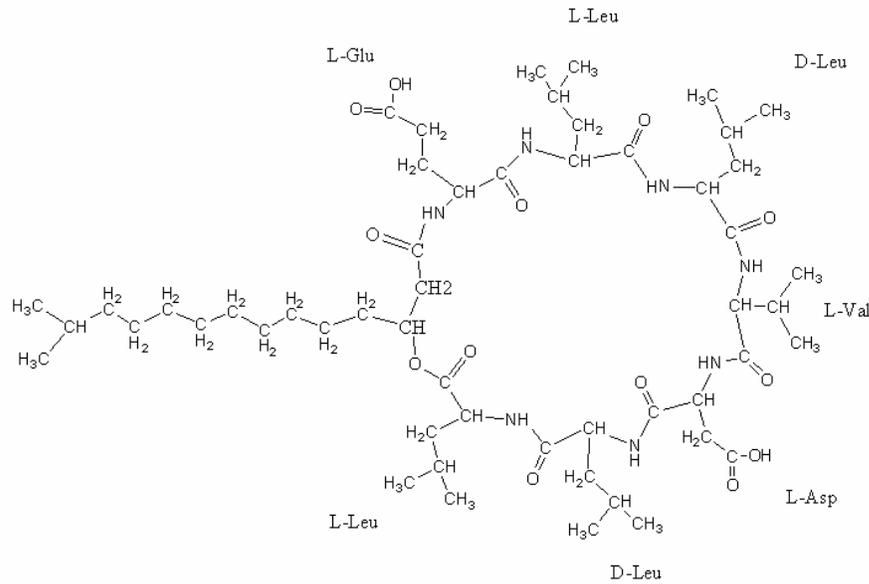


Figura 1. Isômero mais comum da surfactina.

Descreve-se que a atividade biológica da surfactina depende tanto da composição de aminoácidos e da seqüência do peptídeo como da natureza da sua parte lipídica (Kowall et al, 1998). As substituições de aminoácidos são responsáveis pelas significativas mudanças em suas propriedades causadas pela modificação da distribuição polar/apolar e/ou da acessibilidade de grupos carboxílicos à cátions. Estas modificações acarretam em diferenças na capacidade hemolítica, quelação de metais, CMC e atividade superficial (Peypoux et al, 1999; Lang, 2002).

Processos industriais e ambientais estão freqüentemente associados a condições extremas de temperatura, pressão, força iônica, pH e solventes orgânicos (Cameotra et al, 1998). Diversos estudos têm avaliado a estabilidade dos biossurfactantes frente a essas condições, isto ocorre em função da necessidade de

uma avaliação do comportamento destes compostos para que sua utilização seja viabilizada (Cameotra et al, 1998; Makkar et al, 1999). Estudos prévios têm demonstrado haver significativa estabilidade dos biossurfactantes mesmo quando comparados a compostos sintéticos bastante utilizados pela indústria.

Diversos experimentos têm demonstrado que a surfactina é bastante estável quando submetida a diversas condições. Os biossurfactantes produzidos por *Bacillus* sp são estáveis em concentrações de NaCl que seriam suficientes para inativar surfactantes convencionais (Li et al, 1990). O biossurfactante produzido pela cepa de *Bacillus subtilis* C9 apresentou amplo limite de estabilidade e manutenção de propriedades emulsificantes em temperaturas de 20 a 100 °C por 1 hora, pH de 5,0 a 9,5 e concentrações salinas de 1.000 mM de NaCl e 10 mM de CaCl₂ (Kim et al, 1997).

Utilizando outra linhagem, foi produzido surfactante com estabilidade a variações de temperatura de 100 °C por 2 horas, 121 °C por 0,5 hora e 135 °C por 1 hora, pH de 6 a 12, concentração salina (NaCl) de 15% e presença das enzimas proteolíticas bromelina, ficina, papaína e tripsina, além de boas propriedades emulsificantes de óleos vegetais e hidrocarbonetos (Costa, 2005).

A acidificação da solução contendo biossurfactante de *Bacillus subtilis* para pH 2 eleva a tensão superficial para 62 mN/m, voltando para 27 mN/m com a neutralização, em pH igual a 6, mostrando a dependência das propriedades surfactantes da surfactina em relação ao pH (Cooper et al, 1981). Isto se deve ao fato de que em meio ácido a surfactina precipita sem, contudo, ter sua estrutura alterada (Cooper et al, 1981; Costa, 2005). Esta característica representa uma vantagem adicional, pois mesmo quando submetida a condições mais extremas de pH, há manutenção da estrutura química original.

3. PERSPECTIVAS PARA PRODUÇÃO UTILIZANDO RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS

Os biossurfactantes, de modo geral, têm sido limitado a poucas e especializadas aplicações devido seus preços não competitivos (Fiechter, 1992).

A surfactina ainda não é explorada comercialmente devido, principalmente, ao seu elevado custo de produção (Nitschke, 2004). Os biossurfactantes têm que competir com os surfactantes sintéticos em três aspectos: custo, funcionalidade e volume de produção. Nas aplicações tais como a recuperação secundária de petróleo, que requerem volumes elevados de surfactantes de preços baixos, os custos elevados são incompatíveis com seu uso (Makkar et al, 2003). Contudo, as propriedades de formar emulsões estáveis de óleos comestíveis em água (Costa, 2005), e de reduzir fortemente a tensão superficial, mesmo em baixas concentrações (Arima et al, 1968; Cooper et al, 1981; Peypoux et al, 1999; Haferburg et al, 2003), têm especial significado quando se leva em consideração a viabilidade econômica de formulações que contenham estas substâncias, tendo visto que alguns produtos com elevado valor agregado poderiam absorver os altos custos originados devido à da adição destes compostos (Velikonja et al, 1993; Desai et al, 1997). Estes fatos sugerem o grande potencial de aplicação industrial para os biossurfactantes.

Várias frentes de pesquisa trabalham com o objetivo de reduzir os custos de produção. Segundo Fiechter (1992), Existe a necessidade de ampliação do conhecimento da fisiologia, genética e bioquímica de linhagens produtoras de biossurfactante, e melhorar a tecnologia do processo para reduzir os custos de produção. O uso de substrato a partir de resíduos agroindustriais também foi sugerido (Makkar et al, 2003; Maneerat, 2005; Mukherjee et al, 2006).

A fim de reduzir os custos de produção para ampliação das possibilidades de aplicação, o uso de resíduos industriais como meio de cultura é uma alternativa praticável, uma vez que a matéria-prima representa 30% de custos totais em um processo biotecnológico (Cameotra et al, 1998). O processo produtivo da surfactina utilizando efluentes agroindustriais ainda não está bem estabelecido para aplicação direta em escala industrial. Contudo, considerando-se que milhões de toneladas de resíduos danosos ao meio ambiente são gerados, a utilização dos mesmos em processos biotecnológicos parece ser uma alternativa plausível, principalmente quando uma grande variedade de resíduos agroindustriais tem sido utilizada como matéria-prima para processos biotecnológicos (Pandey et al, 2000). Deste modo, a utilização de resíduos agroindustriais para a produção de biossurfactantes é um dos passos na direção da viabilização da implantação desses processos em escala industrial.

Por outro lado, no caso da produção biotecnológica de surfactantes, é necessário um correto balanço de nutrientes para promover condições adequadas de desenvolvimento do microrganismo e de produção. Dessa forma, a utilização de resíduos com alto conteúdo de carboidratos e lipídeos parece ser uma opção adequada para a produção de biossurfactantes (Makkar et al, 2003).

Os efluentes do processamento de batatas caracterizam-se como potenciais substituintes de substratos convencionais sintéticos, pois são geralmente ricos em fonte de carbono na forma de amido e açúcares, além de nitrogênio e minerais. Foi investigada a produção de surfactina por linhagem de *Bacillus subtilis* 21332 desenvolvida em meio contendo efluentes sólidos do processamento de batata. O rendimento final de surfactina foi 66% inferior se comparado ao rendimento em meio de amido de batata otimizado (Thompson et al, 2000; Fox et al, 2000). Além disso, a

utilização de hidrolisados de turfa por uma linhagem de *Bacillus subtilis* para a produção de surfactina foi relatada. Os autores descreveram a utilização dos compostos gerados a partir da hidrólise ácida do material. A produção do biossurfactante parece estar relacionada com a proporção entre carbono e nitrogênio do meio de cultivo. Relatou-se ainda que a produção do biossurfactante foi tão eficiente quanto a produção em meio sintético. Ressalta-se que diferenças na composição do meio refletiram em diferenças nas curvas de tensão superficial (Sheppard et al, 1987). Substratos adicionais foram sugeridos para a produção de biossurfactante, tais como melaço e soro de leite (Nitschke et al, 2004; Cladera-Oliveira et al, 2004; Makkar et al 1999). Além desses resíduos citados, há descrição da utilização de outros resíduos como rejeitos do processamento de óleo de oliva (Mercade et al, 1993) e resíduos do processamento de soja (Ohno et al, 1995) entre outros óleos vegetais e animais (Chopineau et al, 2004).

4. POTENCIAL DE USO DA MANIPUEIRA EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

Outro exemplo de substrato com alto teor de fonte de carbono (Tabela 1) é a manipueira, que é originada da prensagem das raízes de mandioca (*Manihot esculenta*) para a fabricação de farinha e de fécula (Ponte, 1992). A manipueira, que em tupi-guarani significa “o que brota da mandioca” (Cereda, 1996) constitui, quantitativamente, o mais importante resíduo líquido do processamento de mandioca (Figura 2) e, sua produção é estimada em 30% do peso da matéria-prima em fábricas de farinha. (Wosiacki et al, 2000).

Tabela 1. Composição da manipueira em diversos estudos.

Componente	Concentrações					
	Maróstica Jr. et al (2007)	Nitschke et al (2003)	Damasceno et al (1999)	Costa (2005)	Ponte (1992)	Leonel et al (1995)
Sólidos Totais (g/l)	60,0	62,0	62,0			
DQO (g/l)	53,4	55,8	60,0	60,0		
Amido (%)						5,71
Açúcares não red. (g/l)	39,5	41,45	58,18	34,51		34,2
Sacarose (g/l)				24,5		
Açúcares red. (g/l)	20,1	23,3	20,2	-		29,3
Glicose (g/l)				7,6		
Frutose (g/l)				4,2		
Nitrogênio total (g/l)	1,72	2,08	1,60	0,6	0,43	1,42
NH ₄ ⁺ (mg/l)				36,2		
NO ₃ ⁻ (mg/l)				5,2		
Fósforo (mg/l)	369	245	83,3	161,3	256,5	293,0
Potássio (mg/l)	3640	3472	895	2900	1853,5	2650,0
Cálcio (mg/l)	236	293	184	122,8	227,5	220,0
Magnésio (mg/l)	438	519	173	366,8	405,0	340,0
Enxofre (mg/l)	61,4	154	38,0	69,0	195,0	74,0
Ferro (mg/l)	2,72	7,80	8,0	5,6	15,3	7,60
Zinco (mg/l)	3,01	2,80	4,50	1,1	4,2	3,20
Manganês (mg/l)	3,46	1,70	1,50	4,1	3,7	3,9
Cobre (mg/l)	1,11	1,0	0,75	0,7	11,5	0,9
Boro (mg/l)				0,3	5,0	

Este efluente é, geralmente, descarregado no ambiente, resultando em um grande problema ambiental, pois possui grande carga de materiais orgânicos dispersos e em solução, esta carga faz com que ocorra a redução de oxigênio na água com danos às formas aeróbias de vida (Wosiaki et al, 2000; Campos et al, 2006).

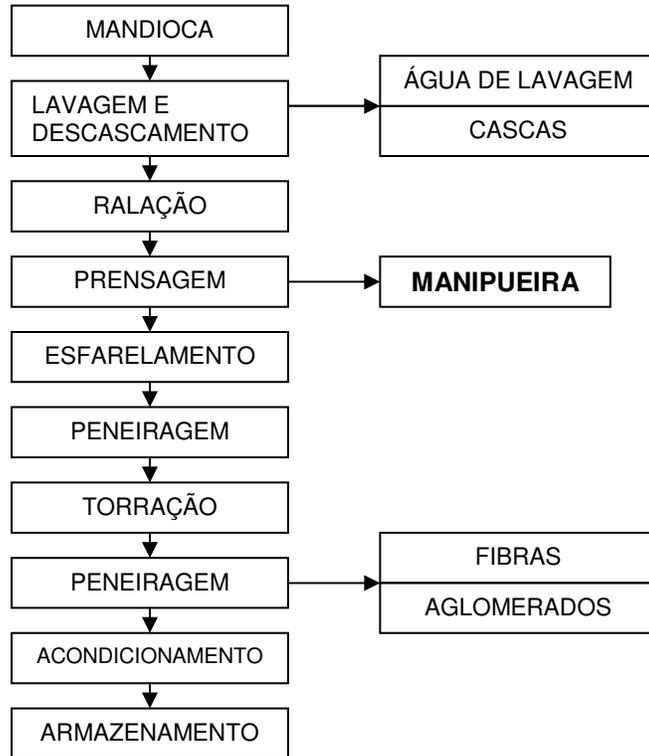


Figura 2. Fluxograma de produção da farinha de mandioca (Folegatti et al, 2005)

Além disso, a presença de glicosídeos cianogênicos que, especialmente a linamarina, sob ação enzimática, liberam CN⁻ (Ponte, 1992; Edijala et al, 1999; Pantaroto, 2000; Vetter, 2000).

Como mostrado na Figura 4, a produção estimada de mandioca no Brasil em 2005 foi cerca de 26,6 milhões toneladas (FAOSTAT-FAO 2006), sendo que, aproximadamente, 80% é processada em farinheiras e fecularias, gerando um volume de manipueira extremamente elevado (Fernandes Jr., 2000). A produção de mandioca está dispersa em, praticamente, todo o país. No entanto, apesar do grande volume, entre as grandes plantações comerciais é a cultura que apresenta os menores valores comerciais (Théry, 2005).

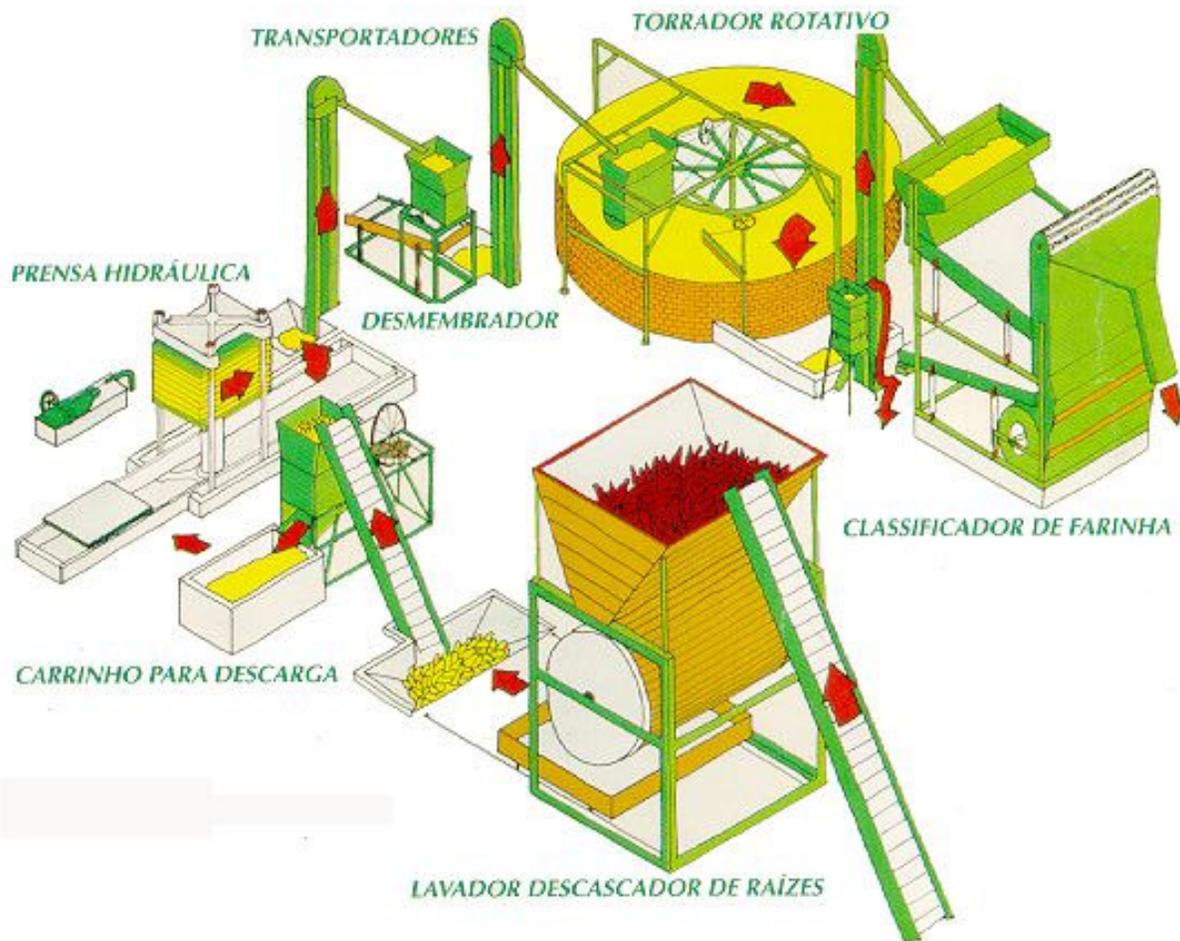
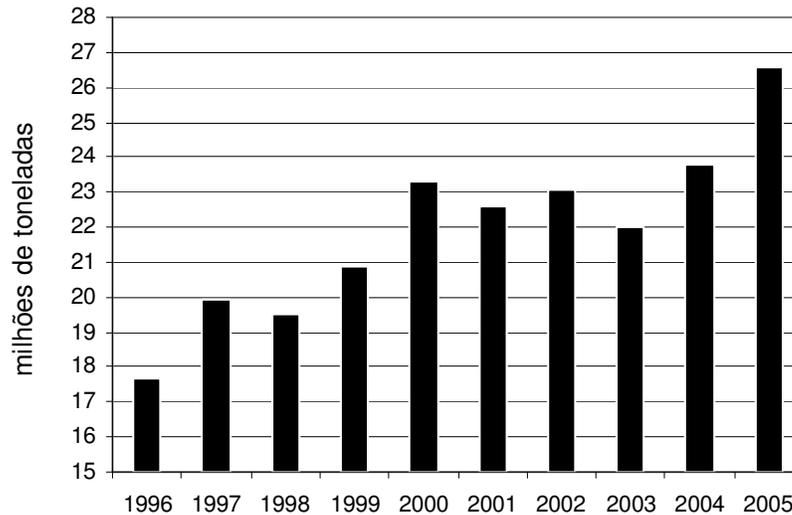


Figura 3. Esquema de uma fábrica de farinha (Folegatti et al, 2005).

Em termos mundiais, a mandioca pode ser considerada a quarta maior cultura do mundo, depois do arroz, do trigo e do milho sendo produzida em mais de 100 países, especialmente na Ásia, África e América do Sul (Cereda, 2005).

O uso da manipueira na produção de gêneros alimentícios como o tacacá e o tucupi, por exemplo, está restrita a pequenas comunidades. A produção de tiquira, destilado alcoólico da fermentação de manipueira fermentada por *Saccharomyces cerevisiae* está restrita basicamente ao estado do Maranhão (Polastro et al, 2001).

Figura 4. Produção de Mandioca no Brasil de 1996 a 2005. (FAOSTAT-FAO, 2006)



Alguns relatos sugerem a manipueira como substrato para produção biotecnológica como, por exemplo, a produção de biomassa oleaginosa por *Trichosporon* sp (Wosiacki, 2000), ácido cítrico por *Aspergillus niger* (Leonel et al, 1995). Bioaromas frutais por *Geotrichum fragans* (Damasceno et al, 2003), na utilização como meio de cultura na biotransformação de limoneno em R-(+)- α -terpineol (Maróstica Jr. et al, 2007) e biotransformação de citronelol em *cis*- e *trans*-óxidos de rosa por uma linhagem de *Penicillium*(Maróstica Jr. Et al, 2006) e produção de metano [biogás] (Barana et al, 2000; Ribas et al, 2003).

No caso da produção de biossurfactante, várias linhagens de *Bacillus subtilis* foram testadas segundo suas habilidades em utilizar a manipueira para a produção de surfactina (Pastore et al 2003; Nitschke et al, 2003; Nitschke, 2004; Nitschke et al 2004 A; Nitschke et al 2004 B, Costa 2005). Quando comparada com meio sintético e com alguns resíduos tais como melão e soro de leite, segundo a tensão superficial final do meio de cultura, a manipueira foi o substrato no qual os menores valores de tensão foram encontrados. Os valores próximos a 26 mN/m indicam que a manipueira está

entre os meios de cultura mais adequados para a produção de biossurfactante (Pastore et al, 2003; Nitschke, 2004).

A manipueira apresenta elevados índices de carboidratos totais (Maróstica jr, 2007; Damasceno et al, 1999; Nitschke et al, 2003), isto a caracteriza como um bom substrato para a produção de biossurfactantes por *Bacillus* (Sandrin et al 1990; Lin, 1996). Além disso, a manipueira apresentar elevados teores de Mn^{2+} e Fe^{2+} (Maróstica jr, 2007; Damasceno et al, 1999; Nitschke et al, 2003) muito importante para a produção de surfactina (Cooper et al 1981; Wei et al, 2002; Wei et al, 2004). Os íons Fe^{2+} também são considerados importantes para uma boa produção de biossurfactantes (Cooper et al, 1981; Wei et al, 2004). Os íons Zn^{2+} e NH_4^+ foram também (Gu et al 2005). Outros nutrientes que podem afetar a produção são íons fosfato e fontes de nitrogênio (Lin, 1996). Ainda em relação à composição é possível observar prevalência dos íons NH_4^+ sobre os NO_3^- (Nitschke, 2004; Costa, 2005). Estudos mostram que há uma preferência por nitrogênio orgânico, amônio e nitrato nesta ordem para a produção de tensoativos de *Bacillus subtilis* (Davis et al 1999).

5. PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTE EM ESCALA PILOTO E OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS

Diversas tentativas têm sido feitas para padronizar os parâmetros para produção de biossurfactantes, tanto em fermentação sólida quanto líquida. Relatos que citam o aumento da escala de produção, mesmo que em número limitado, estes indicam um bom campo para a exploração pela indústria (Banat et al 2000; Desai et al, 1997; Veenanadig et al, 2000; Reiling et al 1986; Mulligan et al 1990; Santos, 2001).

Experimento para produção em escala piloto de biossurfactante de *Bacillus subtilis* em fermentação em estado sólido indicam que o biorreator de coluna empacotada pode tornar-se um sistema aceitável para produção industrial (Veenanadig et al, 2000). Um experimento para produção piloto de ramnolipídio de *Pseudomonas aeruginosa* foi relatado (Reiling et al, 1986). Mulligan et al (1990) propuseram um sistema integrado de produção contínua.

Em relação à produção de surfactina utilizando manipueira em biorreator de bancada, um estudo é descrito por Costa (2005) baseado em parâmetros desenvolvidos por Nitschke (2004) em frasco mantidos em agitador orbital. Santos (2001) relata a produção em escala piloto com frementador de 80 litros utilizando manipueira assim como propõe um modelo com centrifugação e reaproveitamento de células, o qual foi desenvolvido em moldes bastante similares, só que para escalas menores por Yeh et al (2006).

5.1. OTIMIZAÇÃO COM EMPREGO DE METODOLOGIA ESTATÍSTICA

O uso de metodologia estatística oferece importante caminho para otimização de processos biotecnológicos. Essas metodologias estão sendo rotineiramente utilizada para estudos de otimização em diversos processos biotecnológicos e industriais (Jacques et al, 1999; Beg et al, 2003; Sen et al, 2004; Cladera-Oliveira et al 2004; Rodrigues et al, 2005).

O método clássico de otimização dos efeitos de fatores em um processo é realizado através da variação de apenas um parâmetro por vez enquanto os outros são mantidos constantes. Esta estratégia pode consumir tempo e requer um elevado

número de experimentos além de não avaliar as interações entre duas ou mais variáveis estudadas, contudo, com o uso de técnicas estatísticas para planejamento experimental multivariado é possível estudar a variação simultânea de fatores com um reduzido número de experimentos (Sen et al 1997, Rodrigues et al, 2005).

O efeito de vários fatores nutricionais, ambientais entre outros têm sido avaliados na produção de biossurfactantes. Diversos estudos apresentam resultados para otimização de vários aspectos da produção de surfactina e outros lipopeptídeos em meio sintético em bancada. As variáveis estudadas vão desde as condições ambientais (Sen et al 1997; Santos, 2001), a quantidade e o tempo de incubação do inóculo (Sen et al, 2004), composição do meio (Cooper et al, 1981; Sen, 1997; Davis et al 1999; Wei et al, 2004; Lee et al, 2004; Gu et al 2005) ou à combinação de composição do meio e condições ambientais (Jacques et al. 1999; Cladera-oliveira et al, 2004).

Estudos anteriores com o objetivo de conseguir uma maior produção de surfactante em manipueira foram reportados (Nitschke, 2004). No entanto, nenhum estudo relativo à otimização com metodologia estatística do pré-tratamento nem de qualquer outra etapa do processo produtivo utilizando manipueira foi executado anteriormente.

Estudos anteriores com o objetivo de conseguir uma maior produção de surfactante em manipueira foram reportados (Nitschke 2004, Nitschke et al 2004), no entanto, nenhum estudo relativo à otimização do pré-tratamento da manipueira foi executado anteriormente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Campos, A.T.; Daga J.; Rodrigues, E.E.; Franzener G.; Suguiv, M.M.T.; Syperreck, V.L.G. Tratamento de águas residuárias de fecularia por meio de lagoas de estabilização. **Eng. Agríc.**26: 235-242, 2006.
2. Arima, K.; Kakinuma, A.; Tamura, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochem Biophys Res Commun.** 31: 488-494, 1968.
3. Awashti, N.; Kumar, A.; Makkar, R.; Cameotra, S. Enhanced biodegradation of endosulfan, a chlorinated pesticide in presence of a biosurfactant. **J Environ Sci Health B.** 34: 793-803. 1999.
4. Banat, I.M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresour Technol.** 51: 1-12, 1995.
5. Banat, I.M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur.** 198: 44-47, 2000.
6. Banat, I.M.; Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl Microbiol Biotechnol.** 53: 495-508, 2000.
7. Barana, A.C.; Cereda, M.P. Cassava wastewater (*manipueira*) treatment using a two-phase anaerobic biodigestor. **Ciênc Tecnol Aliment.**, 20: 183-186, 2000.
8. Beg, Q.K.; Sahai, V.; Gupta, R. Statistical media optimization and alkaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. **Process Biochem.** 39: 203-209, 2003.
9. Bognolo, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids Surf.** 12: 41-52, 1999.
10. Cameotra S.S.; Makkar, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Curr Opin Microb.** 7: 262-266, 2004.
11. Cameotra, S.S.; Makkar, R,S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Appl Microbiol Biotechnol.** 50: 520-529, 1998.
12. Cereda M.P. Produtos e subprodutos. Em **Processamento e utilização da mandioca**. Souza, L.S.; Farias, A.R.N.; Mattos, P.L.P.; Fukuda, W.M.G. eds., Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical: Cruz das Almas, 2005. cap.1.

13. Cereda, M.P. Valorização de resíduos como forma de reduzir custos de produção. Em: **Congresso Brasileiro de Mandioca**; CERAT: Botucatu, 1996, vol 1.
14. Cladera-Oliveira, F.; Canon, G.R.; Brandelli, A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. **Biochem Eng J.** 21: 53-58, 2004.
15. Cooper, D.G.; Macdonald, C.R.; Duff, S.J.B.; Kosaric, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Appl Environ Microbiol.** 42: 408-412, 1981.
16. Costa, G.A.N. Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2005.
17. Cubitto, M.A.; Morán, A.C.; Commendatore, M.; Schiarello, M.N.; Baldini, M.D.; Siñeriz, F. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. **Biodegradation.** 15: 281-287, 2004.
18. Damasceno, S.; Cereda, M.P.; Pastore, G.M.; Oliveira, J.G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragans* using cassava wastewater as substrate. **Process Biochem.** 39: 411-414, 2003.
19. Davis, D.A.; Lynch, H. C.; Varley, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme Microb Technol.** 25: 322-329, 1999.
20. Desai, J.D.; Banat, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potencial. **Microbiol Molec Biol Rev.** 61: 47-64, 1997.
21. Desai, J.D.; Desai, A.J.; Production of biosurfactants Em **Biosurfactants: production, properties, applications**. Kosaric, N., ed. Marcel Decker: New York, 1993, cap. 2.
22. Edijala, J.K.; Okoh, P.N.; Anigoro, R. Chemical assay of cyanide levels of short-time-fermented cassava products in the Abraka area of Delta State, Nigeria. **Food Chem.** 64: 107-110, 1999.
23. Fabry, B. **Chemie in unsereraut.** 25: 214, 1991
24. FAO – Food and Agriculture Organization. **FAOSTAT** <http://faostat.fao.org/>, acessada em Junho de 2006.
25. Fernandes Jr., A. tratamentos físicos e biológicos da manípueira. Em **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**; Cereda, M.P., ed.; Fund. Cargill: São Paulo, 2000, cap. 10.

26. Fiechter, A. Biosurfactants: moving towards industrial application. **Trends Biotechnol.** 10: 208-217, 1992.
27. Folegatti, M.I.S.; Matsuura, F.C.A.U.; Ferreira Filho, J.R. A indústria da farinha de mandioca. Em: **Processamento e utilização da mandioca**. Souza, L.S.; Farias, A.R.N.; Mattos, P.L.P.; Fukuda, W.M.G. eds., Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical: Cruz das Almas, 2005. cap.2.
28. Fox, S.L.; Bala G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresour Technol.** 75: 235-240, 2000.
29. Gu, X.; Zheng, Z.; Yu, H.; Wang, J.; Liang, F.; Liu, R. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. **Process Biochem.** 40: 3196-3201, 2005.
30. Hafenburg, D.; Hommel, R.; Kleber, H. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. **Adv Biochem Eng.** 33: 53-93, 2003.
31. Healy, M.G.; Devine, C. M.; Murphy, R. Microbial production of biosurfactants. **Resour, Conserv Recycl.** 18: 41-57, 1996.
32. Holmberg K. Natural surfactants. **Curr Opin Colloid Interface Sci.** 6: 148-159, 2001.
33. Hsieh, F.; Li, M.; Lin, T.; Kao, S. Rapid detection and characterization of surfactin-producing *Bacillus subtilis* and closely related species based on PCR. **Curr Microbiol.** 49: 186-191, 2004.
34. Itoh, S.; Honda, H.; Tomita, F.; Suzuki, T. Rhamolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin. **J Antiobiot.** 24, 855- 1971.
35. Jacques, P.; Hbid, C.; Destain, J.; Razafindralambo, H.; Paquot, M.; Pauw, E.; Thonart, P. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. **Appl Biochem Biotech.** 77: 225-233, 1999.
36. Jarvis, F.G.; Johnson, M.J. A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas Acruginosa*. **J Am Chem Soc.** 71: 4124. 1949.
37. Chopineau, J.; McCafferty F.D.; Therisod M.; Klibanov, A.M. Production of biosurfactants from sugar alcohols and vegetable oils catalyzed by lipases in a nonaqueous medium. **Biotech and Bioeng.** 31: 208-214, 2004.
38. Jönsson, B.; Lindman, B.; Holmberg, K.; Kronberg, B. Introduction to surfactants Em: **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**, Jönsson, B.; Lindman, B.; Holmberg, K.; Kronberg, B., eds. John Wiley & Sons: New York, 1998, cap. 1.

39. Kachholz, T.; Schingmann, M. Possible food and agricultural application of microbial surfactants; an assessment. In **Biosurfactants and Biotechnology**. Kosaric, N.; Cairns, W. L.; Gray, N. C. C., eds.; Marcel Dekker: New York, 1987, cap. 7.
40. Kakinuma, A.; Hori, M.; Sugino, I.; Yoshida, M.; Isono, G.; Tamura, G.; Arima, K. Determination of the location of lactone ring in surfactin. **Agric Biol Chem.** 33:1523-1524, 1969. (A)
41. Kakinuma, A.; Sugino, H.; Isono, M.; Tamura, G.; Arima, K. Determination of fatty acid in surfactin and elucidation of the total structure of surfactin. **Agric Biol Chem.** 33: 973-976, 1969. (B)
42. Kakinuma, A.; Hori, M.; Isono, M.; Tamura, G.; Arima, K. Determination of amino acid sequence in surfactin, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*. **Agric Biol Chem.** 33: 971-997, 1969. (C)
43. Kakinuma, A.; Ouchida, A.; Shima, T.; Sugino, H.; Isono, M.; Tamura, G.; Arima, K. Confirmation of the structure of surfactin by mass spectrometry. **Agric Biol Chem.** 33, 1669-1671, 1969. (D)
44. Kim, H.; Yoon, B.; Lee, C.; Suh, H.; Oh, H.; Katsuragi, T.; Tani, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **J Ferment Bioeng.** 84: 41-46, 1997.
45. Kluge, B.; Vater, J.; Salnikow, J.; Eckart, K. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **FEBS Lett.** 231, 107-110, 1988.
46. Kosaric, N. Biosurfactants in industry. **Pure Appl Chem.** 64: 1731-1737, 1992.
47. Kowall, M.; Vater, J.; Kluge, B.; Stein, T.; Franke, P.; Ziessow, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **J Colloid Interface Sci.** 204, 1-8, 1998.
48. Lang, S. Biological amphiphiles (microbial surfactants). **Curr Opin Colloid Interface Sci.** 7: 12-20, 2002.
49. Leonel M.; Cereda, M.P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Sci Agric (Piracicaba, Braz.)**. 52: 299-304, 1995.
50. Lin, S. C.; Goursaud, J. C.; Kramer, P. J.; Georgiou G.; Sharma, M. M.; Production of biosurfactant by *Bacillus licheniformis* strain JF-2. In: **Microbial Enhancement of Oil Recovery – Recent Advances**, Donaldson, E. C., ed.; Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 1990.
51. Lin, S.C. Biosurfactants: recent advances. **J Chem Tech Biotechnol.** 66: 109-120, 1996.

52. Maier, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria **Adv Appl Microbiol.** 52, 101-121, 2003.
53. Makkar R.S.; Rockne, K.J. Comparison of synthetic surfactants and biosurfactants in enhancing biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environ Toxicol Chem.** 22: 2280-2292, 2003.
54. Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Structural characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45°C. **J Surfactants and Deterg,** 2:367-372, 1999.
55. Maneerat, S. Production of biosurfactants using substrates from renewable-resources. **J Sci Technol.** 27: 675-683, 2005.
56. Maróstica Jr. M.R.; Pastore, G.M. Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. **Food Chem.** 101: 345-350, 2007.
57. Maróstica Jr., Mário Roberto and Pastore, Gláucia Maria Biotransformation of citronellol in rose-oxide using cassava wastewater as a medium. **Ciênc Tecnol Aliment.** 26: 690-696, 2006
58. Mercade, M. E.; Manresa, M. A.; Robert, M.; Espuny, M. J.; Andres, C.; Guinea, J. Olive oil mill effluent(OOME). New substrate for biosurfactant production. **Bioresour Technol.** 43: 1-6, 1993.
59. Morán, A.C.; Olivera, N.; Commendatore, M.; Esteves, J. L.; Siñeriz, F. Enhancement of hydrocarbon waste biodegradation by addition of a biosurfactant from *Bacillus subtilis* O9. **Biodegradation.** 11: 65-71, 2000.
60. Mukherjee, S.; Das, P.; Sen, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends Biotechnol.** 24, 2006.
61. Mulligan, C. Environmental applications for biosurfactants. **Environ pollut.** 133: 183-198, 2005.
62. Mulligan, C. N.; Yong, R. N.; Gibbs, B. F. Mulligan, C. N.; Yong, R. N.; Gibbs, B. F. Metal Removal from Contaminated Soil and Sediments by the Biosurfactant Surfactin. **Environ Sci Technol.** 33: 3812-3820, 1999.
63. Mulligan, C.N.; Yong, R.N.; Gibbs B.F. Heavy metal removal from sediments by biosurfactants. **J Hazard Mater.** 85: 111-125, 2001.
64. Nitschke, M. Pastore, G.M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Appl Biochem Biotechnol.** 106: 295-302, 2003.

65. Nitschke, M. Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
66. Nitschke, M.; Ferraz, C.; Pastore, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Braz J Microbiol.** 35: 81-85, 2004
67. Nitschke, M.; Haddad, R.; Costa, G.A.N.; Gilioli, R.; Meurer, E.C.; Gatti, M.S.; Eberlin, M.N.; Höehs, N.F.; Pastore, G.M.; Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. **Food Sci Biotechnol.** 13: 591-596, 2004.
68. Ohno, A.; Takashi, A.; Shoda, M. Production of a lipopeptide antibiotic, surfactin, by recombinant *Bacillus subtilis* in solid state fermentation. **Biotechnol Bioeng.** 47: 209. 1995.
69. Olivera, N. L.; Commendatore, M. G.; Moran, A. C.; Esteves, J. L. Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. **J Ind Microbiol Biotechnol.** 25: 70-73, 2000.
70. Pandey, A.; Soccol, C.R.; Nigam, P.; Brand, D.; Mohan, R.; Roussos, S. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochem Eng J.** 6: 153-162, 2000.
71. Pantaroto, S.; Cereda, M.P. Linamarina e sua decomposição no ambiente Em: **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca - vol 4.** Cereda, M.P., ed. Fund. Cargill: São Paulo, 2000, cap. 2.
72. Pastore, G.M.; Santos, C.F.C.; Nitschcke, M. **Processo de Produção de Biosuractante por *Bacillus subtilis*, utilizando resíduo da indústria de mandioca.** Br. Pat. PI 0303853-0. 2003.
73. Polastro, L.R.; Boso, L.M.; Andrade-Sobrinho, L.G.; Lima Neto, B.; Franco, D.W. Compostos nitrogenados em bebidas destiladas: cachaça e tiquira. **Ciênc Tecnol Aliment.** 21: 78-81, 2001.
74. Ponte, J.J. Uso da manipueira como insumo agrícola: defensivo e fertilizante Em: Em **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**; Cereda, M. P., ed.; Fund. Cargill: São Paulo, 2000, cap. 15.
75. Prince, R. C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. **Crit Rev Microbiol.** 19: 217-242, 1993.
76. Razafindralambo, H.; Paquot, M.; Baniel, A.; Popineau, Y.; Hbid, C.; Jacques, P.; Thonart, P. Foaming properties of surfactin, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. **J Am Oil Chem Soc.** 73: 149-151, 1996.

77. Ribas, Maria Magdalena Ferreira and Barana, Ana Cláudia Start-up adjustment of a plug-flow digester for cassava wastewater (*manipueira*) treatment. **Sci Agric (Piracicaba, Braz.)**.60: 223-229, 2003.
78. Rodrigues, M.I.; Iemma, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**, Editora Casa do Pão: Campinas, 2005, cap. 4-7.
79. Sen, R.; J. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. **Chem Tech Biotechnol.** 68: 263-270, 1997.
80. Sen, R.; Swaminathan, T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. **Appl Microbiol Biotechnol.** 47: 358-363, 1997.
81. Sen, R.; Swaminathan, T. Response modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. **Biochem Eng J.** 21: 141-148, 2004.
82. Sheppard, J.D.; Mulligan, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Appl Microbiol Biotechnol.** 27: 110-116, 1987.
83. Théry, H.; Mello, N.A.; Dinâmicas do mundo rural. Em Atlas do Brasil: **Disparidades e Dinâmicas do Território**; Edusp – Editora da Universidade de São Paulo: São Paulo, 2005, cap 5.
84. Thompson, D. N.; Fox, S. L.; Bala, G. A. Biosurfactants from potato process effluents. **Appl Biochem Biotechnol.** 84: 917-929, 2000.
85. Van Dyke, M.I.; Lee, H.; Trevors, J.T. Applications of microbial surfactants. **Biotech Adv.** 9: 241-252, 1991.
86. Velikonja, N.; Kosaric, N. Biosurfactants in food application Em: **Biosurfactants: production, properties, applications**. Kosaric, N., ed. Marcel Decker: New York, 1993, cap. 16.
87. Vetter, J. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon.** 38: 11-36, 2000.
88. Waters, J. The analysis of low concentrations of surfactants in laboratory test liquors and environmental samples Em: **Recent developments in the Analysis of Surfactants**, Porter, M.R., ed. Society of Chemical Industry: Crown House, UK, 1991, cap. 6.
89. Wei, Y. Chu, I. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. **Biotech Lett.** 24: 479-482, 2002.

90. Wei, Y. Chu, I. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Prog.** 20: 979-983, 2004.
91. Wosiacki, G.; Fioretto, A.M.C.; Almeida, M.M.; Cereda, M.P. Utilização da manipueira para produção de biomassa Em **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**; Cereda, M. P., ed.; Fund. Cargill: São Paulo, 2000, cap. 12.
92. Yeh, M.; Wei, Y.; Chang, J. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochem.** 41: 1799-1805, 2006.
93. Zajic, J. E.; Seffens, W. Biosurfactants. **CRC Crit Rev Biotechnol.** 1: 87-108, 1984.

CAPÍTULO 2

OTIMIZAÇÃO DO PRÉ-TRATAMENTO DE MANIPUEIRA UTILIZADA COMO SUBSTRATO PARA PRODUÇÃO DE BIOSURFACTANTES DE *Bacillus subtilis* USANDO A METODOLOGIA DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA.

RESUMO

O uso de resíduos agroindustriais em processos biotecnológicos tem se destacado em função da necessidade de redução do volume de resíduos que seriam descartados diretamente no ambiente ou que gerariam custos para seu tratamento. Além disso, sua utilização possibilita a redução dos custos da produção biotecnológica. A manipueira, que é um resíduo da produção de farinha de mandioca e fécula, é bastante danosa ao ambiente. O uso de manipueira como substrato em processos biotecnológicos tem sido demonstrado largamente na literatura. O objetivo deste trabalho foi otimizar os parâmetros de pré-tratamento da manipueira para aumentar o rendimento no processo de produção de biossurfactantes de *Bacillus subtilis* LB5a, bem como a avaliação da possibilidade do uso de tratamentos mais brandos no preparo deste substrato. Utilizando a técnica de planejamento experimental multifatorial fracionado e composto central rotacional, foram definidos e avaliados níveis em cada parâmetro controlado durante o processo de pré-tratamento, no caso: tempo de aquecimento, temperatura de aquecimento, tempo de centrifugação e força centrífuga.

Após os tratamentos, a manipueira foi acondicionada em frascos, esterilizada, inoculada com *Bacillus subtilis* e incubada por 24 h a 30°C e agitação de 150 rpm. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas para remoção de células e tiveram seus valores de tensão superficial medidos. Os resultados foram avaliados tendo a tensão superficial utilizada como resposta, pois a redução da tensão superficial está diretamente ligada à produção de biossurfactante. Na primeira etapa os dados encontrados mostram que o tempo de aquecimento, a aceleração centrífuga e o tempo de centrifugação não foram significativos. Na segunda etapa foram encontradas as faixas ótimas de temperatura bem como foi constatada a importância da centrifugação, no entanto em níveis diferentes dos descritos na etapa anterior do experimento.

Palavras-chave: *Biossurfactante, manipueira, Bacillus subtilis, Método de superfície de resposta, surfactina, otimização.*

1. INTRODUÇÃO

O termo biossurfactante denomina um grande número de compostos diferentes entre si produzidos por microrganismos que possuem em comum a propriedade de promover emulsificação de misturas de água-óleo (Hommel et al, 1993). Esses compostos são produzidos por uma grande variedade de microrganismos, entre eles bactérias, leveduras e fungos (Healy et al 1996; Mulligan, 2005). A maioria destes compostos, no entanto, são encontrados em bactérias (Desai et al, 1993; Healy et al 1996; Maier, 2003).

Várias espécies de microrganismos do gênero *Bacillus* são reconhecidas como produtoras de lipopeptídeos com elevada atividade superficial. Os lipopeptídeos estão entre os biossurfactantes mais estudados, especialmente os produzidos por *Bacillus*: surfactina, iturina, bacilomicina, fengicina, liquenisina etc. (Lin et al 1994; Deleu et al 1999; Jacques et al, 1999; Ahimou et al 2000; Holmberg, 2001; Maier, 2003). Entre estes, destaca-se a surfactina, que é produzida pelo *Bacillus subtilis*, que é um dos mais potentes biossurfactantes conhecidos por reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m (Arima et al 1968; Cooper et al 1981; Peypoux et al, 1999) além de exibir efeitos bactericida, fungicida e antiviral. (Vollenbroich et al 1997; Maier 2003; Cameotra et al, 2004; Nitschke et al 2004 B; Stein, 2005).

A produção dos lipopeptídeos de *Bacillus subtilis*, conforme tem sido apontado, está associada à fase de crescimento logarítmico (Cooper et al, 1981; Vater, 1986; Kluge, 1988; Kim et al, 1997; Costa, 2005). Isso tem elevado significado quando são considerados os aspectos nutricionais aos quais os microrganismos são submetidos, pois para haver crescimento da cultura é necessário um adequado balanço de nutrientes. Carboidratos como frutose e glicose, íons como Mn^{2+} , Fe^{2+} e NH_4^+ além de nitrogênio orgânico e fosfato são considerados de fundamental importância para o desenvolvimento de culturas de *Bacillus subtilis* (Cooper et al, 1981; Vater, 1986; Sandrin et al 1990; Lin, 1996; Sen, 1997; Wei et al 2004; Gu et al, 2005).

Alguns estudos sugerem a manipueira como substrato para produção de biomassa oleaginosa por *Trichosporon* sp (Wosiacki et al, 2000), ácido cítrico por *Aspergillus niger* (Leonel et al, 1995), bioaromas frutais por *Geotrichum fragans* (Damasceno et al, 2003) e na utilização como meio de cultura na biotransformação de limoneno em R-(+)- α -terpineol (Maróstica Jr. et al, 2007). Outros apontam a manipueira

como um bom substrato para produção de biossurfactante, atingindo valores de tensão menores dos que os alcançados em outros meios. Isso pode estar relacionado à composição da manipueira, que contém quantidade significativa todos os macro e micronutrientes apontados como importantes nesse processo (Costa, 2005; Nitschcke, 2006).

O uso de metodologia estatística oferece importante caminho para otimização de processos biotecnológicos. Essas metodologias estão sendo rotineiramente utilizada para estudos de otimização em diversos processos biotecnológicos e industriais (Jacques et al, 1999; Beg et al, 2003; Sen et al, 2004; Cladera-Oliveira et al 2004; Rodrigues et al, 2005). Esta utilização ocorre fundamentalmente por um motivo importante: o método clássico de otimização dos efeitos de fatores em um processo é realizado através da variação de apenas um parâmetro por vez enquanto os outros são mantidos constantes. Esta estratégia pode consumir tempo e requer um elevado número de experimentos além de não avaliar as interações entre duas ou mais variáveis estudadas. Contudo, o uso de técnicas estatísticas para planejamento experimental torna possível estudar a variação simultânea de fatores com um reduzido número de experimentos (Sen et al 1997, Rodrigues et al, 2005).

O efeito de vários fatores nutricionais, ambientais entre outros têm sido avaliados na produção de biossurfactantes. Diversos estudos apresentam resultados para otimização de vários aspectos da produção de surfactina e outros lipopeptídeos em meio sintético em bancada. As variáveis estudadas vão desde as condições ambientais (Sen et al 1997; Santos, 2001), a quantidade e o tempo de incubação do inóculo (Sen et al, 2004), composição do meio (Cooper et al, 1981; Sen, 1997; Davis et al 1999; Wei et al, 2004; Lee et al, 2004; Gu et al 2005) ou à combinação de

composição do meio e condições ambientais (Jacques et al. 1999; Cladera-oliveira et al, 2004).

Estudos anteriores com o objetivo de conseguir uma maior produção de surfactante em manipueira foram reportados (Nitschke, 2004). No entanto, nenhum estudo relativo à otimização com metodologia estatística do pré-tratamento nem de qualquer outra etapa do processo produtivo utilizando manipueira foi executado anteriormente. Neste trabalho foi otimizado o pré-tratamento da manipueira utilizada como substrato para a produção de biossurfactantes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Metodologia Experimental

2.1.1. Microrganismo

Foi utilizada uma linhagem de *Bacillus subtilis* produtora de biossurfactante previamente isolada e identificada como LB5a, pertencente à coleção de cultura do Laboratório de Bioaromas do DCA/FEA/Unicamp (Nitschke et al, 2003). A cultura foi mantida em tubos de ágar nutriente inclinado a 4 °C e replicada periodicamente.

2.1.2. Preparo do substrato

A manipueira foi aquecida de acordo com as temperaturas definidas para o delineamento do experimento. O tempo de aquecimento também foi avaliado. Neste

caso, foi considerado o tempo no qual a manipueira permaneceu após atingir a temperatura especificada. Após aquecimento, a manipueira foi resfriada até aproximadamente de 20°C em banho de gelo. Em seguida foi centrifugada à temperatura de 5°C nos parâmetros tempo e aceleração centrífuga (G) também definidos para o experimento. Os limites e os níveis das variáveis testadas nos experimentos estão nas Tabelas 1 e 2.

Após os tratamentos, uma fração 15 ml de manipueira de cada combinação de tratamentos foi acondicionada em erlenmeyer de 100 ml e esterilizada em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

2.1.3. Preparo do inóculo

A partir da cultura de *Bacillus subtilis* armazenada em tubos com ágar nutriente inclinado, alçadas foram transferidas para um erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de caldo nutriente e incubadas a 30°C por 12h em banho com agitação de 150 rpm. Após o período de incubação a cultura foi homogeneizada e 1 ml foi transferido para cada um dos erlenmeyers de 100 ml contendo 15 ml manipueira estéril.

2.1.4. Processo fermentativo

Os erlenmeyers com manipueira foram incubados a 30°C e agitação de 150 rpm por 24 h. Após a incubação, o substrato foi centrifugado para a eliminação de células seguida pela respectiva medida da tensão superficial (TS). A TS foi determinada com um tensiômetro modelo K12 (A. KRÜSS Optronic GmbH, Alemanha).

2.2. Delineamento experimental

Para a identificação das possíveis variáveis não significativas e, em seguida, os níveis ótimos nas variáveis significativas, foi utilizada, neste trabalho, uma estratégia seqüencial de planejamentos que consistiu de dois delineamentos (Rodrigues et al, 2005).

O primeiro foi um fatorial fracionado 2^{4-1} com três repetições no ponto central num total de 11 experimentos (Rodrigues et al, 2005). As variáveis estudadas foram: tempo de aquecimento (min), temperatura de aquecimento ($^{\circ}\text{C}$), tempo de centrifugação (min) e aceleração centrífuga da centrifugação ($\text{G} \times 10^3$). A Tabela 1 apresenta os valores usados em cada nível das variáveis do delineamento, enquanto a Tabela 3 apresenta a matriz do planejamento com a resposta avaliada, neste caso a medida tensão superficial (mN/m) do meio de cultura ao final do período de 24 horas de incubação.

Os resultados foram analisados no programa StatisticaTM onde foi realizada uma estimativa dos efeitos das variáveis sobre a resposta analisada.

Tabela 1. Valores utilizados no delineamento fatorial fracionado.

Variáveis		Níveis		
		-1	0	+1
Temperatura aquecimento ($^{\circ}\text{C}$)	x_1	45	70	95
Tempo aquecimento (min)	x_2	1	5	9
Tempo de centrifugação (min)	x_3	10	15	20
Aceleração centrífuga ($\text{G} \times 10^3$)	x_4	5	10	15

Mesmo encontrando apenas uma variável significativa, a temperatura de aquecimento (x_1), outras duas variáveis foram selecionadas para o delineamento central rotacional - DCCR, pois representam custos adicionais ao tratamento que poderiam ser eliminados do processo.

Após seleção das variáveis no delineamento anterior foi realizado um delineamento composto central rotacional (DCCR) com três variáveis totalizando 17 experimentos (Khuri et al, 1987; Myers et al, 2002; Rodrigues et al, 2005). As variáveis foram codificadas conforme a seguinte equação:

$$x_i = (X_i - X_0)/\Delta X_i$$

(Equação 1)

Onde: x_i é o valor adimensional de uma variável independente, X_i é o valor real de uma variável independente, X_0 é o valor real no ponto central e ΔX_i a diferença entre o valor real (X_i) e o ponto central (X_0).

As variáveis estudadas neste caso foram: temperatura de aquecimento ($^{\circ}\text{C}$), aceleração centrífuga da centrifugação ($\text{G} \times 10^3$) e tempo de centrifugação (min). A Tabela 2 apresenta os valores usados em cada nível das variáveis do delineamento, enquanto a Tabela 4 apresenta a matriz do planejamento com a resposta avaliada, neste caso a medida tensão superficial (mN/m) do meio de cultura ao final do período de incubação.

Para um sistema de 3 variáveis o modelo foi baseado na seguinte fórmula:

$$\hat{Y} = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

(Equação 2)

Onde: \hat{Y} = variável dependente.

Tabela 2. Valores utilizados no DCCR.

Variáveis		Níveis				
		-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura aquecimento (°C)	x_1	45	55	70	85	95
Aceleração centrífuga ($G \times 10^3$)	x_3	0	4	10	16	20
Tempo de centrifugação (min)	x_4	0	4	10	16	20

Os resultados foram analisados no programa Statistica™. O modelo permitiu a avaliação da média (b_0) dos efeitos lineares (b_1x_1 , b_2x_2 e b_3x_3), quadráticos ($b_{11}x_1^2$, $b_{22}x_2^2$ e $b_{33}x_3^2$) e de interação das variáveis independentes ($b_{12}x_1x_2$, $b_{13}x_1x_3$ e $b_{23}x_2x_3$) em função das variáveis dependentes. Os valores ótimos foram obtidos pela resolução da equação de regressão (khuri et al, 1987; Rodrigues et al, 2005), na qual foram eliminados os parâmetros estatisticamente não significativos, e pelas linhas de contorno da superfície de resposta. Em seguida, os valores preditos foram comparados com os valores analisados (Rodrigues et al, 2005). Após o DCCR, foi realizada uma análise das superfícies.

2.3. Definição dos pontos ótimos

Para respostas dadas em uma função linear, o ótimo foi considerado menor valor de tensão dentro dos limites estudados.

Para respostas dadas em funções quadráticas, estas equações foram derivadas e a solução da incógnita, que é igual ao vértice da parábola, foi considerado como o ponto ótimo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Delineamento fatorial fracionado 2^{4-1}

O primeiro delineamento é detalhado na Tabela 3.

Tabela 3. Matriz do delineamento fatorial fracionado 2^{4-1} e resposta tensão superficial (mN/m).

Variáveis Ensaio	Níveis codificados				Níveis reais				Tensão superficial (mN/m)
	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	Tempo aquecim. (min)	Temperat. (°C)	Tempo centrifug. (min)	Força centrífuga (G x 10 ³)	
1	-1	-1	-1	-1	1	45	10	5	27,6
2	+1	-1	-1	+1	9	45	10	15	28,2
3	-1	+1	-1	+1	1	95	10	15	27,1
4	+1	+1	-1	-1	9	95	10	5	27,2
5	-1	-1	+1	+1	1	45	20	15	27,8
6	+1	-1	+1	-1	9	45	20	5	28,4
7	-1	+1	+1	-1	1	95	20	5	27,1
8	+1	+1	+1	+1	9	95	20	15	27,1
9	0	0	0	0	3	70	15	10	27,1
10	0	0	0	0	3	70	15	10	27,3
11	0	0	0	0	3	70	15	10	27,2

Dentre as variáveis estudadas, somente a temperatura de aquecimento foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) para a medida de tensão superficial na faixa estudada. A variável significativa apresentou efeito negativo, ou seja, quando a temperatura passou de 45°C para 95°C ocorreu uma redução da tensão superficial do meio de cultura, o que indica maior quantidade de biossurfactante produzido (Nitschke, 2005). Isso pode estar relacionado a gelatinização do amido da mandioca, que ocorre no intervalo de 58-70°C (Bobbio et al, 2003). Com a gelatinização, o amido perde sua estrutura granular condensada permitindo que a amilose e amilopectina passem para o meio e não sejam eliminadas durante o processo de centrifugação. Sabe-se que

microrganismos do gênero *Bacillus* são bons produtores de amilases (Thoma et al 1970, Huang, 2004) estas enzimas degradam o amido liberando glicose que é utilizado e, de acordo com Sandrin et al (1990), a glicose, a frutose e a sacarose são as melhores fontes de carbono para a síntese de surfactina.

A variável temperatura foi mantida nos mesmos níveis para o segundo delineamento apesar da constatação de que sua elevação aumenta a produção de surfactante, pois para que seja possível um aquecimento da manípueira em temperaturas maiores que a da ebulição da água, se faz necessários o uso de equipamentos que trabalhem com elevadas pressões, fato que não foi considerado pertinente aos objetivos deste trabalho.

Apesar de não apresentar efeitos significativos, as variáveis tempo de centrifugação e aceleração centrífuga foram mantidos no estudo, pois, em processos piloto e em escala industrial esta etapa tem impacto nos custos de produção. Para o segundo delineamento essas variáveis foram alteradas de forma que um dos pontos axiais, no caso $-\alpha (-1,68 x_i)$, fosse igual a zero, pois, desta forma, seria avaliada a real necessidade desta etapa no processo ou se seria possível atingir bons níveis de produção de biosurfactante mesmo com o abrandamento dos parâmetros avaliados. Apenas uma variável, o tempo de aquecimento, foi eliminada da etapa posterior, sendo fixada no seu nível inferior (1 minuto). Provavelmente não houve diferença significativa no tempo pelo fato de que, para cada um dos níveis de temperatura utilizados no experimento, a manípueira passou por um processo gradual de aquecimento fazendo com que, até certo ponto, não houvesse uma diferença muito grande entre os tempos analisados, especialmente para temperaturas mais elevadas.

A definição dos níveis para o segundo delineamento está descrita na Tabela 2.

3.2. Delineamento Composto Central Rotacional

Após a seleção de variáveis, foi feito um delineamento composto rotacional central (DCCR) de 3 variáveis (2^3) com seis pontos axiais e três pontos centrais (PC). Da mesma forma que no delineamento anterior, a resposta foi a medida da tensão superficial do meio de cultura após 24 horas de incubação a 30°C.

O segundo delineamento do trabalho incluindo a resposta está detalhado na Tabela 4.

Tabela 4. Matriz do DCCR com três variáveis e resposta em medida de tensão superficial (mN/m).

Variáveis Ensaio	Níveis codificados			Níveis experimentais			Resposta
	x_1	x_2	x_3	Temperatura (°C)	Força centrífuga ($G \times 10^3$)	Tempo centrifugação (min)	Tensão superficial (mN/m)
1	-1	-1	-1	55	4	4	27,09
2	+1	-1	-1	85	4	4	26,64
3	-1	+1	-1	55	16	4	26,55
4	+1	+1	-1	85	16	4	26,02
5	-1	-1	+1	55	4	16	26,80
6	+1	-1	+1	85	4	16	26,01
7	-1	+1	+1	55	16	16	26,14
8	+1	+1	+1	85	16	16	25,84
9	-1,68	0	0	45	10	10	26,71
10	+1,68	0	0	95	10	10	25,91
11	0	-1,68	0	70	0	10	27,35
12	0	+1,68	0	70	20	10	25,98
13	0	0	-1,68	70	10	0	27,26
14	0	0	+1,68	70	10	20	26,07
15	0	0	0	70	10	10	26,18
16	0	0	0	70	10	10	26,07
17	0	0	0	70	10	10	26,10

A partir dos resultados mostrados na Tabela 4, foram calculados os coeficientes de regressão, o erro padrão, o valor de t_{calc} e o p-valor para os termos lineares,

quadráticos e interações (Tabela 5). Seis termos foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) sendo então usados para a construção do modelo que representa o comportamento da tensão superficial (Equação 2). Os demais termos foram incluídos na falta de ajuste.

Tabela 5. Coeficientes de regressão para a resposta analisada.

	Coeficientes de regressão *	t_{calc}	p-valor
Interação/ Média	26,13	797,4	< 0,0001
x_1	-0,2501	-16,25	0,0038
x_2	-0,3366	-21,88	0,0021
x_3	-0,2571	-16,71	0,0036
x_1^2	0,03401	2,008	0,1823
x_2^2	0,1277	7,541	0,0171
x_3^2	0,1595	9,420	0,0110
x_1x_2	0,05125	2,549	0,1255
x_1x_3	-0,01375	-0,6839	0,5646
x_2x_3	0,04125	2,052	0,1766

* Os termos estatisticamente significativos ($p < 0,05$) estão em destaque.

O modelo de segunda ordem codificado construído é apresentado na Equação 3:

$$\hat{Y} = 26,13 - 0,25 (x_1) - 0,34 (x_2) + 0,13 (x_2)^2 - 0,26 (x_3) + 0,16 (x_3)^2$$

(Equação 3)

Substituindo a codificação pelo nome das variáveis analisadas (Tabela 1), temos a Equação 4:

$$\text{Tensão superficial} = 26,17 - 0,25 (\text{temperatura}) - 0,34 (\text{acel centrífuga}) + 0,12 (\text{acel centrífuga})^2 - 0,26 (\text{tempo centrif}) + 0,15 (\text{tempo centrif})^2$$

(Equação 4)

A validade do modelo considerando somente os termos estatisticamente significativos foi verificada através da análise de variância ANOVA (Tabela 6). A análise de variância é essencial para testar a significância e a adequação do modelo (Khuri et al, 1987; Myers et al, 2002; Rodrigues et al, 2005).

Tabela 6. Análise de variância (ANOVA).

Fonte de variação	Soma dos quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Quadrado médio (QM)	F_{calc}	p-valor
Regressão	3,75	5	0,75	6,20	0,00571
Resíduos	1,33	11	0,12		
Total	4,08	16			

$$F_{\text{tab } 0,05 (5, 11)} = 3,20 \quad R^2 = 0,8988$$

O coeficiente de determinação (R^2), que mede o ajuste ao modelo, que foi de 0,8988, mostra que o modelo pode explicar 89,88% da variabilidade da resposta e apenas 10,12% das variações não são explicadas pelo modelo, o que indica um alto ajuste. Outros indicativos que validam o modelo foram avaliados. O valor de F calculado ou F de Fisher (F_{cal}) foi 6,20, portanto maior que o de F tabelado ($F_{t 0,05(5,11)}$) que foi de 3,20. O p-valor também foi baixo, demonstrando a significância do modelo de regressão (Myers et al, 2002; Rodrigues et al 2005). Os resultados apresentados na ANOVA indicam haver concordância entre os valores experimentais e os previstos (Figura 1).

Para uma verificação complementar foi montada, a partir da Equação 3, a Tabela 7 que mostra as respostas previstas pelo modelo assim como seus erros em relação aos dados experimentais, calculados em diferença percentual $[(Y-\hat{Y}) \cdot 100/Y]$.

Analisando estes dados observa-se que as respostas previstas pelo modelo são bastante semelhantes em praticamente todos os ensaios. Os maiores desvios, que foram da ordem de 2%, foram os ensaios realizados nos pontos axiais. Erros dessa ordem são aceitos já que os modelos sofrem maior desvio justamente nos pontos extremos (Rodrigues et al, 2005). Apesar da faixa de variação ter sido muito estreita, o modelo é válido pois a repetibilidade do ponto central foi boa por este motivo o erro não é suficiente para explicar a variação dos resultados experimentais.

Tabela 7. Comparação entre resultado experimental e resultados previstos pelo modelo.

Ensaio	Dados experimentais (Y)	Valores Preditos (\hat{Y})	Diferença (Y - \hat{Y})	Diferença (%)
1	27,09	27,05	0,04	0,1
2	26,64	26,55	0,09	0,3
3	26,55	26,38	0,17	0,7
4	26,02	25,88	0,14	0,6
5	26,80	26,54	0,26	1,0
6	26,01	26,04	-0,03	-0,1
7	26,14	25,86	0,28	1,1
8	25,84	25,36	0,48	1,8
9	26,71	26,59	0,12	0,4
10	25,91	25,75	0,16	0,6
11	27,35	26,78	0,57	2,1
12	25,98	25,64	0,34	1,3
13	27,26	26,66	0,60	2,2
14	26,07	25,80	0,27	1,0
15	26,18	26,17	0,01	0,0
16	26,07	26,17	-0,10	-0,4
17	26,10	26,17	-0,07	-0,3

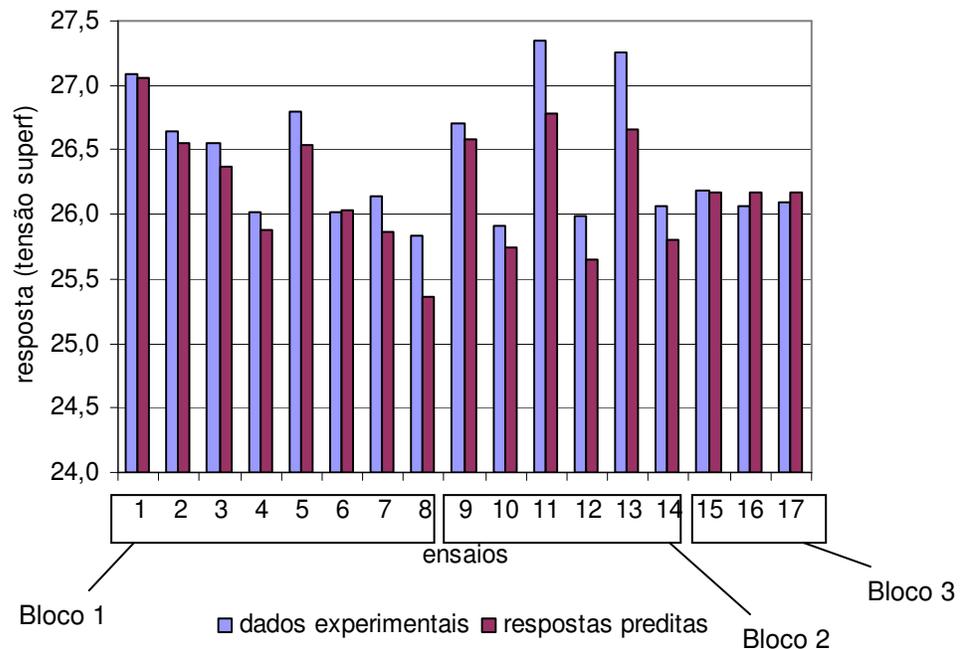


Figura 1. Comparação entre os valores preditos e experimentais.

Os ensaios estão separados em três blocos: o primeiro com os 8 ensaios nos pontos -1/+1, o segundo com os 6 pontos axiais e terceiro com os 3 pontos centrais.

Após as verificações da validade do modelo, foi possível construir as superfícies de respostas (Figuras 2, 3 e 4) e definir as regiões de interesse.

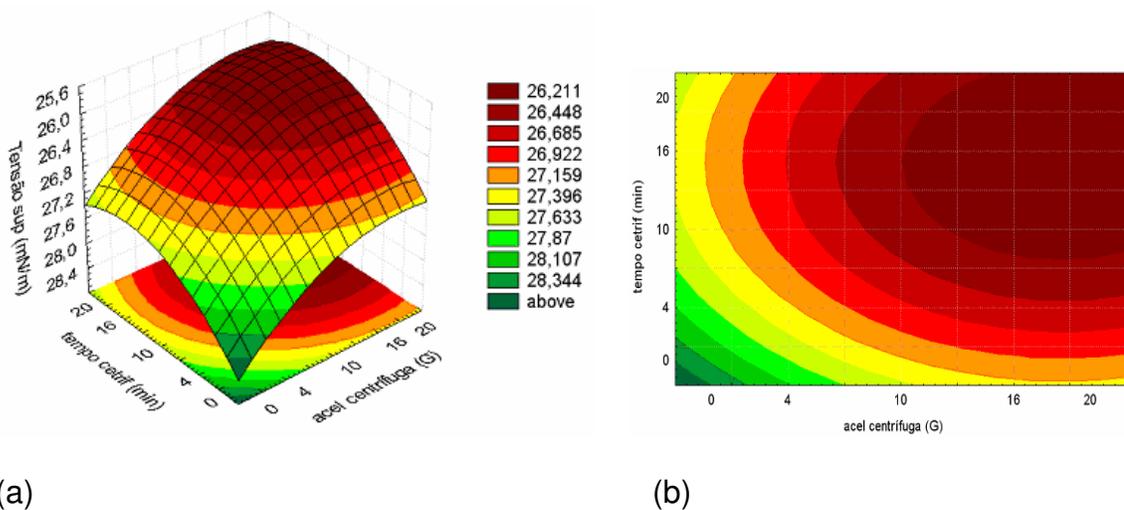


Figura 2. Superfície de resposta e curvas de contorno para tensão superficial do meio em função do tempo de centrifugação (min) e da aceleração centrífuga ($G \times 10^3$).

Quando são analisadas a superfície de resposta (a) e as curvas de contorno (b) da Figura 2 observa-se que os maiores valores de tensão foram encontrados em valores próximos a zero, ou seja, a não realização da operação. Esse resultado comprova a importância da etapa de centrifugação para a produtividade do biossurfactante e a pertinência da inclusão desses parâmetros na segunda etapa da estratégia de planejamentos seqüenciados. Ressalta-se a diferença entre os intervalos analisados no primeiro e no segundo delineamento. A grande área considerada ótima nas condições avaliadas mostra que é possível fazer alterações nas condições da etapa de centrifugação da manipueira sem prejuízo à produção de biossurfactante. A faixa considerada ideal para a aceleração centrífuga ($G \times 10^3$) foi acima de 10. Para o tempo de centrifugação, valores acima de 10 minutos foram suficientes para que os menores valores de tensão fossem atingidos. Foi observado também que para tempos elevados, ou seja, acima de 20 minutos, há uma tendência de elevação na tensão superficial do substrato. Os trabalhos anteriores referentes ao pré-tratamento da manipueira foram realizados nas seguintes condições: $10,1G \times 10^3$ por 20 minutos (Nitschke, 2004), $8G \times 10^3$ por 20 minutos (Nitschke et al, 2004 B; Nitschke et al, 2006) e $15,7G \times 10^3$ por 20 minutos (Costa, 2005).

Baseando-se na Equação 4, temos que a variação da resposta para as duas variáveis foi definida em duas funções quadráticas descritas abaixo:

$$\hat{Y}(\text{acel centrífuga}) = 26,13 - 0,34 (x_2) + 0,13 (x_2)^2$$

(Equação 5)

$$\hat{Y}(\text{tempo centrifug}) = 26,13 - 0,26 (x_3) + 0,16 (x_3)^2$$

(Equação 6)

Onde \hat{Y} = variável dependente (tensão superficial).

Derivando e resolvendo as equações lineares formadas temos os valores máximos ou ótimos:

$$\hat{Y}_{\min} (\text{acel centrífuga}) = 17,85 \text{ G} \times 10^3 \text{ e } \hat{Y}_{\min} (\text{tempo centrífug}) = 14,86 \text{ min}$$

Onde: \hat{Y}_{\min} = menor valor de tensão superficial.

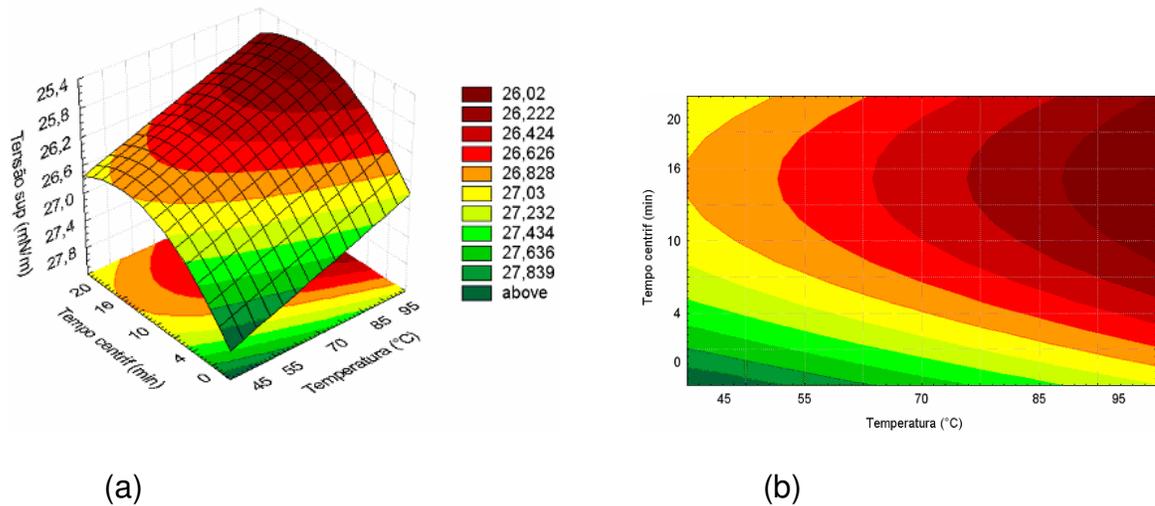


Figura 3. Superfície de resposta e curvas de contorno para tensão superficial do meio em função do tempo de centrifugação (min) e da temperatura de aquecimento (°C).

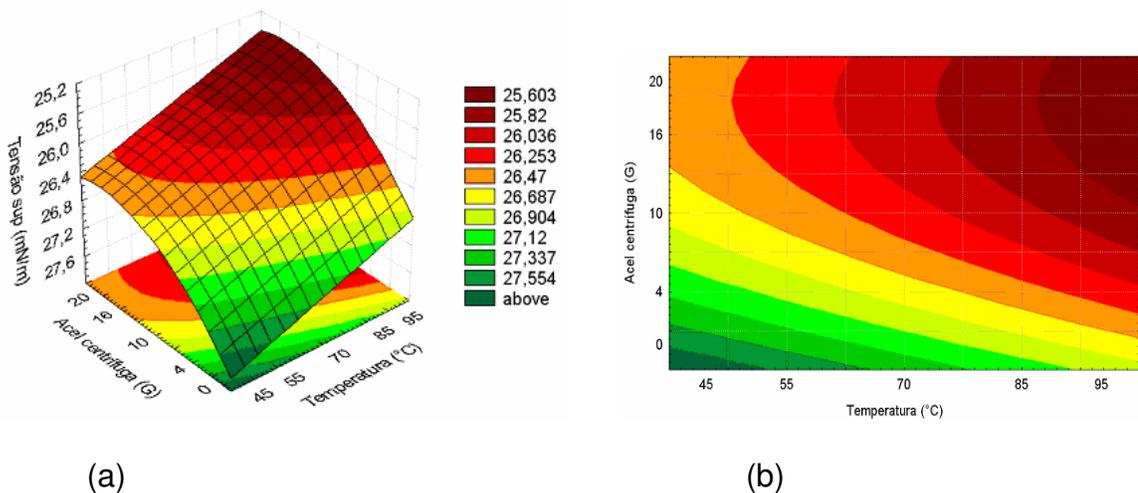


Figura 4. Superfície de resposta e curvas de contorno para tensão superficial do meio em função da aceleração centrífuga ($G \times 10^3$) e da temperatura de aquecimento (°C).

Em relação à temperatura de aquecimento da manipueira quando são analisadas as superfícies, é possível ver claramente o seu comportamento linear como descrito na Equação 7. Quanto à faixa ideal de trabalho, esta situa-se acima de 85°C e tal como discutido anteriormente, isso se deve, provavelmente, à gelatinização do amido de mandioca. Nos trabalhos anteriores reportados por Nitschke (2004), Nitschke et al (2004 B), Costa (2005) e Nitschke et al (2006) a manipueira foi submetida a aquecimento sem temperatura controlada, sendo descrito apenas que foi fervida por um período também não controlado.

A função que representa o efeito da temperatura (x_1) sobre a resposta no intervalo estudado foi:

$$\hat{Y}(\text{temperatura}) = 26,13 - 0,25(x_1)$$

(Equação 7)

Onde \hat{Y} = variável dependente (tensão superficial).

4. CONCLUSÃO

Através dos resultados encontrados foi possível estabelecer os níveis ideais para cada variável dentro dos limites estudados. Os valores mais adequados encontrados foram: temperatura de aquecimento superior a 85°C, sendo o ótimo 95°C, tempo de aquecimento de 1 minuto, a aceleração centrífuga de 16 a 20 $G \times 10^3$, com ótimo em 17,85 $G \times 10^3$ e o tempo de centrifugação de 10 a 20 minutos com ótimo em 14,86 minutos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahimou, F.; Jaccques, P.; Deleu, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme Microb Technol.** 27: 749-754, 2000.
2. Arima, K.; Kakinuma, A.; Tamura, G. Surfactin, a cristalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochem Biophys Res Commun.** 31: 488-494, 1968.
3. Beg, Q.K.; Sahai, V.; Gupta, R. Statistical media optimization and aljaline protease production from *Bacillus mojavensis* in a bioreactor. **Process Biochem.** 39: 203-209, 2003.
4. Bobbio, F.O.; Bobbio, P.A. Carboidratos Em: **Introdução à química de alimentos.** Bobbio, F.O.; Bobbio, P.A. eds. Varela: São Paulo, 2003, cap 1.
5. Cameotra S.S.; Makkar, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Curr Opin Microb.** 7: 262-266, 2004.
6. Carrillo, C.; Teruel, J.A.; Aranda, F.J.; Ortiz, A. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. **Bioch Bioph Acta.** 1611: 91-97, 2003.
7. Cladera-Oliveira, F.; Canon, G.R.; Brandelli, A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. **Biochem Eng J.** 21: 53-58, 2004.
8. Cooper, D.G.; Macdonald, C.R.; Duff, S.J.B.; Kosaric, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Appl Environ Microbiol.** 42: 408-412, 1981.
9. Costa, G.A.N. Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. **Dissertação de Mestrado,** Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2005.
10. Damasceno, S.; Cereda, M.P.; Pastore, G.M.; Oliveira, J.G. Production of volatile compounds by *Geotrichum fragans* using cassava wastewater as substrate. **Process Biochem.** 39: 411-414, 2003.
11. Davis, D.A.; Lynch, H. C.; Varley, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme Microb Technol.** 25: 322-329, 1999.
12. Deleu, M.; Paquot, M.; Nylander, T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface-implications fopr the effect of fengycin on biological membranes. **J Colloid Interface Sci.** 283:358-365, 2005.

13. Deleu, M.; Razafindralambo, H.; Popineau, Y.; Jacques, P.; Thonart, P.; Paquot, M. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Colloids Surf, A**. 152: 3-10, 1999.
14. Desai, J. D.; Desai, A. J.; Production of biosurfactants Em **Biosurfactants: production, properties, applications**. Kosaric, N., ed. Marcel Decker: New York, 1993, cap. 2.
15. Gu, X.; Zheng, Z.; Yu, H.; Wang, J.; Liang, F.; Liu, R. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. **Process Biochem**. 40: 3196-3201, 2005.
16. Healy, M.G.; Devine, C. M.; Murphy, R. Microbial production of biosurfactants. **Resour, Conserv Recycl**. 18: 41-57, 1996.
17. Holmberg, K. Natural surfactants. **Curr Opin Colloid Interface Sci**. 6: 148-159, 2001.
18. Hommel, R.K.; Ratledge, C.; Biosynthetic mechanisms of low molecular weight surfactants and their precursor molecules Em: **Biosurfactants: production, properties, applications**. Kosaric, N., ed. Marcel Decker: New York, 1993, cap. 1.
19. Huang, H., D. Ridgway, T. Gu, and M. Moo-Young. Enhanced amylase production by *Bacillus subtilis* using a dual exponential feeding strategy. **Bioprocess Biosyst Eng**. 27:63-69, 2004.
20. Jacques, P.; Hbid, C.; Destain, J.; Razafindralambo, H.; Paquot, M.; Pauw, E.; Thonart, P. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman design. **Appl Biochem Biotech**. 77: 225-233, 1999.
21. Khuri, A.I.; Cornell, J.A. **Response surfaces: design and analyses**. Marcel Dekker: New York, 1987.
22. Kim, H.; Yoon, B.; Lee, C.; Suh, H.; Oh, H.; Katsuragi, T.; Tani, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **J Ferment Bioeng**. 84: 41-46, 1997.
23. Kluge, B.; Vater, J.; Salnikow, J.; Eckart, K. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **FEBS Lett**. 231, 107-110, 1988.
24. Lee, B.; Kim, E. Lipopeptide production from *Bacillus* sp. GB16 using a novel oxygenation method. **Enzyme Microb Technol**. 35: 639-647, 2004.

25. Leonel M.; Cereda, M.P. Manipueira como substrato na biossíntese de ácido cítrico por *Aspergillus niger*. **Sci Agric (Piracicaba, Braz.)**. 52: 299-304, 1995.
26. Lin, S.C.; Carswell, K.S.; Sharma, M.M.; Georgiou, G. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. **Appl Microbiol Biotechnol**. 41: 281-285, 1994.
27. Maier, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria *Adv Appl Microbiol*. 52, 101-121, 2003.
28. Maróstica Jr. M.R.; Pastore, G.M. Production of R-(+)- α -terpineol by the biotransformation of limonene from orange essential oil, using cassava waste water as medium. **Food Chem**. 101: 345-350, 2007.
29. Mulligan, C. Environmental applications for biosurfactants. **Environ pollut**. 133: 183-198, 2005.
30. Myers, R.H.; Montgomery. **Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments**. Wiley: New York, 2002.
31. Nitschke, M. Pastore, G.M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Appl Biochem Biotechnol**. 106: 295-302, 2003.
32. Nitschke, M. Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
33. Nitschke, M.; Ferraz, C.; Pastore, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Braz J Microbiol**. 35: 81-85, 2004. (A)
34. Nitschke, M.; Haddad, R.; Costa, G.A.N.; Gilioli, R.; Meurer, E.C.; Gatti, M.S.; Eberlin, M.N.; Höehs, N.F.; Pastore, G.M.; Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. **Food Sci Biotechnol**. 13: 591-596, 2004. (B)
35. Nitschke, M; Pastore, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresour Technol**. 97: 336-341, 2006.
36. Rodrigues, M.I.; Iemma, A.F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**, Editora Casa do Pão: Campinas, 2005, cap. 4-7.
37. Sandrin, C.; Peipoux, F.; Michel, G. Coproduction of surfactin and iturin A lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. **Biotech Appl Biochem**. 12: 370-375, 1990.

38. Santos, C.F.C. Produção, purificação e caracterização de biossurfactante produzido por linhagens de *Bacillus subtilis*. **Tese de doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.
39. Sen, R.; J. Response surface optimization of the critical media components for the production of surfactin. **Chem Tech Biotechnol.** 68: 263-270, 1997.(A)
40. Sen, R.; Swaminathan, T. Application of response-surface methodology to evaluate the optimum environmental conditions for the enhanced production of surfactin. **Appl Microbiol Biotechnol.** 47: 358-363, 1997.
41. Sen, R.; Swaminathan, T. Response modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. **Biochem Eng J.** 21: 141-148, 2004.
42. Stein, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molec Microbiol.** 2005, 56, 845.
43. Thoma, J.; Brother, C.; and Spradlin, J. Subsite mapping of enzymes. Studies on *Bacillus subtilis* amylase. **Biochemistry.** 9: 1768-1775, 1970.
44. Vater, J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. **Prog Colloid Polymer Sci.** 72:12-18, 1986.
45. Vollenbroich, D.; Özel, M.; Vater, J.; Kamp, R. M.; Pauli, G. Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. **Biologicals.** 25: 289-297. 1997.
46. Wei, Y. Chu, I. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Prog.** 20: 979-983, 2004.
47. Wosiacki, G.; Fioretto, A.M.C.; Almeida, M.M.; Cereda, M.P. Utilização da manipueira para produção de biomassa Em **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca**; Cereda, M. P., ed.; Fund. Cargill: São Paulo, 2000, cap. 12.

CAPÍTULO 3

PRODUÇÃO DE BIOSSURFACTANTE DE Bacillus subtilis EM ESCALA PILOTO UTILIZANDO MANIPUEIRA COMO SUBSTRATO.

RESUMO

Os biossurfactantes possuem como principal característica a capacidade de redução da tensão superficial e interfacial entre dois líquidos imiscíveis, conseqüentemente esses compostos têm um amplo potencial de utilizações industriais. O principal obstáculo à aplicação dos biossurfactante é seu elevado custo de produção. O emprego de substratos alternativos é apontado como uma das soluções para este problema. Contudo, estes processos ainda não estão bem estabelecidos. Este trabalho tem como objetivo a produção em escala piloto de biossurfactante de *Bacillus subtilis* LB5a utilizando manipueira como substrato e o estudo dos parâmetros relacionados à produção. A manipueira foi tratada e colocada em fermentador piloto em bateladas de 40 litros adaptado para coleta de espuma simultaneamente ao processo fermentativo. O processo foi mantido a 35°C, agitação de 150 rpm e aeração média de 20 l/min. Em intervalos regulares de 12 h foram recolhidas amostras para realização de análises de açúcares totais, açúcares redutores, pH, contagem de UFC/ml e tensão superficial. Na espuma produzida foram medidos o volume e a tensão superficial. A espuma foi centrifugada e purificada por precipitação ácida e dissolução em solventes orgânicos.

Os dados relacionados à cinética do processo mostram que a população microbiana é máxima em 24h e a produção de espuma, que foi de 10,6 litros, atinge seu pico entre 24 e 36h coincidindo também com uma maior quantidade de biossurfactante produzido. O rendimento de surfactante semipurificado em relação ao volume de espuma foi de 2,4 g/l. A tensão superficial de soluções aquosas foi reduzida de 72 para 27 mN/m e a CMC foi determinada em 12 mg/l o que o caracteriza como um bom tensoativo. A manipueira também se mostrou, tanto em função da composição como da produtividade, um bom substrato para a produção do surfactante.

Palavras-chave: *Manipueira, Bacillus subtilis, biossurfactante, lipopeptídeos, produção em escala piloto, recuperação primária.*

1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são produzidos por uma grande variedade de microorganismos, como bactérias, leveduras e fungos (Healy et al, 1996; Mulligan, 2005). A maioria destes compostos, no entanto, são encontrados em bactérias (Desai et al, 1993; Healy et al 1996; Maier, 2003). Linhagens de *Bacillus subtilis* são bem conhecidas por sua capacidade de produção de lipopeptídeos de grande atividade superficial (Arima et al, 1968; Cooper et al 1981; Sheppard et al, 1987; Kim et al, 1997; Davis et al, 1999; Razafindralambo et al, 1996) e, entre estes, a surfactina, um dos mais poderosos biossurfactantes conhecidos e que possui diversas isoformas (Kluge et al, 1988; Peypoux et al, 1991; Kowall et al, 1998; Peypoux et al, 1999; Lang 2002;

Costa, 2005; Nitschke et al, 2004 B). A surfactina reduz a tensão superficial de soluções aquosas de 72 para 27 mN/m, e a tensão interfacial para <1,0 mN/m (Arima et al, 1968; Cooper et al 1981; Peypoux et al 1999; Bognolo, 1999; Lang, 2002; Nitschke et al 2004 B). Além da surfactina, outros lipopeptídeos surfactantes produzidos por *Bacillus* sp são também conhecidos (Lin et al 1994; Steller et al 2000; Ahimou et al 2000; Maier, 2003; Deleu et al 2005).

Embora os biossurfactantes tenham potenciais aplicações em diversos campos, tais como a recuperação do óleo, biorremediação, saúde e processamento de alimentos, estes ainda têm um elevado custo de produção (Desai et al 1997; Nitschke et al, 2004 A; Banat et al, 2000). Os biossurfactantes têm que competir com os surfactantes sintéticos em três aspectos: custo, funcionalidade e volume de produção. Nas aplicações tais como a recuperação secundária de petróleo, que requerem volumes elevados de surfactantes, os custos elevados são incompatíveis com seu uso (Makkar et al, 2002). No entanto, em produtos de alto valor agregado, seu uso é possível, considerando a necessidade do uso em baixas concentrações, fato este que poderia absorver o elevado preço destes produtos (Velikonja et al, 1993; Desai et al, 1997).

Com o objetivo de reduzir viabilizar economicamente o uso desses compostos, o uso de resíduos industriais como o meio de cultura é uma alternativa praticável, pois a matéria-prima representa cerca de 30% dos custos totais em um processo biotecnológico (Cameotra et al, 1998). O uso de resíduos agroindustriais com elevados índices de fontes de carbono é apontado como uma alternativa bem sucedida para a produção biossurfactantes (Makkar et al, 2002). O resíduo sólido de batata (Thompson et al, 2000; Fox et al, 2000), turfa hidrolisada (Sheppard et al, 1987),

manipueira, soro de leite e melão (Nitschke et al, 2004 A) foram usados como o meio por linhagens de *Bacillus subtilis* para produção de surfactantes, sendo que a manipueira apresentou os melhores resultados mesmo quando comparados aos do meio sintético utilizado por Sheppard et al (1991).

A manipueira, que é originada a partir da prensagem das raízes da mandioca, é considerada um resíduo bastante prejudicial ao ambiente devido a sua carga de materiais orgânicos e aos elevados níveis de cianeto (Edijala et al, 1999; Vetter, 2000; Pantaroto et al 2000; Cereda, 2005). A produção da surfactina na manipueira é bem descrita na literatura e representa uma etapa na implantação industrial da produção deste biossurfactante (Pastore et al, 2003; Nitschke et al, 2004 A e B; Nitschke, 2004; Costa, 2005; Barros et al, 2006; Nitschke et al, 2006). O biossurfactante obtido a partir da fermentação da manipueira apresenta elevada atividade superficial constatada através da redução da tensão superficial para 26-27 mN/m com pequenos valores de concentração micelar crítica (CMC), além de apresentar também boa estabilidade térmica, de pH e capacidade de emulsificação, sugerindo potenciais aplicações comerciais (Costa, 2005). Entretanto, como se sabe, estudos relacionados ao aumento de escala do processo não foi relatada até o momento.

Relatos que citam o aumento da escala de produção, mesmo que em número limitado, indicam um bom campo para a sua exploração (Reiling et al 1986; Mulligan et al 1990; Desai et al, 1997; Banat et al 2000; Veenanadig et al, 2000; Santos, 2001). A produção em escala piloto de biossurfactante de *Bacillus subtilis* em fermentação em estado sólido indicam que o biorreator de coluna empacotada pode tornar-se um sistema aceitável para produção industrial (Veenanadig et al, 2000). Um experimento para produção piloto de ramnolipídio de *Pseudomonas aeruginosa* foi relatado (Reiling

et al, 1986) Contudo, nenhum trabalho que aponte a utilização de substratos alternativos foi encontrado, apenas meios sintéticos.

A espuma também já foi descrita como método de recuperação de surfactina a partir do meio de cultura (Davis et al 2001; Yeh et al, 2006). Neste estudo, foi focalizada a produção de biosurfactante por *Bacillus subtilis* usando manipueira como meio de cultura em um reator piloto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Preparo do substrato

A manipueira foi recolhida de uma indústria de farinha de mandioca [Plaza LTDA] e transportada para o local de processamento à temperatura ambiente onde foi homogeneizada, fervida, resfriada, centrifugada a e armazenada sob congelamento, onde permaneceu até o uso. Um volume de 40 litros da manipueira previamente tratada foi transferido para um fermentador piloto [Pilot New Brunswick 8000 MP 80], esterilizado a 121 °C por 20 min no próprio fermentador e resfriado até temperatura de incubação.

2.2. Caracterização do substrato

O substrato foi caracterizado através das análises de nitrogênio total (AOAC, 1995), açúcares totais (Daniels et al 1994) e redutores (Somogyi, 1945), fração mineral

[P, K, Ca, Mg, S, Al, B, Cu, Fe, Mn, Zn, Cd, Cr, Ni e Pb] (EPA, 1994), amônia e nitrato (Bremmer et al, 1965) pH.

2.3. Microrganismo utilizado e conservação da cultura

Foi utilizada uma linhagem de *Bacillus subtilis* previamente isolada e identificada como LB5a, pertencente à coleção de cultura do Laboratório de Bioaromas do DCA / FEA / Unicamp (Nitschke et al, 2003). A cultura foi mantida em tubos de ágar nutriente inclinado sob refrigeração de onde, em períodos regulares, eram repicados pra outro tubo, incubados a 30°C por 24h e armazenados. O processo de multiplicação e armazenamento foi efetuado durante todo o período de realização dos experimentos.

2.4. Preparo do inoculo

O inoculo foi preparado a partir de uma cultura de *Bacillus subtilis* armazenada em tubos com ágar nutriente inclinado. Alçadas foram transferidas para um erlenmeyer de 250 ml contendo 150 ml de caldo nutriente, sendo então incubada a 30°C por 12h em banho com agitação de 150 rpm. Após o período de incubação, a cultura foi homogeneizada, 5 ml foram transferidos para cada um dos 24 erlenmeyers de 250 ml contendo 100 ml de caldo nutriente e incubadas a 30°C em banho com agitação de 150 rpm por 8 horas.

O inóculo foi padronizado através da verificação da densidade ótica ($\lambda = 610\text{nm}$) da mistura de 10 alíquotas de mesmo volume retiradas diferentes erlenmeyers tomados aleatoriamente. A partir do resultado de absorbância, e considerando uma curva padrão

de concentração celular x densidade ótica, foram tomados um número de frascos com 100ml da cultura de forma que houvesse quantidade de células suficiente para igual densidade celular em todas as bateladas (2×10^7 UFC/ml). Foi utilizado caldo nutriente esterilizado sob as mesmas condições que as utilizados para o inóculo como branco. Paralelamente foi realizada contagem padrão de células viáveis em ágar nutriente.

2.5. Processo fermentativo

No fermentador descrito no item 2.1., com a manípueira já estéril, foi inoculado o volume de caldo nutriente com *Bacillus subtilis* determinado previamente durante a padronização. Em seguida, foram feitas as adaptações necessárias à recuperação primária do biossurfactante produzido durante a fermentação, realizada através da coleta da espuma produzida no interior do fermentador conforme Kim et al (1997), Davis et al (2001) e Nitschke et al (2004 A). A adaptação consistia no acoplamento de uma mangueira estéril em uma saída na parte superior do fermentador e o uso de um frasco kitassato com gaze em uma das saídas.

A fermentação foi realizada conforme os seguintes parâmetros: temperatura de 35°C, agitação de 150 rpm e aeração de 15 L/h nas primeiras 12h e 25 L/h durante o restante do processo. Em intervalos regulares de aproximadamente 12 h foram recolhidas amostras do meio de cultura, bem como toda a espuma acumulada no frasco coletor, as quais foram analisadas posteriormente.

2.5.1 Monitoramento do processo

Em intervalos regulares de 12 horas as condições de pH e temperatura foram verificadas. Nas amostras de meio de cultura recolhidas foram determinados o número de unidades formadoras de colônia (UFC/ml), tensão superficial (TS), carboidratos totais (Daniels et al, 1994) e açúcares redutores (Somogyi, 1945).

A espuma recolhida foi colapsada naturalmente à temperatura ambiente, teve seu volume e pH medidos. Em seguida, foi submetida ao processo de purificação conforme descrito no item 2.6, de onde os dados referentes à produção de surfactante foram obtidos. Uma amostra de espuma de 15 ml, aproximadamente, foi retirada para análise de tensão superficial, concentração micelar crítica e diluição micelar crítica.

2.6. Extração do surfactante

Após a liquefação da espuma recolhida durante o processo fermentativo, esta foi centrifugada a $12,7 \text{ G} \times 10^3$ por 20 minutos para eliminação de células, seu pH foi ajustado para 2 com solução de HCl, foi posteriormente mantida sob repouso por 12 h, aproximadamente, para decantação. Em seguida, o líquido foi centrifugado a $12,7 \text{ G} \times 10^3$ por 20 minutos, o precipitado foi recolhido e neutralizado com solução de NaOH e colocado para secar em estufa de secagem a 50°C (Makkar et al, 1997; Makkar et al 1999). Em seguida, o sólido, aqui denominado de “surfactante bruto”, foi pesado, triturado em almofariz, suspenso em solução de clorofórmio e metanol 65:15 (Costa, 2005) e filtrado em papel de filtro.

Após a filtração, o permeado foi seco em estufa de secagem a 50°C. O sólido obtido nesta etapa foi denominado “surfactante semipurificado”, foi triturado, pesado e armazenado sob congelamento para análises posteriores.

2.7. Determinação da concentração micelar crítica

A determinação da concentração micelar crítica (CMC) foi realizada através da medida da tensão superficial de diluições seriadas de uma solução de 1mg/ml do biossurfactante semipurificado de acordo com Sheppard et al (1987).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Caracterização do substrato

A composição da manipueira utilizada foi determinada (Tabela 1).

Tabela 1. Características químicas da manipueira.

Componente	Concentração	Componente	Concentração
Açúcares totais (g/l)	36,2	Cobre (mg/l)	0,3
Açúcares redutores (g/l)	13,9	Ferro (mg/l)	4,2
Nitrogênio total (g/l)	1,92	Manganês (mg/l)	1,6
Fósforo (mg/l)	246	Zinco (mg/l)	1,4
Potássio (mg/l)	894	Cádmio (mg/l)	< 0,01
Cálcio (mg/l)	212	Cromo (mg/l)	< 0,01
Magnésio (mg/l)	288	Níquel (mg/l)	< 0,01
Enxofre (mg/l)	150	Chumbo (mg/l)	< 0,01
Alumínio (mg/l)	148	Amônia [NH ₄ ⁺] (mg/l)	131
Boro (mg/l)	4,0	Nitrato [NO ₃ ⁻] (mg/l)	16,2
		pH	5,4

Como foi possível observar, a manipueira apresenta elevados índices de carboidratos totais, isto a caracteriza como um bom substrato para o desenvolvimento de microrganismos, bem como na produção de biossurfactantes (Sandrin et al 1990; Lin, 1996).

O fato de a manipueira apresentar elevados teores de diversos micronutrientes importantes para desenvolvimento microbiano a coloca como um importante e promissor meio de cultura, tendo em vista o fato de não ser necessária sua suplementação para a produção de surfactantes. Entre os micronutrientes relevantes temos o Mn^{2+} em concentração de 1,6 mg/l, valor muito próximo do suplemento utilizado em meio sintético utilizado por Wei et al (2002) que foi de 1,1 mg/l e que, segundo os autores, apresentou significativo aumento no crescimento celular e na produção de surfactina. O íon Fe^{2+} também é considerado importante para uma boa produção de biossurfactantes. Wei et al (2004) e Cooper et al (1981) utilizaram suplementação de 0,2 mg/l de Fe^{2+} com bons resultados. Os íons Zn^{2+} e NH_4^+ foram também considerados importantes no aumento da produção do biossurfactante (Gu et al, 2005). Outros nutrientes que podem afetar a produção são íons fosfato e fontes de nitrogênio (Lin, 1996).

Apesar da concentração de nitrogênio ser importante na produção de biossurfactantes (Davis et al 1999; Lin, 1996) a suplementação da manipueira foi desencorajada pelos dados demonstrados por Costa (2005), referentes à suplementação da manipueira com extrato de levedura, peptona, uréia, nitrato de amônio, milhocina (água de maceração do milho) e soro de leite, que mostraram não haver acréscimo significativo na quantidade de biossurfactante produzido

além de aumentar a dificuldade de recuperação deste. Ainda analisando a composição é possível observar que há uma prevalência dos íons NH_4^+ sobre os NO_3^- . Estudos mostram que há uma preferência por nitrogênio orgânico, amônio e nitrato, nesta ordem, para a produção de tensoativos de *Bacillus subtilis* (Davis et al, 1999).

Não foi encontrada quantidade detectável pelos métodos utilizados de metais pesados analisados (Ni, Cd, Pb e Cr).

Todas as características acima descritas demonstram potencial para a utilização da manipueira sem suplementação e com apresentação resultados relevantes no tocante à produção de biossurfactantes.

3.2. Cinética do processo

A cinética foi avaliada em função da concentração de açúcares totais e redutores, do pH, da contagem de UFC viáveis, da tensão superficial do meio de cultura, do volume de espuma liquefeita produzida, da produção de biossurfactante semipurificado e da concentração de surfactante por litro de espuma liquefeita.

Quando são comparados os valores de concentração açúcares totais e redutores e contagem de células viáveis é possível observar que os carboidratos presentes são as fontes de carbono preferenciais para a cultura, pois a sua concentração cai à medida que população de *Bacillus subtilis* cresce. A concentração de açúcares totais cai em torno de 76% (de 36,2 para 8,7 g/l) nas primeiras 36 horas, ou seja, a redução mais significativa de açúcares foi

coincidente com o período de crescimento exponencial e início da fase estacionária. A comparação do consumo de açúcares mostrou-se fortemente relacionada à produção de biossurfactante (Figura 1). Kim et al (1997) relatam que existe uma relação quase direta entre a produção de biossurfactante, o crescimento celular e a utilização de glicose em um meio de cultura sintético.

Apesar do consumo, a concentração de açúcares redutores aumentou nas primeiras 12 horas do processo (Figura 1). Esse comportamento pode ser consequência da ação das enzimas amilolíticas produzidas pelo *Bacillus*, que é reconhecidamente um bom produtor destas enzimas (Thoma et al 1970, Huang, 2004). As α -amilases presentes no meio podem ter hidrolisado o amido presente liberando açúcares redutores, neste caso a glicose, maior que a quantidade consumida pela cultura. Com o aumento do consumo desses açúcares nas horas seguintes e o esgotamento de açúcares mais complexos, a concentração pára de aumentar e regride até um valor mínimo de 4 g/l com 48 horas. Essa hipótese está em concordância com os trabalhos de Thompsom et al (2000), no qual o *Bacillus subtilis* expressa α -amilase que permite a utilização de substrato de batata rico em amido como meio de cultura para produção de biossurfactante, e de Nitschcke (2006), que mostra haver um aumento da concentração de açúcares redutores glicose, frutose e maltose quando a cepa LB5a é cultivada em manipueira. Esse aumento é atribuído à hidrólise da sacarose e do amido presentes no meio. De acordo com Sandrin et al (1990), a glicose, a frutose e a sacarose são as melhores fontes de carbono para a síntese de surfactina.

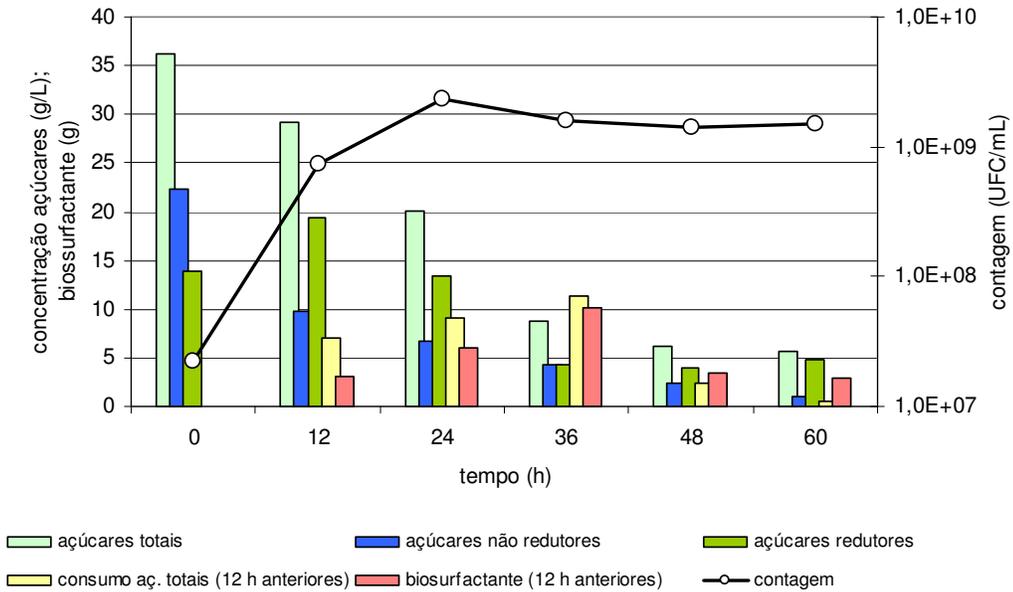


Figura 1. Cinética de produção de biossurfactantes e consumo de açúcares por *Bacillus subtilis* LB5a em manipueira.

Os valores de pH, tensão do meio de cultura e contagem de microrganismos viáveis estão relacionados na Figura 2.

O aumento da quantidade de espuma recolhida está associado à elevada produção de biossurfactante, que acontece basicamente na fase de crescimento e no início na fase estacionária (Cooper et al, 1981; Vater, 1986; Kluge et al, 1988; Kim et al, 1997; Costa, 2005). Esta produção foi evidenciada nas primeiras 12 horas pela queda acentuada na tensão superficial. Contudo, o contínuo arraste de tensoativos faz com que não haja uma grande variação do valor da tensão entre 12 e 24 horas.

Após este período, a população alcança a fase estacionária havendo, conseqüentemente, redução na produção de tensoativos, ao mesmo tempo a

retirada contínua do surfactante faz com que sua concentração caia no meio elevando a tensão no final do processo. Essas constatações corroboram os dados apresentados referentes à eficiência da produção de espuma como forma de recuperação primária do biosurfactante apresentados por Razafindralambo et al (1996), Davis et al (2001) e Costa (2005).

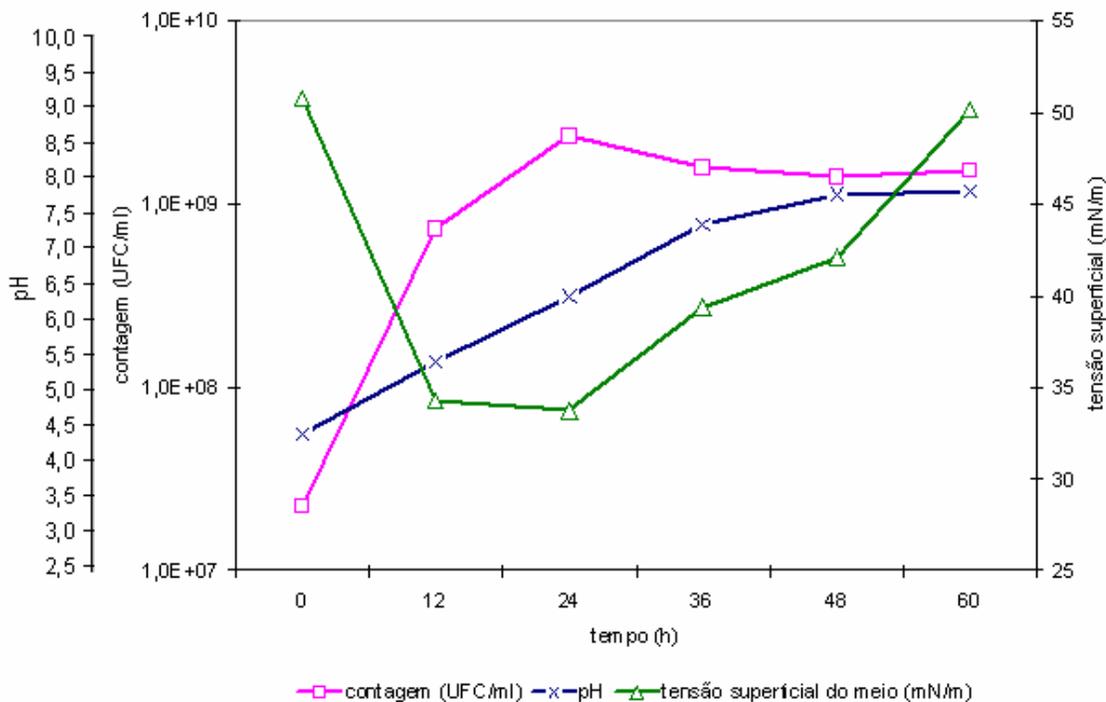


Figura 2. Cinética de crescimento da cultura de *Bacillus subtilis* LB5a em manipuladora.

Durante o processo o pH variou positivamente de 5,40 para 7,63. A maior parte da variação, no entanto, foi verificada no período entre 0 a 36 horas. Após este período a variação não foi significativa. Este comportamento pode desta forma, ser associado ao crescimento exponencial, conforme descrito por Kim et al (1997) e, conseqüentemente, à síntese dos compostos de interesse, pois seu valor ficou praticamente estável ao mesmo tempo em que a contagem de células viáveis atingiu a fase estacionária e que a tensão do meio elevou-se.

Quando são avaliados os valores de contagem de microrganismos é possível identificar o período em que a cultura apresentou crescimento exponencial, fase em que foi atingida a contagem máxima de $2,3 \times 10^9$ UFC/ml, observada em 24 horas. Ocorreu uma redução da contagem verificada no intervalo de 24 e 36 horas, após isso a contagem atinge um “patamar de estabilidade”. A redução do número de células durante o período estacionário parece estar relacionada ao arraste contínuo de células pela espuma, pois se sabe que ocorre este fenômeno quando o processo primário de recuperação é através da produção de espuma (Santos, 2001; Yeh et al 2006). A redução mais suave dos valores de contagem de células viáveis nas últimas 24 horas do processo está diretamente ligada à redução do volume de espuma produzido, como é possível verificar na Figura 2.

Quando foi avaliada a recuperação de espuma (Figura 3), observou-se uma velocidade crescente na produção de espuma nas primeiras 36 horas. O volume máximo produzido foi observado no período entre 24 e 36 horas, alcançando um total de 10,13 litros (aproximadamente 0,84 litros por hora). Após este período, o volume cai para valores próximos de 1,5 litros a cada intervalo de 12 horas. No fim do período da fermentação, aproximadamente 60 horas após o início do processo, a produção de espuma já havia cessado.

A concentração de biossurfactante na espuma não foi constante durante todo o processo. Conforme apresentado na Figura 3, a concentração de biossurfactante semipurificado na espuma oscila numa faixa de 2,5 a 3,0 gramas por litro na espuma recolhida até 36 horas. Esta concentração cai para valores entre 1,5 a 2,0 gramas por litro de espuma no restante da fermentação. Esta

redução pode estar relacionada à redução na produção de biossurfactante aliada ao processo de recuperação. Os dados encontrados de concentração corroboram a suposição feita anteriormente sobre a cinética de produção versus recuperação. Em trabalho realizado com manipueira e com a mesma cultura (LB5a), Costa (2005) e Nitschke (2004) também encontraram concentrações variáveis ao longo do processo com cinética de um perfil semelhante.

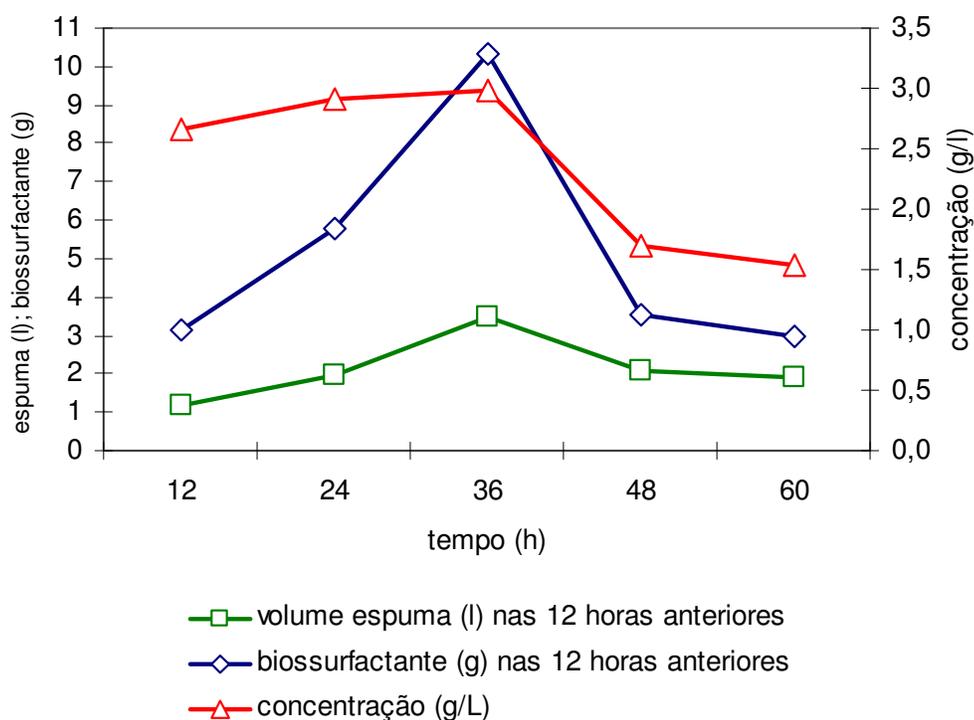


Figura 3. Cinética da produção de biossurfactante de *Bacillus subtilis* LB5a em manipueira.

Considerando os valores globais da fermentação temos um volume médio de espuma de 10,6 litros e uma produção de 25,7 gramas de biossurfactante semipurificado por batelada resultando em um valor médio de 2,42 g/l na espuma recolhida. Considerando o volume inicial de manipueira utilizado temos um rendimento de 0,64 g/l de substrato.

A comparação entre os valores de tensão superficial do meio de cultura e os encontrados na espuma (Figura 4) demonstra a eficiência do processo de recuperação primária através do recolhimento de espuma, pois, em todos os momentos analisados, a espuma sempre apresentou valores próximos de 27 mN/m, enquanto a tensão do meio situou-se sempre acima de 33 mN/m. Os valores de tensão superficial na série de diluições utilizadas para a determinação da CMC do meio (Figura 5) mostram haver uma diferença significativa na concentração de surfactante nos dois casos. Para concentrações aproximadas de 0,25 g/l de surfactante semipurificado temos uma tensão superficial de 27,5 mN/m enquanto concentrações de apenas 0,012 g/l são suficientes para resultar em um valor de tensão de 32 mN/m.

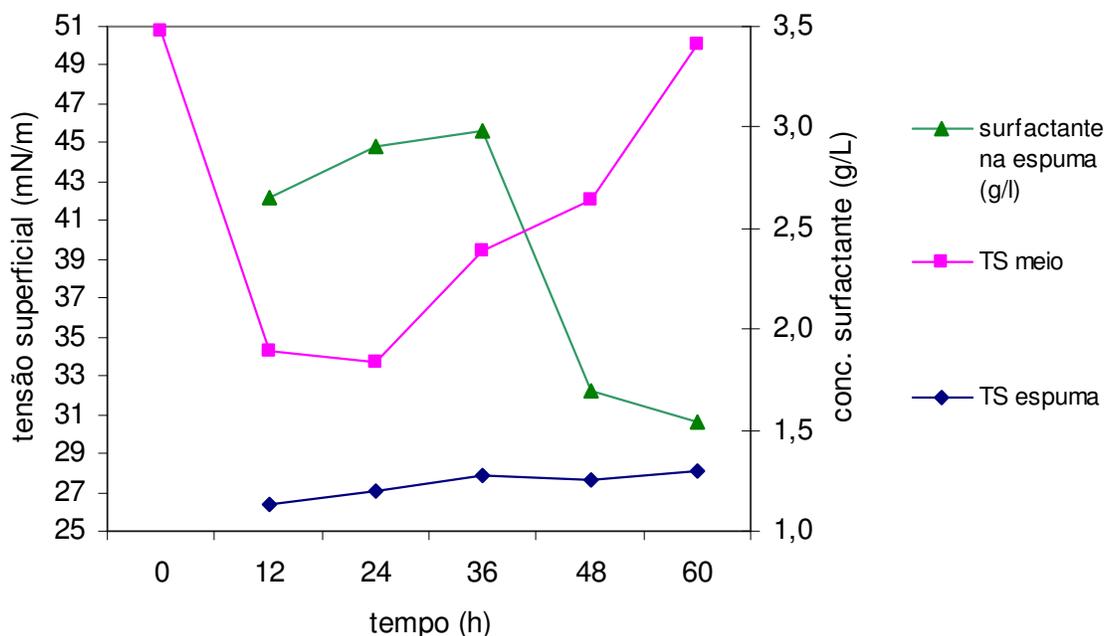


Figura 4. Relação entre as medidas de tensão superficial do meio de cultura e da espuma coletada.

A medida da concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante semipurificado foi de 11 mg/l. O valor é bastante próximo ao valor encontrado por Costa (2005) [10 mg/l], Nitschke (2004) [11 mg/l], Sheppard et al (1987) [14 mg/l], Deleu et al (1999) [10 mg/l] e descrito por Peypoux et al (1999) [<20 mg/l] e melhor que os encontrados por Kim et al (1997) [40 mg/l] e Cooper et al (1981) [25 mg/l] o que o caracteriza como um poderoso agente de atividade superficial. Estas diferenças entre resultados estão provavelmente ligadas à composição do meio, condições de cultivo e cepa considerada.

Os valores encontrados são bastante significativos, pois, em princípio, quanto menor for a CMC mais eficiente será o surfactante e mais favorável, portanto, será sua aplicação industrial (Bognolo, 1999).

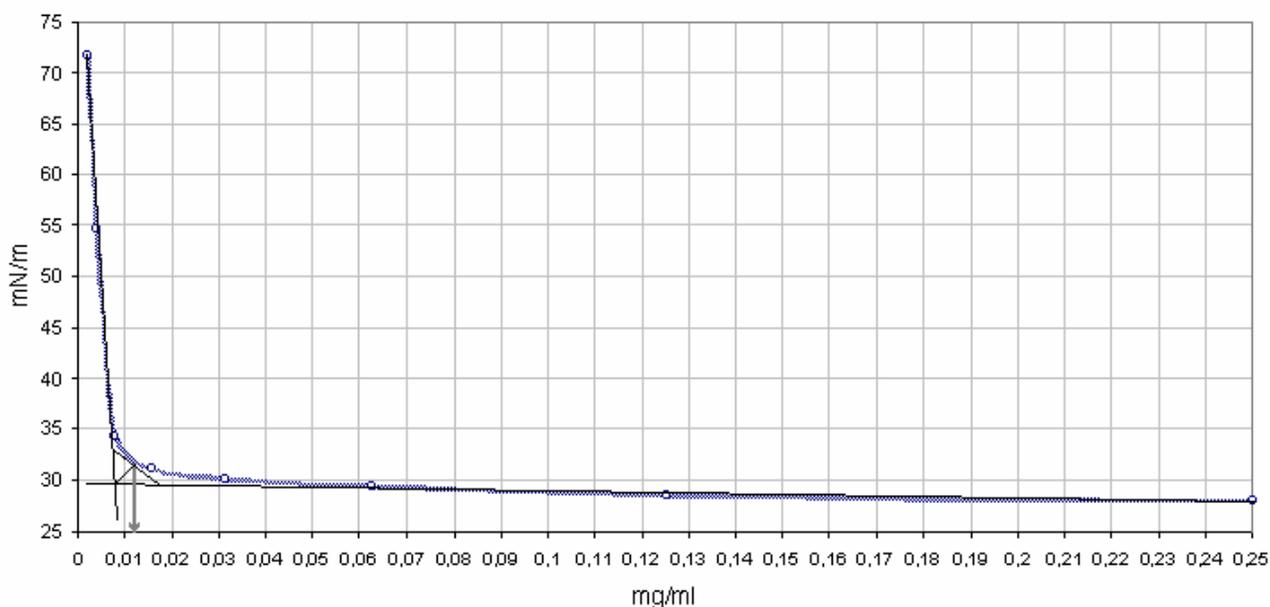


Figura 5. Determinação da concentração micelar crítica (CMC) do biossurfactante através da medida da tensão superficial (mN/m) de diluições sucessivas.

4. CONCLUSÃO

A manipueira foi considerada um bom substrato para a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. Os nutrientes presentes tais como, carboidratos, íons metálicos e fontes de nitrogênio, que fazem com que não seja necessária a suplementação, a colocam como um potencial meio de cultura. O surfactante produzido neste meio de cultura apresentou elevada atividade superficial e baixa CMC, o que o caracteriza como um bom surfactante.

A produção em escala piloto foi demonstrada como um processo viável para a produção destes compostos. A produção média de espuma em cada batelada foi de 10,6 litros (26,5% do volume original). Após purificação, 27,5 gramas em média de surfactante foram recuperados (0,68 g/l de meio de cultura). A recuperação primária através do recolhimento da espuma mostrou-se eficiente como mostra a diferença entre a tensão superficial da espuma colapsada (~27 mN/m) e do meio de cultura no fim do processo (~50 mN/m). Estes resultados demonstram o potencial do processo pois, em processo de bancada, a produção de espuma ficou em 21% do volume original e a produtividade em 0,51 g/l de manipueira (Barros et al, 2007).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahimou, F.; Jaccques, P.; Deleu, M. Surfactin and iturin A effects on *Bacillus subtilis* surface hydrophobicity. **Enzyme and Microbial Technology**. 27: 749-754, 2000.

2. AOAC. **Official method of analysis** (16th ed.). Virginia: AOAC International, 1995.
3. Arima, K.; Kakinuma, A.; Tamura, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochem Biophys Res Commun.** 31: 488-494, 1968.
4. Banat, I.M.; Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl Microbiol Biotechnol.** 53: 495-508, 2000.
5. Barros, F.F.C.; Maróstica Jr., M.R.; Pastore, G.M. Production of biosurfactant of *Bacillus subtilis* in a biorreactor using cassava waste water as medium. **Braz J Microbiol**, 2007. *No prelo.*
6. Barros, F.F.C.; Quadros, C.P.; Maróstica Jr., M.R.; Pastore, G.M. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicação em alimentos. **Quim Nova**, 2006. *No prelo.*
7. Bognolo, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids Surf.** 12: 41-52, 1999.
8. Bremner, J.M.; Keeney, D.R. Steam-distillation methods for determination of ammonium, nitrate and nitrite. **Anal Chim Acta**, 32: 485-495, 1965.
9. Cameotra, S.S.; Makkar, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Appl Microbiol Biotechnol.** 50: 520-529, 1998.
10. Cereda, M.P. Produtos e subprodutos Em: **Processamento e utilização da mandioca**. Souza, L.S.; Farias, A.R.N.; Mattos, P.L.P.; Fukuda, W.M.G., eds. Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical: Cruz das Almas, 2005. cap. 1.
11. Cooper, D.G.; Macdonald, C.R.; Duff, S.J.B.; Kosaric, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Appl Environ Microbiol.** 42: 408-412, 1981.
12. Costa, G.A.N. Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2005.
13. Daniels, L.; Hanson, R.; Phillips, J.A. Chemical analysis. Em: **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Gerhardt, P.; Murray, R. G. E.; Wood, W.A.; Krieg, N.R., eds. American Society for Microbiology. 518-519, 1994.

14. Davis, D.A.; Lynch, H. C.; Varley, J. The application of foaming for the recovery of surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 cultures. **Enzyme and Microb Technol.** 28: 346-354, 2001.
15. Davis, D.A.; Lynch, H. C.; Varley, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme Microb Technol.** 25: 322-329, 1999.
16. Deleu, M.; Paquot, M.; Nylander, T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface-implications for the effect of fengycin on biological membranes. **J Colloid Interface Sci.** 283:358-365, 2005.
17. Deleu, M.; Razafindralambo, H.; Popineau, Y.; Jacques, P.; Thonart, P.; Paquot, M. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Colloids Surf, A.** 152: 3-10, 1999.
18. Desai, J.D.; Banat, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol Molec Biol Rev.** 61: 47-64, 1997.
19. Desai, J.D.; Desai, A.J.; Production of biosurfactants Em **Biosurfactants: production, properties, applications.** Kosaric, N., ed. Marcel Decker: New York, 1993, cap. 2.
20. Edijala, J.K.; Okoh, P.N.; Anigoro, R. Chemical assay of cyanide levels of short-time-fermented cassava products in the Abraka area of Delta State, Nigeria. **Food Chem.** 64: 107-110, 1999.
21. EPA – US Environmental Protection Agency. SW-846, **Tests methods for evaluating solid wastes: Physical and chemical methods**, 3015, revision september 1994.
Disponível on-line em: http://epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/3_series.htm.
Acessado em julho 2005.
22. Fox. S.L.; Bala G.A. Production of surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 using potato substrates. **Bioresour Technol.** 75: 235-240, 2000.
23. Gu, X.; Zheng, Z.; Yu, H.; Wang, J.; Liang, F.; Liu, R. Optimization of medium constituents for a novel lipopeptide production by *Bacillus subtilis* MO-01 by a response surface method. **Process Biochem.** 40: 3196-3201, 2005.
24. Healy, M.G.; Devine, C. M.; Murphy, R. Microbial production of biosurfactants. **Resour, Conserv Recycl**, 18: 41-57, 1996.
25. Huang, H., D. Ridgway, T. Gu, and M. Moo-Young. Enhanced amylase production by *Bacillus subtilis* using a dual exponential feeding strategy. **Bioprocess Biosyst Eng.** 27:63-69, 2004.

26. Kim, H.; Yoon, B.; Lee, C.; Suh, H.; Oh, H.; Katsuragi, T.; Tani, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **J Ferment Bioeng.** 84: 41-46, 1997.
27. Kluge, B.; Vater, J.; Salnikow, J.; Eckart, K. Studies on the biosynthesis of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis* ATCC 21332. **FEBS Lett.** 231, 107-110, 1988.
28. Kowall, M.; Vater, J.; Kluge, B.; Stein, T.; Franke, P.; Ziessow, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **J Colloid Interface Sci.** 204, 1-8, 1998.
29. Lang, S. Biological amphiphiles (microbial surfactantes) **Curr Opin Colloid Interface Sci.** 7: 12-20, 2002.
30. Lin, S.C. Biosurfactants: recents advances. **J Chem Tech Biotechnol.** 66: 109-120, 1996.
31. Lin, S.C.; Carswell, K.S.; Sharma, M.M.; Georgiou, G. Continuous production of the lipopeptide biosurfactant of *Bacillus licheniformis* JF-2. **Appl Microbiol Biotechnol.** 41: 281-285, 1994.
32. Maier, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria **Adv Appl Microbiol.** 52, 101-121, 2003.
33. Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** 58, 428-434, 2002.
34. Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **J Ind Microb Biotech,** 18: 37-42, 1997.
35. Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Structural characterization of a biosurfactant poduced by *Bacillus subtilis* at 45°C. **J Surfactants and Deterg,** 2:367-372, 1999.
36. Mulligan C.N.; Gibbs, B.F. Recovery of biosurfactants by ultrafiltration. **J Tech Biotechnol.** 47: 23-29, 1990.
37. Mulligan, C. Environmental applications for biosurfactants. **Environ pollut.** 133: 183-198, 2005.
38. Nitschke, M. Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. **Tese de Doutorado,** Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.

39. Nitschke, M.; Ferraz, C.; Pastore, G.M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Braz J Microbiol.** 35: 81-85, 2004. (A)
40. Nitschke, M.; Haddad, R.; Costa, G.A.N.; Gilioli, R.; Meurer, E.C.; Gatti, M.S.; Eberlin, M.N.; Höehs, N.F.; Pastore, G.M.; Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. **Food Sci Biotechnol.** 13: 591-596, 2004. (B)
41. Nitschke, M.; Pastore, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresour Technol.** 97: 336-341, 2006.
42. Pantaroto, S.; Cereda, M.P. Linamarina e sua decomposição no ambiente Em: **Manejo, uso e tratamento de subprodutos da industrialização da mandioca - vol 4.** Cereda, M.P., ed. Fund. Cargill: São Paulo, 2000, cap. 2.
43. Pastore, G.M.; Santos, C.F.C.; Nitschke, M. Processo de Produção de Biosurfactante por *Bacillus subtilis*, utilizando resíduo da indústria de mandioca. Br. Pat. PI 0303853-0. 2003.
44. Peypoux, F.; Bonmatin, J.M.; Labbé, H.; Das, B.C.; Ptak, M.; Michel, G. Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7] surfactin. **Eur J Biochem** 202: 101-106, 1991.
45. Peypoux, F.; Bonmatin, J.M.; Wallach, J. Recents trends in biochemistry of surfactin. **Appl Microbiol Biotechnol.** 51: 553-563, 1999.
46. Razafindralambo, H.; Paquot, M.; Baniel, A.; Popineau, Y.; Hbid, C.; Jacques, P.; Thonart, P. Foaming properties of surfactin, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. **J Am Oil Chem Soc.** 73: 149-151, 1996.
47. Reiling, H.E.; Thanei-Wyss, U.; Guerra-Santos, L.H.; Hirt, R.; Käppeli, O.; Fiechter, A. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. **Appl Environ Microbiol.** 51: 985-989, 1986.
48. Sandrin, C.; Peypoux, F.; Michel, G. Coproduction of surfactin and iturin A lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. **Biotech Appl Biochem.** 12: 370-375, 1990.
49. Santos, C.F.C. Produção, purificação e caracterização de biosurfactante produzido por linhagens de *Bacillus subtilis*. **Tese de doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.
50. Sheppard, J.D.; Cooper, D. G. The response of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 to manganese during continuous-phased growth. **Appl Microbiol Biotechnol.** 35: 72-76, 1991.

51. Sheppard, J.D.; Mulligan, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Appl Microbiol Biotechnol.** 27: 110-116, 1987.
52. Somogyi, M. A new reagent for determination of sugars. **J Biol Chem**, 160: 61-68, 1945.
53. Steller, S.; Vater, J. Purification of the fengycin synthetase multienzyme system from *Bacillus subtilis* b213. **J Chromatogr, B.** 737: 267-275, 2000.
54. Thoma, J.; Brother, C.; and Spradlin, J. Subsite mapping of enzymes. Studies on *Bacillus subtilis* amylase. **Biochemistry.** 9: 1768-1775, 1970.
55. Thompson, D. N.; Fox, S. L.; Bala, G. A. Biosurfactants from potato process effluents. **Appl Biochem Biotechnol.** 84: 917-929, 2000.
56. Vater, J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. **Prog Colloid Polymer Sci.** 72:12-18, 1986.
57. Veenanadig, N. K.; Gowthaman, M. K.; Karath, N. G. K. Scale up for the production of biosurfactant packed column bioreactor. **Bioprocess Eng.** 32: 95-99, 2000.
58. Velikonja, N.; Kosaric, N. Biosurfactants in food application Em: **Biosurfactants: production, properties, applications.** Kosaric, N., ed. Marcel Decker: New York, 1993, cap. 16.
59. Vetter, J. Plant cyanogenic glycosides. **Toxicon.** 38: 11-36, 2000.
60. Wei, Y. Chu, I. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. **Biotech Lett.** 24: 479-482, 2002.
61. Wei, Y. Chu, I. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Biotechnology Prog.** 20: 979-983, 2004
62. Yeh, M.; Wei, Y.; Chang, J. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. **Process Biochem.** 41: 1799-1805, 2006.

CAPÍTULO 4

CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES DO BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Bacillus subtilis* EM ESCALA PILOTO USANDO MANIPUEIRA COMO SUBSTRATO.

RESUMO

Devido à elevada atividade superficial, baixa toxidez e biodegradabilidade dos lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus* estão entre os biossurfactantes mais conhecidos e estudados. Estes compostos são apontados como potenciais insumos para diversos processos industriais e ambientais. Para que seja possível sua aplicação, no entanto, é necessário que estes apresentem estabilidade e manutenção de suas propriedades em condições extremas que estão freqüentemente associadas a esses processos. O objetivo deste trabalho foi o estudo da estabilidade do biossurfactante produzido pela linhagem LB5a de *Bacillus subtilis* cultivado em manipueira em um processo piloto. Os estudos de estabilidade foram realizados em função da variação de temperatura, pH e concentração salina. Outro estudo realizado foi a avaliação de sua capacidade emulsificante em misturas de água com hidrocarbonetos e óleos vegetais, bem como a estabilidade das emulsões formadas. Os resultados mostram que o

biossurfactante foi estável a temperatura de 100 °C por 140 minutos e 121 °C por até 60 minutos, à concentração de 2,5 a 20% de NaCl, e na faixa de pH de 6 a 10. Em relação ao índice de emulsão com 24 horas (IE₂₄), o biossurfactante mostrou elevados valores para diversos hidrocarbonetos cíclicos e alifáticos e óleos vegetais com diferentes perfis de ácidos graxos presentes em óleos obtidos de oleaginosas importantes comercialmente. Todos os resultados descritos caracterizam-nos como compostos de potenciais aplicações diversos ramos industriais.

Palavras-chave: *biossurfactante, manípueira, Bacillus subtilis, estudos de estabilidade, índice de emulsificação.*

1. INTRODUÇÃO

Os biossurfactantes são compostos anfifílicos produzidos por várias espécies de microrganismos. Esses compostos compreendem uma grande diversidade de compostos quimicamente diferentes como glicolipídios, lipossacarídeos, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros, lipopeptídeos (Bognolo, 1999; Lang, 2002; Maier 2003) e alguns polímeros (Maier, 2003).

Entre os biossurfactantes mais efetivos estão os lipopeptídeos produzidos por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente os produzidos pelo *Bacillus subtilis* (Bognolo, 1999). Estes biossurfactantes, por possuírem alta

atividade superficial, apresentam importantes propriedades: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (Kosaric, 1992; Banat, 2000). Diversos setores demandam compostos com estas características tais como petróleo, petroquímica, alimentos e bebidas, cosméticos, farmacêuticas, mineração, metalurgia, agroquímica, fertilizantes, ambiental, papel entre outras (Kosaric, 1992; Desai et al, 1997; Banat 2000; Banat et al, 2000; Mulligan, 2005).

A grande maioria dos surfactantes disponíveis comercialmente é sintetizada a partir de derivados de petróleo. Entretanto, o aumento da preocupação ambiental, aliado as boas propriedades dos biossurfactantes, inclusive quando considerados aspectos como baixa toxidez, biodegradabilidade e propriedades biológicas levou à procura destes compostos como alternativa aos produtos existentes (Kosaric, 1992; Holmberg, 2001; Desai et al, 1997; Maier, 2003; Cameotra et al, 2004)

Processos industriais e ambientais estão freqüentemente associados a condições extremas de temperatura, pressão, força iônica, pH e solventes orgânicos (Cameotra et al, 1998). Diversos estudos têm avaliado a estabilidade dos biossurfactantes frente a essas condições, isto ocorre em função da necessidade de uma avaliação do comportamento destes compostos para que sua utilização seja viabilizada (Cameotra et al, 1998; Makkar et al, 1999). Estudos prévios têm demonstrado haver significativa estabilidade dos biossurfactantes mesmo quando comparados a compostos sintéticos bastante utilizados pela indústria (Kim et al, 1997; Nitschke et al, 2006).

O objetivo deste trabalho foi o estudo do comportamento da atividade superficial frente às condições extremas e da estabilidade de emulsão formadas com o auxílio de compostos biossurfactantes produzidos por uma linhagem de *Bacillus subtilis* em manipueira, que é um resíduo agroindustrial da indústria de fécula e farinha de mandioca, em escala piloto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Produção do Biossurfactante

O biossurfactante foi produzido por *Bacillus subtilis* linhagem LB5a da coleção do Laboratório de Bioaromas (DCA/ FEA / Unicamp) (Nitschke et al, 2003) através de fermentação em fermentador piloto com capacidade para 80 litros utilizando manipueira como substrato.

As condições de processo foram 35°C, 20 litros/h de aeração e agitação de 150 rpm. A recuperação primária do surfactante foi realizada através da coleta da espuma produzida no interior do fermentador conforme descrito por Kim et al (1997), Davis et al (2001) e Nitschke et al (2004). Em seguida ao colapso da espuma, a biomassa foi removida por centrifugação, o sobrenadante foi acidificado para pH 2 e novamente centrifugada. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi suspenso em água, teve seu pH elevado para 7 e secado. Após secagem do produto, foi feita extração com clorofórmio e metanol

(65:15) e secado (Makkar et al, 1997). O produto obtido foi identificado como biossurfactante semipurificado e utilizado nos experimentos posteriores.

2.2. Estudo da atividade superficial

Foram medidas a tensão superficial (TS), a diluição micelar crítica 1/10 (CMD^{-1}) e 1/100 (CMD^{-2}) (Makkar et al, 1997; Costa, 2005) e a concentração micelar crítica (CMC) (Sheppard et al, 1987) de uma solução de 1 mg/ml do biossurfactante semipurificado.

2.3. Estudo da estabilidade térmica

Uma solução de 1mg/ml do biossurfactante extraído na etapa anterior foi colocada em tubos de ensaio de 15mm de diâmetro e colocada a 100 °C por 20, 40, 60, 100 e 140 minutos. A mesma solução também foi aquecida a 121 °C por 20, 40 e 60 minutos. Após tratamento térmico, cada solução foi resfriada até temperatura ambiente. Após resfriamento a tensão superficial (TS), a diluição micelar crítica 1/10 (CMD^{-1}) e 1/100 (CMD^{-2}) foram medidas (Makkar et al, 1997; Costa, 2005).

2.4. Estudo da estabilidade frente ao Ph

Uma solução de 1mg/ml do biossurfactante semipurificado teve seu pH ajustado para valores de 2, 4, 6, 8, 12 e 13 com adição de HCl 1 e 0,1N ou NaOH

1 e 0,1N. Após 30 minutos à temperatura de 25 ± 1 °C, a tensão superficial (TS), a diluição micelar crítica 1/10 (CMD^{-1}) e 1/100 (CMD^{-2}) foram medidas.

2.5. Estudo da estabilidade frente à força iônica

Partindo de uma solução estoque do biossurfactante semipurificado com concentração de 10 mg/ml, foram preparadas duas séries de soluções de forma que em uma série a concentração final de biossurfactante ficasse em 1 mg/ml, e na outra em 2,5 mg/ml. Cada uma das séries também foi preparada de forma que a concentração salina (NaCl) final ficasse em 2,5, 5, 10 e 20%. Após 30 minutos à temperatura de 25 ± 1 °C, a tensão superficial, a diluição micelar crítica 1/10 (CMD^{-1}) e 1/100 (CMD^{-2}) foram medidas.

2.6. Estudo da atividade emulsificante

Uma solução de biossurfactante de 1 mg/ml foi misturada em tubos de ensaio com tampa rosqueável a compostos hidrofóbicos na proporção de 4:6 e homogeneizadas em agitador de tubos em velocidade máxima por 2 minutos. Os tubos foram deixados em repouso à temperatura de 25 ± 1 °C. Nos períodos de 24, 48, 72 e 96 contadas a partir do momento da homogeneização foram efetuadas medidas da altura da camada emulsificada (CE) e da altura total (AT) dos líquidos no tubo. O índice de emulsificação (Cooper et al, 1987) foi obtido através da fórmula:

$$IE(\%) = (CE/AT) \cdot 100$$

Os compostos utilizados foram divididos em dois grupos, o primeiro composto com os seguintes hidrocarbonetos: pentano, hexano, octano, decano, benzeno, tolueno, gasolina e diesel. O segundo com óleos vegetais: algodão (*Gossypium hirsutum*), babaçu (*Attalea speciosa*), gergelim (*Sesamum indicum*), girassol (*Helianthus annuus*), milho (*Zea mays*), oliva (*Olea europaea*), palma (*Elaeis guineensis*) e soja (*Glycine Max*). Paralelamente foram preparadas duas soluções de outros emulsificantes, uma de dodecil sulfato de sódio (SDS), um dos mais comuns detergentes aniônicos sintéticos (Kim et al, 1997), e a outra de lecitina de soja, um dos emulsificantes naturais com maior número de aplicações na indústria alimentícia (TECPAR–SBRT, 2006), nas mesmas concentrações do biossurfactante, ou seja, 1mg/ml.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade superficial

Atividade superficial do biossurfactante produzido pela linhagem LB5a foi medida. Os resultados mostram que este exibiu uma excelente atividade, reduzindo a tensão da água de 72,31 para 27,01 mN/m o que confirma os dados reportados por Cooper et al (1981), Peypoux et al (1999) e Nitschke et al (2006). Os valores de CMD^{-1} e CMD^{-2} foram, respectivamente, 30,12 e 35,48 mN/m também foram próximos aos encontrados por Sheppard et al (1987), contudo um

pouco maiores que os reportados por Nitschke et al (2006), que foram de 28 e 32 mN/m, respectivamente. A concentração micelar crítica encontrada foi de 12 mg/l. O valor é bastante próximo ao valor encontrado por outros autores que encontraram CMCs entre 10 e 14 mg/l (Costa, 2005; Nitschke, 2004; Sheppard et al, 1987; Deleu et al, 1999; Peypoux et al, 1999).

Isso o caracteriza como um poderoso agente de atividade superficial. Considerando a grande atividade superficial e CMC baixa, é possível afirmar o biossurfactante produzido pela linhagem LB5a apresenta tem características de um bom tensoativo (Bognolo, 1999).

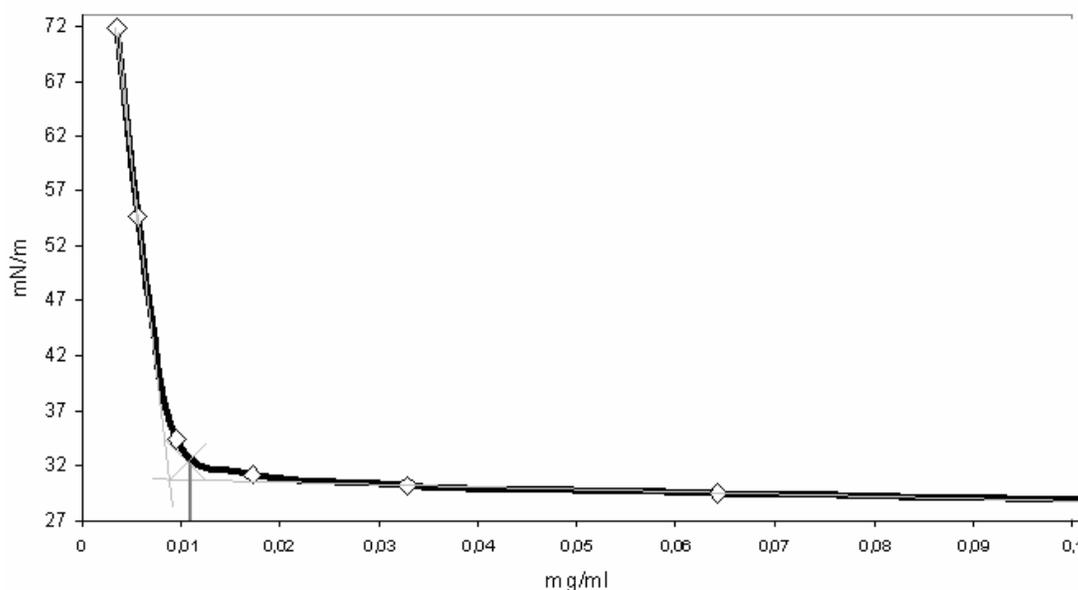


Figura 1. Determinação da concentração micelar crítica (CMC).

3.2 Estudos de estabilidade

A estabilidade do biossurfactante foi avaliada frente variações de temperatura, pH e força iônica. Os biossurfactantes são apontados como

possuidores de diversas propriedades que os caracterizariam como potenciais insumos para na indústria, a medicina e aplicações ambientais. Estes processos estão freqüentemente associados a condições extremas (Cameotra et al, 1998). Em função desse fato é necessária uma avaliação do comportamento do biossurfactante produzido em função destas variáveis.

Diversos experimentos têm demonstrado que o biossurfactante produzido por *Bacillus* é estável em diversas condições. O biossurfactante produzido pela cepa de *Bacillus subtilis* C9 apresentou amplo limite de estabilidade e manutenção de propriedades emulsificantes em temperaturas de 20 a 100°C por 1 hora, pH de 5,0 a 9,5 e concentrações salinas de 1.000 mM de NaCl e 10 mM de CaCl₂ (Kim et al, 1997).

Utilizando outra linhagem, foi produzido surfactante com estabilidade a variações de temperatura de 100°C por 2 horas, 121 °C por 0,5 hora e 135°C por 1 hora, pH de 6 a 12, concentração salina (NaCl) de 15% e presença das enzimas proteolíticas bromelina, ficina, papaína e tripsina, além de boa propriedade emulsificante de óleos vegetais e hidrocarbonetos (Costa, 2005). Quando são avaliados os efeitos do tratamento térmico em diversos intervalos de tempo e temperaturas é possível observar que não houve mudança significativa na atividade superficial do biossurfactante (Figuras 2 e 3)

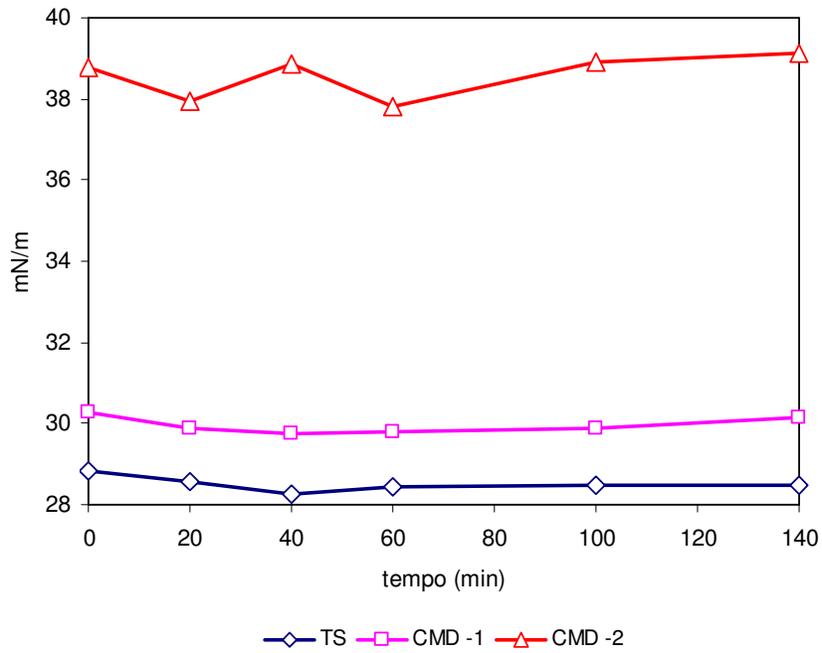


Figura 2. TS, CMD^{-1} e CMD^{-2} do biossurfactante submetido a tratamento térmico a 100°C.

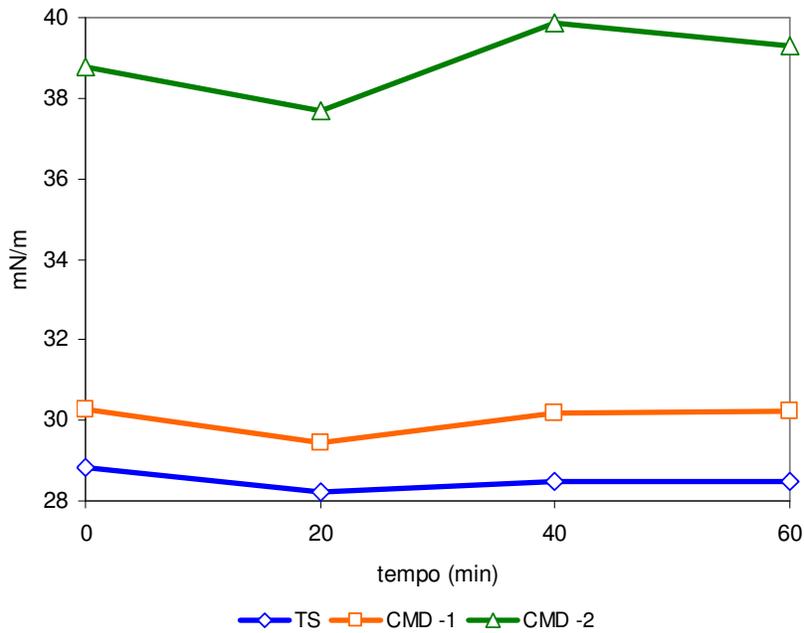


Figura 3. TS, CMD^{-1} e CMD^{-2} do biossurfactante submetido a tratamento térmico a 121°C.

Os valores de tensão superficial, CMD^{-1} e CMD^{-2} não tiveram variação significativa ao longo do tempo quando é avaliado o tratamento a 100°C. Mesmo as variações entre as medidas de CMD^{-2} , parecem estar mais ligadas a variações experimentais, pois não foi mostrada nenhuma tendência clara. No entanto, foi possível observar que os valores dos dois últimos tratamentos, os 100 e 140 minutos, foram os dois maiores valores de CMD^{-2} . No caso do tratamento a 121 °C houve uma pequena variação, saindo do nível de 38 mN/m nos primeiros 20 minutos indo para aproximadamente 39,5 a partir de 40 minutos.

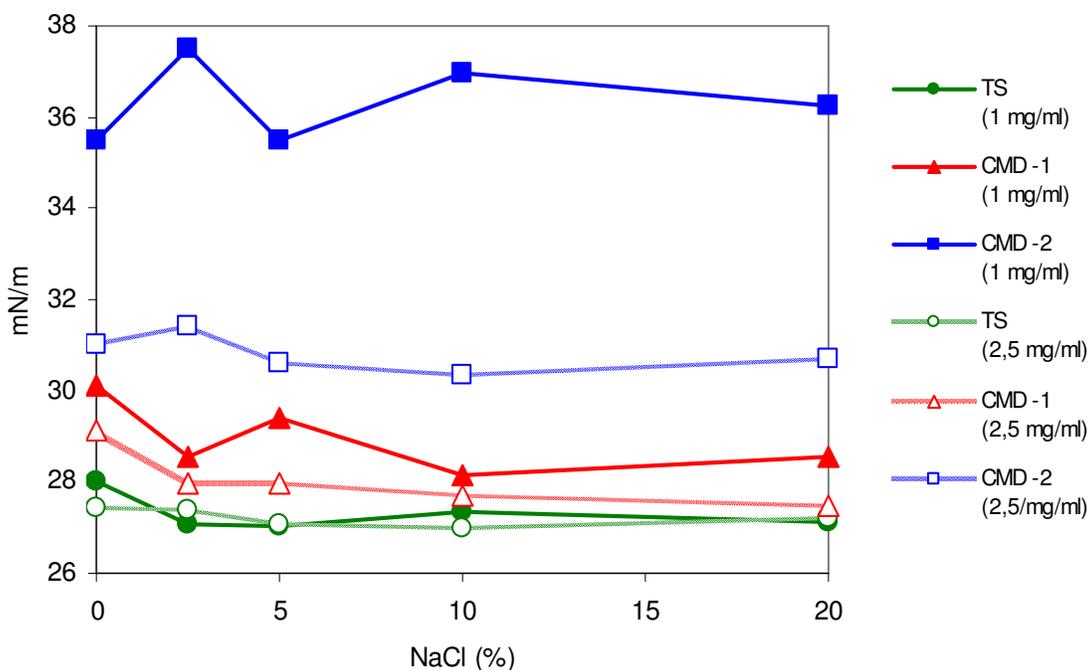


Figura 4. Efeito da concentração salina sobre a atividade superficial de diferentes concentrações de biossurfactante.

Quando testado frente à força iônica, o biossurfactante mostrou estabilidade em todas as concentrações salinas pesquisadas. Quando comparadas as duas séries de concentração de biossurfactante com concentrações de 1 e 2,5 mg/ml só foram observadas diferenças nas medidas de CMD^{-2} , pois a concentração do surfactante está próxima ou abaixo da CMC, portanto qualquer alteração de concentração afeta de forma significativa a tensão (Figura 1). Quando são comparados os valores de TS e CMD^{-1} , os valores obtidos são bastante próximos, pois como o surfactante está em uma concentração acima da CMC não há significativo decréscimo na tensão mesmo que haja adição em excesso à solução.

O gráfico da Figura 5 ilustra os resultados obtidos quando foram estudados os efeitos de alterações de pH sobre a atividade superficial.

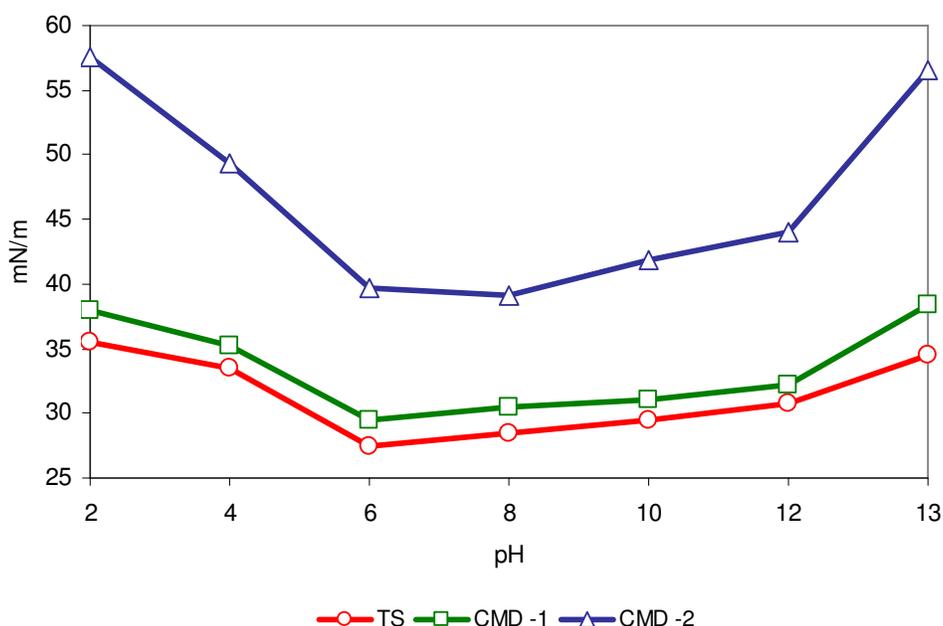


Figura 5. Tensão superficial (TS), Diluição micelar crítica 1/10 (CMD^{-1}) e Diluição micelar crítica 1/100 (CMD^{-2}) em função do pH.

Quando foram comparados os valores da tensão superficial (TS), observa-se que os menores valores, 27,5 e 28,5 mN/m, estão nos valores de 6 a 8 respectivamente, ou seja, próximo à neutralidade. Observa-se uma brusca elevação na TS quando o pH foi reduzido de 6 para 4, isso se deve à precipitação do biossurfactante. Acima do pH 6 há um gradual aumento nos valores de tensão até pH 12, quando a TS foi de 30,8 mN/m, entre 12 e 13 o valor a tensão aumenta de forma mais vigorosa. A diluição micelar crítica 1/10 (CMD^{-1}), que corresponde a uma concentração de 0,1mg/ml de surfactante, provavelmente devido à concentração do surfactante ainda estar acima da concentração micelar crítica (CMC) teve um comportamento muito semelhante à TS.

Quando é avaliado o comportamento da diluição micelar crítica 1/100 (CMD^{-2}), que corresponde a uma concentração de 0,01 mg/ml, frente ao pH, foram observadas algumas diferenças em relação ao perfil da TS e da (CMD^{-1}). O fato da concentração do biossurfactante estar abaixo da CMC (Comparar com Figura 1) implica que, para qualquer redução da concentração por precipitação, por exemplo, haverá um grande impacto na variação da tensão superficial, fato que não ocorre nas outras diluições. As mudanças nos valores de tensão foram bem mais acentuadas ficando bastante evidente a elevação da tensão superficial do pH 4 para 2, e do pH 8 para pH 10. Isso evidencia uma diferença na concentração de surfactante em solução nos pontos estudados.

Cooper et al (1981) relata que a acidificação da solução contendo biossurfactante de *Bacillus subtilis* para pH 2 eleva a tensão superficial para 62 mN/m, voltando para 27 mN/m com a neutralização, em pH igual a 6, mostrando a

dependência das propriedades surfactantes da surfactina em relação ao pH. Isto se deve ao fato de que em meio ácido a surfactina precipita sem, contudo, ter sua estrutura alterada (Cooper et al, 1981; Costa, 2005). Esta característica representa uma vantagem adicional, pois mesmo quando submetida a condições mais extremas de pH, há manutenção da estrutura química original.

3.3. Índice de emulsificação e estabilidade da emulsão

Uma importante avaliação do poder de um emulsificante é o índice de emulsificação (IE) e da estabilidade da emulsão (Cooper et al, 1987; Abu-Ruwaida et, al 1991; Nitschke, 2004; Costa, 2005). Analisando inicialmente os hidrocarbonetos (Tabela 1 e Figura 6) foi possível que todas as emulsões testadas, exceto o tolueno + biossurfactante, apresentaram elevados valores de IE. Os valores foram próximos entre os surfactantes para todos os hidrocarbonetos testados no período de 24 horas (IE_{24}), embora o SDS tenha apresentado valores melhores em todos os casos. As maiores diferenças foram com o decano, o tolueno e o diesel onde as relações $IE_{24}BS/IE_{24}SDS$ foram respectivamente de 1,25, 2,52 e 1,24.

Tabela 1. Índice de emulsificação (IE) de diferentes emulsões de hidrocarbonetos com biossurfactante de *Bacillus subtilis* LB5a (BS) e dodecil sulfato de sódio (SDS).

	24 h		48 h			72 h			96 h			IE ₂₄ / IE ₉₆ (%)
	IE ₂₄	SDS/ BS	IE ₄₈	IE ₂₄ / IE ₄₈ (%)	SDS/ BS	IE ₇₂	IE ₄₈ / IE ₇₂ (%)	SDS/ BS	IE ₉₆	IE ₇₂ / IE ₉₆ (%)	SDS/ BS	
Pentano + BS	66,8		66,8	0,0		66,2	0,9		61,1	7,7		8,6
Pentano + SDS	70,6	1,06	65,2	7,6	0,98	61,8	5,3	0,93	61,2	0,9	1,00	13,3
Benz. + BS	69,1		68,7	0,7		68,7	0,0		65,7	4,3		5,0
Benz. + SDS	70,8	1,02	70,8	0,0	1,03	70,8	0,0	1,03	70,3	0,6	1,07	0,6
Hexano + BS	67,7		65,8	2,7		64,1	2,6		61,0	4,9		9,9
Hexano + SDS	77,3	1,14	68,2	11,8	1,04	66,2	3,0	1,03	61,5	7,0	1,01	20,4
Octano + BS	71,9		70,1	2,5		70,4	-0,5		70,7	-0,4		1,7
Octano + SDS	75,3	1,05	72,2	4,1	1,03	72,2	0,0	1,03	72,9	-0,9	1,03	3,3
Decano + BS	59,5		58,4	1,9		57,6	1,4		57,6	0,0		3,3
Decano + SDS	74,3	1,25	73,5	1,0	1,26	73,5	0,0	1,28	72,3	1,7	1,26	2,7
Tolueno + BS	31,2		28,8	7,7		28,2	2,1		28,2	0,0		9,6
Tolueno + SDS	78,7	2,52	78,1	0,7	2,71	74,6	4,4	2,64	73,2	1,9	2,59	6,9
Diesel + BS	58,6		44,6	23,9		28,3	36,4		13,8	51,3		76,4
Diesel + SDS	72,5	1,24	69,1	4,6	1,55	69,1	0,0	2,44	66,2	4,3	4,79	8,7
Gasol.+ Bioss.	69,9		69,1	1,1		68,8	0,4		68,6	0,4		1,9
Gasol. + SDS	75,0	1,07	74,2	1,0	1,07	71,9	3,2	1,04	9,7	86,5	0,14	87,1

Em apenas quatro casos as emulsões apresentaram uma redução percentual do IE maior que 10% no período analisado entre 24 e 96 horas: o pentano + SDS com redução de 13,3%, o hexano + SDS com redução de 20,4%, o diesel + biossurfactante com redução de 76,4% e a gasolina + SDS com redução de 87,1%. A diferença no comportamento do diesel e da gasolina poderia sugerir uma maior estabilidade da emulsão formada pelo biossurfactante em hidrocarbonetos de cadeia longa, já que o diesel é composto por uma mistura de hidrocarbonetos com massa molecular mais elevada que a gasolina, mas não foi

observada nenhuma tendência nesse sentido nos demais hidrocarbonetos analisados.

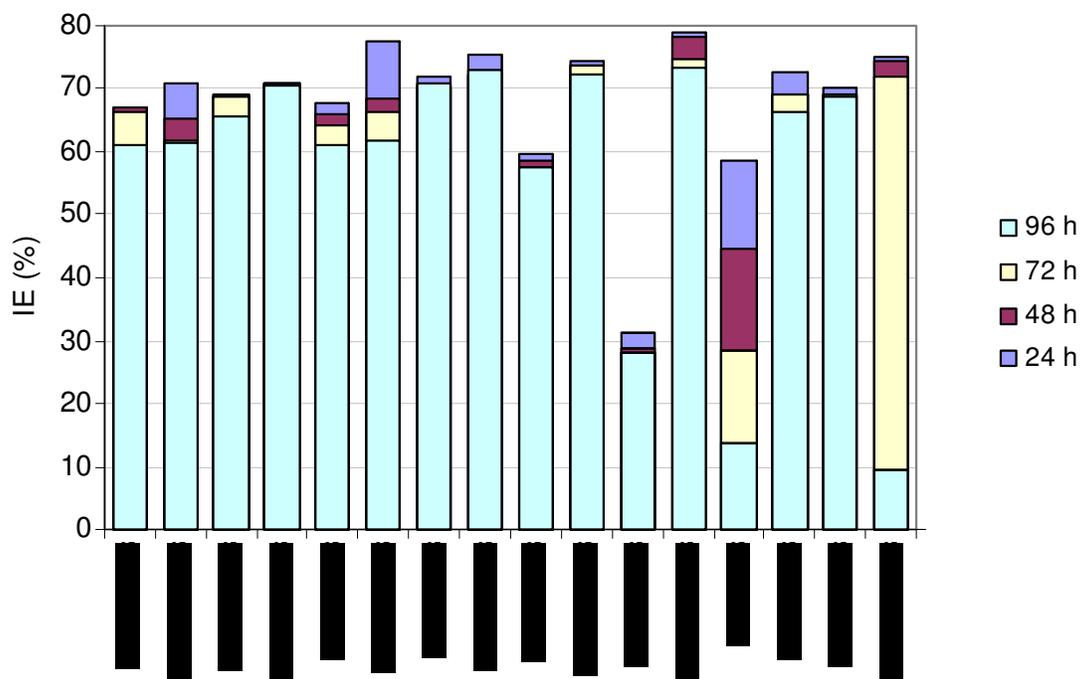


Figura 6. Índice de emulsificação (IE) de diferentes emulsões de hidrocarbonetos com biossurfactante de *Bacillus subtilis* LB5a (BS) e dodecil sulfato de sódio (SDS).



Figura 7. Emulsões (E_{24}) de solução 1mg/ml de biossurfactante com hidrocarbonetos: 1 (pentano), 2 (hexano), 3 (benzeno), 4 (tolueno), 5 (octano), 6 (decano), 7 (diesel) e 8 (gasolina).

Quando foram analisados os resultados referentes à emulsificação de óleos vegetais (Tabela 2 e Figura 8) observou-se que a efetividade destes foi bastante diferente nos óleos estudados. Além do biossurfactante de *Bacillus subtilis* LB5a (BS), o dodecil sulfato de sódio (SDS) e a lecitina de soja (LS) foram testados para servirem de referência. Neste estudo o SDS apresentou resultados melhores ou bastante próximos do IE₂₄ do biossurfactante em todos os óleos analisados. Quando são comparados os resultados de estabilidade de emulsão, o SDS apresentou os melhores resultados, seguido do BS e da LS, a exceção foi o óleo de babaçu, onde o BS apresentou significativa vantagem quando comparados aos outros surfactantes do estudo quando foi avaliada a estabilidade da emulsão no período estudado.

Em relação à estabilidade, cinco emulsões apresentaram uma redução percentual do IE maior que 10% no período analisado entre 24 e 96 horas para o biossurfactante (Tabela 2): o milho, com redução de 26,0%, a oliva, com redução de 15,8%, o babaçu, com redução de 17,3%, o algodão, com redução de 17,6% e o gergelim, com redução de 62,9%. No entanto as emulsões foram estáveis nas primeiras horas. A maior parte da variação ocorreu depois das 72 horas, com exceção do gergelim que essa variação ocorreu após 48h.

Tabela 2. Índice de emulsificação (IE) em diferentes óleos vegetais do biossurfactante de *Bacillus subtilis* LB5a e dodecil sulfato de sódio (SDS) e da lecitina de soja (LS).

	24 h			48 h				72 h				96 h				IE ₂₄ / IE ₉₆ (%)
	IE	SDS/ BS	LS/ BS	IE	IE ₂₄ / IE ₄₈ (%)	SDS/ BS	LS/ BS	IE	IE ₄₈ / IE ₇₂ (%)	SDS/ BS	LS/ BS	IE	SDS/ Bios (%)	SDS/ BS	LS/ BS	
Milho + BS	69,5			68,2	1,8			65,8	3,6			51,4	21,8			26,0
Milho + SDS	76,2	1,10		75,8	0,5	1,11		75,8	0,0	1,15		73,0	3,7	1,42		4,2
Milho + LS	9,8		0,13	9,8	0,0		0,13	8,2	16,7		0,11	3,3	60,0		0,04	66,7
Oliva + BS	63,2			56,1	11,2			55,6	0,8			53,2	4,3			15,8
Oliva + SDS	75,7	1,20		72,9	3,8	1,30		72,9	0,0	1,31		72,9	0,0	1,37		3,8
Oliva + LS	3,2		0,04	3,2	0,8		0,04	3,2	0,0		0,04	3,2	0,0		0,04	0,8
Palma + BS	86,1			85,5	0,7			85,4	0,1			81,4	4,7			5,4
Palma + SDS	100,0	1,16		100,0	0,0	1,17		91,4	8,6	1,07		91,4	0,0	1,12		8,6
Palma + LS	73,4		0,73	72,6	1,2		0,73	71,0	2,2		0,78	67,7	4,5		0,74	7,8
Babaçu + BS	62,2			55,6	10,5			50,2	9,6			51,4	-2,3			17,3
Babaçu + SDS	66,7	1,07		54,1	18,9	0,97		32,8	39,4	0,65		3,2	90,2	0,06		95,2
Babaçu + LS	79,2		1,19	79,2	0,0		1,46	56,9	28,1		1,74	56,3	1,1		17,46	28,9
Algod. + BS	67,6			67,6	0,0			56,4	16,5			55,7	1,3			17,6
Algod. + SDS	76,1	1,13		75,7	0,4	1,12		75,7	0,0	1,34		75,7	0,0	1,36		0,4
Algod. + LS	5,6		0,07	4,3	22,9		0,06	1,4	66,7		0,02	1,4	0,0		0,02	74,3
Gergel. + BS	78,3			73,8	5,7			61,2	17,1			29,1	52,5			62,9
Gergel. + SDS	73,8	0,94		71,9	2,7	0,97		70,3	2,2	1,15		65,6	6,7	2,26		11,1
Gergel. + LS	61,6		0,83	53,5	13,2		0,74	35,2	34,2		0,50	21,1	40,0		0,32	65,7
Giras. + BS	71,8			71,4	0,6			70,7	1,0			67,4	4,8			6,2
Giras. + SDS	77,1	1,07		75,7	1,9	1,06		75,7	0,0	1,07		75,7	0,0	1,12		1,9
Giras. + LS	34,2		0,44	15,3	55,4		0,20	12,3	19,3		0,16	6,8	44,4		0,09	80,0
Soja + BS	72,1			72,0	0,1			71,8	0,3			72,5	-1,0			-0,6
Soja + SDS	76,0	1,05		75,7	0,4	1,05		76,0	-0,4	1,06		75,7	0,4	1,04		0,4
Soja + LS	68,8		0,90	9,5	86,1		0,13	6,3	34,4		0,08	1,6	75,0		0,02	97,7

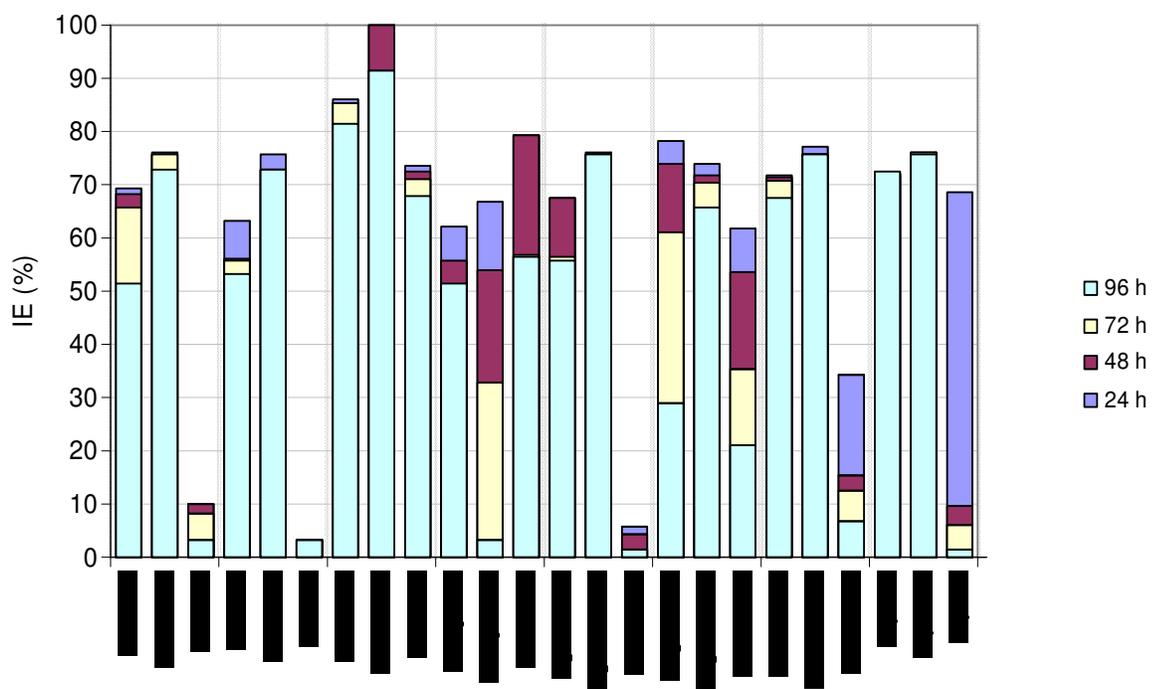


Figura 8. Índice de emulsificação (IE) em diferentes óleos vegetais do biossurfactante de *Bacillus subtilis* LB5a (BS), dodecil sulfato de sódio (SDS) e da lecitina de soja (LS).

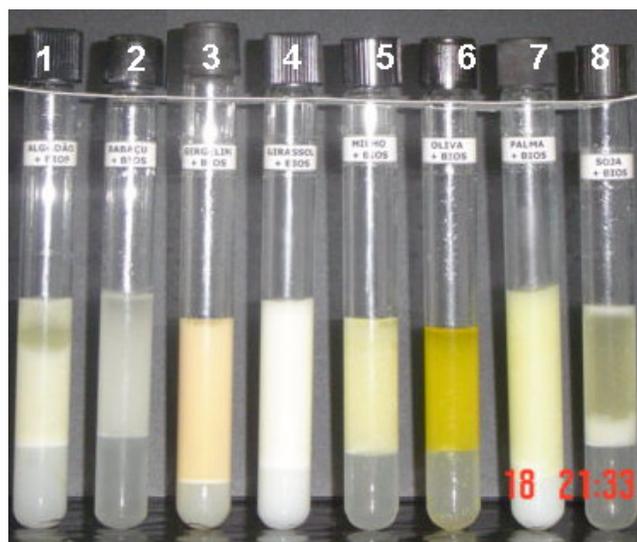


Figura 9. Emulsões (E_{24}) de solução 1 mg/ml de biossurfactante com óleos vegetais: 1 (algodão), 2 (babaçu), 3 (gergelim), 4 (girassol), 5 (milho), 6 (oliva), 7 (palma) e 8 (soja).

Não houve relação entre o tipo e tamanho das cadeias carbônicas dos ácidos graxos que compunham os óleos testados (Tabela 3) e os IE₂₄ (Tabela 2) das emulsões com biossurfactante.

Tabela 3. Composição de ácidos graxos dos óleos utilizados no experimento (Anvisa, 1999)

		Milho	Oliva	Palma	Babaçu	Algodão	Gergelim	Girassol	Soja
C 8:0	caprílico				2,6 - 7,3				
C 10:0	cáprico				1,2 - 7,6				
C 12:0	láurico			< 0,4	40 - 55				
C < 14	-	< 0,3				< 0,1	< 0,1	< 0,4	< 0,1
C 14:0	mirístico	< 0,1	< 0,05	0,5 - 2,0	11 - 27	0,4 - 2,0	< 0,5	< 0,5	< 0,5
C 16:0	palmitico	9 - 14	7,5 - 20	35 - 47	5,2 - 11	17 - 31	7 - 12	3 - 10	7 - 14
C 16:1	palmitoléico	< 0,5	0,3 - 3,5	< 0,6	1,8 - 7,4	0,5 - 2,0	< 0,5	< 1,0	< 0,5
C 17:0	margárico		< 0,3						
C 17:1	heptadecenóico		< 0,6						
C 18:0	esteárico	0,5 - 4,0	0,5 - 5,0	3,5 - 6,5	9 - 20	1 - 4	3,5 - 6	1 - 10	1,4 - 5,5
C 18:1	oléico	24 - 42	55 - 83	36 - 47	1,4 - 6,6	13 - 44	35 - 50	14 - 35	19 - 30
C 18:2	linoléico	34 - 62	3,5 - 21	6,5 - 15		33 - 59	35 - 50	55 - 75	44 - 62
C 18:3	linolênico	< 2	< 0,9	< 0,5		0,1 - 2,1	< 1	< 0,3	4 - 11
C 20:0	araquídico	< 1	< 0,6	< 1		< 0,7	< 1	< 1,5	< 1
C 20:1	eicosenóico	< 0,5	< 0,4			< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 1
C 22:0	behênico	< 0,5	< 0,2			< 0,5	< 0,5	< 1	< 0,5
C 22:1	erúcico					< 0,5		< 0,5	
C 24:0	lignocérico	< 0,5	< 0,2			< 0,5		< 0,5	
C 24:1	tetracosenóico							< 0,5	

4. CONCLUSÃO

O biossurfactante apresentou boa atividade superficial reduzindo a tensão da água de 72 para 27 mN/m e apresentando CMC de 12 mg/l. Também apresentou bons valores de estabilidade frente às variáveis testadas. Manteve sua atividade superficial quando submetido a 100°C por 140 minutos e 121°C por 60

minutos, não sofreu alterações em concentração de NaCl de até 20%. Em relação ao pH, o biossurfactante apresentou boa estabilidade entre 6 e 12.

Os resultados apresentados também mostram que o biossurfactante foi bastante efetivo na emulsificação de hidrocarbonetos e óleos vegetais, mesmo quando comparado ao SDS.

Esses resultados são bastante promissores em relação à possibilidade de aplicações em diversos setores industriais do biossurfactante analisado, além disso, a constatação é reforçada quando se sabe que o grau de pureza do surfactante sintético era maior que o grau de pureza do biossurfactante empregado no experimento.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abu-Ruwaida, A.S.; Banat, I.M.; Haditirto, S.; Salem, A. Kadri, M. Isolation of biosurfactant-producing bacteria product characterization, and deviation. **Acta Biotech.** 11: 315-324, 1991.
2. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 482 de 23/09/1999 revogada pela Resolução RDC nº 270, de 22/09/2005. Disponível on-line em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/482_99.htm. Acessada em dezembro de 2006
3. Banat, I.M. Les biosurfactants, plus que jamais sollicités. **Biofutur.** 198: 44-47, 2000.
4. Banat, I.M.; Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Potential commercial applications of microbial surfactants. **Appl Microbiol Biotechnol.** 53: 495-508, 2000.
5. Bognolo, G. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. **Colloids Surf.** 12: 41-52, 1999.
6. Cameotra S.S.; Makkar, R.S. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. **Curr Opin Microb.** 7: 262-266, 2004.

7. Cameotra, S.S.; Makkar, R.S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Appl Microbiol Biotechnol.** 50: 520-529, 1998.
8. Cooper D.G.; Goldenberg, B.G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Appl Environ Microb.** 53: 224-229, 1987.
9. Cooper, D.G.; Macdonald, C.R.; Duff, S.J.B.; Kosaric, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Appl Environ Microbiol.** 42: 408-412, 1981.
10. Costa, G.A.N. Produção biotecnológica de surfactante de *Bacillus subtilis* em resíduo agroindustrial, caracterização e aplicações. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2005.
11. Davis, D.A.; Lynch, H. C.; Varley, J. The application of foaming for the recovery of surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 cultures. **Enzyme Microb Technol.** 28: 346-354, 2001.
12. Deleu, M.; Razafindralambo, H.; Popineau, Y.; Jacques, P.; Thonart, P.; Paquot, M. Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. **Colloids Surf, A.** 152: 3-10, 1999.
13. Desai, J.D.; Banat, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiol Molec Biol Rev.** 61: 47-64, 1997.
14. Holmberg K. Natural surfactants. **Curr Opin Colloid Interface Sci.** 6: 148-159, 2001.
15. Kim, H.; Yoon, B.; Lee, C.; Suh, H.; Oh, H.; Katsuragi, T.; Tani, Y. Production and properties of a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. **J Ferment Bioeng.** 84: 41-46, 1997.
16. Kosaric, N. Biosurfactants in industry. **Pure Appl Chem.** 64: 1731-1737, 1992.
17. Lang, S. Biological amphiphiles (microbial surfactants) **Curr Opin Colloid Interface Sci.** 7: 12-20, 2002.
18. Maier, R.M. Biosurfactants: evolution and diversity in bacteria **Adv Appl Microbiol.** 52, 101-121, 2003.
19. Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. **J Ind Microb Biotech,** 18: 37-42, 1997.

20. Makkar, R.S.; Cameotra, S.S. Structural characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* at 45 °C. **J Surfactants and Deterg**, 2:367-372, 1999.
21. Mulligan, C.N. Environmental applications for biosurfactants. **Environ Pollut**. 133: 183-198, 2005.
22. Nitschke, M. Pastore, G.M. Cassava flour wastewater as a substrate for biosurfactant production. **Appl Biochem Biotechnol**. 106: 295-302, 2003.
23. Nitschke, M. Produção e caracterização de biossurfactante de *Bacillus subtilis* utilizando manipueira como substrato. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2004.
24. Nitschke, M.; Haddad, R.; Costa, G.A.N.; Gilioli, R.; Meurer, E.C.; Gatti, M.S.; Eberlin, M.N.; Höehs, N.F.; Pastore, G.M.; Structural characterization and biological properties of a lipopeptide surfactant produced by *Bacillus subtilis* on cassava wastewater medium. **Food Sci Biotechnol**. 13: 591-596, 2004.
25. Nitschke, M; Pastore, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresour Technol**. 97: 336-341, 2006.
26. Peypoux, F.; Bonmatin, J.M.; Wallach, J. Recents trends in biochemistry of surfactin. **Appl Microbiol Biotechnol**. 51: 553-563, 1999.
27. Sheppard, J.D.; Mulligan, C.N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Appl Microbiol Biotechnol**. 27: 110-116, 1987.
28. TECPAR – Instituto de Tecnologia do Paraná; SBRT – Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas. **Resposta técnica: informações sobre o balanço lipofílico e hidrofílico da lecitina de soja**. 2006. Disponível on-line em: <http://www.sbrt.ibict.br>. Acessada em dezembro de 2006.

CONCLUSÕES GERAIS

- O estudo da ampliação de escala mostrou ser possível conciliar a produção de biossurfactante de *Bacillus subtilis* da linhagem LB5a em escala piloto utilizando manipueira como substrato com a manutenção das características do produto bem como dos índices de produtividade;
- O processo de recuperação primária do surfactante através da coleta de espuma se mostrou efetivo para a escala estudada;
- O biossurfactante produzido apresentou elevada atividade superficial, estabilidade frente a temperaturas extremas, alta salinidade e uma larga faixa de pH, além de produzir emulsões estáveis na maioria dos óleos e hidrocarbonetos testados;
- Os parâmetros relacionados ao preparo da manipueira (tempo e temperatura de aquecimento e tempo e aceleração de centrifugação) foram otimizados, permitindo um melhor aproveitamento do resíduo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produtividade e as características do biossurfactante produzido em manipeira apontam para uma promissora área de estudo onde será possível desenvolver novas metodologias de produção e estudos de aplicação como, por exemplo:

- ✓ Desenvolvimento de processo contínuo;
- ✓ Combinação do uso do biossurfactante a outros processos biotecnológicos estudados pelo Laboratório de Bioaromas – Unicamp, especialmente os relacionados á biotransformação de compostos hidrofóbicos;
- ✓ Aprofundamento dos estudos das propriedades biológicas;
- ✓ Aperfeiçoamento do processo de recuperação primária através da otimização dos parâmetros relacionados à produção de espuma considerando seus impactos na produtividade;
- ✓ Utilização de outros procedimentos relacionados à purificação da espuma, especialmente a ultrafiltração, visando a redução de custos e de produção do volume resíduos;
- ✓ Melhoramento da linhagem através via engenharia genética para aumento de produtividade.