UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia das Fermentações

Produção biotecnológica de biossurfactante por *Lactococcus lactis*
CECT-4434 a partir de resíduos agroindustriais e avaliação de suas
propriedades

Ellen Cristina Souza Vera

Tese para obtenção do Título de Doutora

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de
Souza Oliveira

São Paulo
2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica
Área de Tecnologia das Fermentações

Produção biotecnológica de biossurfactante por *Lactococcus lactis*
CECT-4434 a partir de resíduos agroindustriais e avaliação de suas
propriedades

Ellen Cristina Souza Vera

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTORA

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de
Souza Oliveira

São Paulo
2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

V473p Vera, Ellen Cristina Souza
Produção biotecnológica de biossurfactante por
Lactococcus lactis CECT-4434 a partir de resíduos
agroindustriais e avaliação de suas propriedades /
Ellen Cristina Souza Vera. - São Paulo, 2017.
136 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Oliveira, Ricardo Pinheiro de Souza

1. Biossurfactante. 2. resíduos agroindustriais.
3. bacteriocina. 4. oxigenação. 5. capacidade
antiadesiva e antimicrobiana. I. T. II. Oliveira,
Ricardo Pinheiro de Souza, orientador.

Ellen Cristina Souza Vera

Produção biotecnológica de biossurfactante por *Lactococcus lactis*
CECT-4434 a partir de resíduos agroindustriais e avaliação de suas
propriedades

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTORA

Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

*Ao meu esposo Thiago e a meus pais,
Noemi e Leonardo, que sempre me apoiaram em
tudo o que fiz e por todo amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente e especialmente a Deus pela ajuda, força e confiança que Este tem me proporcionado. Por ter sido o meu guia, iluminando minha mente e me dando sabedoria para concluir esta pesquisa, de acordo com Seu querer em minha vida.

A meu esposo Thiago, que esteve comigo em todos os momentos, me dando força e animo para prosseguir.

A meus pais pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, por sua orientação. Declaro aqui minha enorme admiração e agradeço pela confiança, apoio e incentivo.

Aos Profs. Drs. Attilio Converti e José Manuel Domínguez pela contribuição e auxílio na elaboração dos artigos.

A todos os professores, sem exceção, pelos conhecimentos a mim passados e por todos os momentos que passamos juntos.

Aos amigos Pamela, Anna, Tais, Sabrina, Tamires e Gabriel, pela alegria, ajuda e, sobretudo, pelos diálogos amigáveis.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento concedido à esta pesquisa, processo nº2013/15065-0.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente ajudaram na elaboração deste trabalho.

“Adquire a sabedoria, adquiere a inteligência e não te esqueças nem te apartes das palavras da minha boca”.

Provérbios 4:5

RESUMO

VERA, E.C.S. **Produção biotecnológica de biossurfactante por *Lactococcus lactis* CECT-4434 a partir de resíduos agroindustriais e avaliação de suas propriedades.** 2017. 136f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A bactéria *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT-4434 foi empregada para investigar o efeito da composição do meio de cultivo na produção biotecnológica de biossurfactante e, adicionalmente bacteriocina. Utilizou-se resíduos agroindustriais, tais como soro de leite e vinhaça de uva, para formular meios de cultivos mais econômicos e naturais, suplementados sacarose e extrato de levedura. Um planejamento fatorial fracionado 2⁴, com adição de três ensaios nos pontos centrais foi empregado para avaliar a influência destas variáveis. A produção de biossurfactante foi influenciada positivamente pela concentração soro de leite, onde 15 % deste demonstrou melhor resultado reduzindo a tensão superficial em cerca de 18,1 mN/m, alcançando produção máxima de biossurfactante equivalente em surfactina de 11,02 mg/L. Em relação à síntese de bacteriocina, a fonte de carbono adicional (sacarose) interferiu de forma antagonista, ou seja, quanto menor a concentração de sacarose, maior a síntese de bacteriocina (com aumento da zona de inibição em 14,2% contra *Staphylococcus aureus* CECT-239). Observou-se que o ensaio conduzido em biorreator, sob microaeração com 5% de oxigênio dissolvido, promoveu maior produção de biossurfactante (11,6 mg/L) quando comparados aos estudos conduzidos com maior concentração de oxigênio entre 30 a 100%, com produção em média de 2,3 mg/mL. Destaca-se que nenhum estudo da influência do oxigênio dissolvido, principalmente em microaerofilia, para a produção de biossurfactante por bactérias lácticas já havia sido realizado. Ademais, o biossurfactante produzido se mostrou altamente estável frente a valores extremos de pH e temperatura, além de demonstrar notável propriedade antimicrobiana e antiadesiva, inibindo *Listeria monocytogenes* NADC 2045 e *Salmonella enterica* CECT-724 em mais de 90%.

Palavras-chaves: Biossurfactante, resíduos agroindustriais, bacteriocina, oxigenação, capacidade antiadesiva e antimicrobiana.

ABSTRACT

VERA, E.C.S. **Biotechnological production of biosurfactant by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial residues and evaluation of its properties.** 2017. 136f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Lactococcus lactis subsp. *lactis* CECT-4434 was used to investigate the effect of the composition of the culture media on the biotechnological production of biosurfactant and bacteriocin additionally. Agroindustrial residues, such as whey and grape vinasse, were used to formulate more economical and natural culture media, supplemented with sucrose and yeast extract. A fractional factorial design 2^4 , with addition of three runs at the central points was used to evaluate the influence of these variables. The biosurfactant production was positively influenced by the concentration of whey, where 15% showed a better result reducing the surface tension by 18.1 mN/m, reaching a maximum production of biosurfactant equivalent in surfactin of 11.02 mg/L. In relation to bacteriocin synthesis, the sucrose interfered in an antagonistic way, that is, the lower the sucrose concentration, the greater the bacteriocin synthesis (with an increase in the zone of inhibition in 14.2% against *Staphylococcus aureus* CECT-239). It was observed that the bioreactor conducted under microaeration with 5% dissolved oxygen promoted a higher biosurfactant production (11.6 mg/L) when compared to studies conducted with a higher concentration of oxygen between 30 and 100%, with production on average 2.3 mg/mL. It is noteworthy that no study of the influence of dissolved oxygen, mainly in microaerophilic, for the biosurfactant production by lactic acid bacteria had already been carried out. In addition, the biosurfactant produced proved to be highly stable against extreme values of pH and temperature, and demonstrated remarkable antimicrobial and antiadhesive properties, inhibiting *Listeria monocytogenes* NADC 2045 and *Salmonella enterica* CECT-724 in more than 90%.

Keywords: Biosurfactant, agroindustrial residues, bacteriocin, oxygenation, antiadhesive and antimicrobial capacity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Ação do biossurfactante e formação de micelas (Concentração Micelar Crítica, CMC).....	16
Figura 1.2. Representação de estruturas de biossurfactante.	18
Figura 1.3. Potenciais vias biossintéticas para a produção de biossurfactante (BS).....	22
Figura 1.4. Efeito inibitório da formação de biofilmes através do condicionamento da superfície por biossurfactante.....	37
Figura 4.1. Consumo de glicose (●), tensão superficial (■) e produção de ácido lático (◆). a. 30°C; b. 37°C; c. 40°C.	57
Figura 4.2. Exemplo de análise do fator de diluição (F _{cmc}).....	60
Figura 4.3. Diagrama de Pareto medindo a influência dos substratos na produção do biossurfactante, utilizando planejamento composto central 2 ⁴ . (1) % Soro de leite; (2) % Vinhaça; (3) % Sacarose; (4) % Extrato de levedura. Significância dos efeitos em nível de confiabilidade a 95% são representados pela linha de corte (p=0,05).	66
Figura 4.4. Valores preditos e observados para redução da TS (mN/m). Erro puro: 0,1636333 .67	
Figura 4.5. Superfície de resposta de redução da TS, mediante diferentes porcentagens de vinhaça e soro de leite, mantendo-se as outras variáveis constantes no valor médio de concentração.....	68
Figura 4.6. Avaliação da contração de soro de leite sobre a redução da tensão superficial.	69
Figura 4.8. Diagrama de Pareto medindo a influência dos substratos sobre a zona de inibição de <i>S. aureus</i> , utilizando planejamento composto central 2 ⁴ . (1) % Soro de leite; (2) % Vinhaça; (3) % Sacarose; (4) % Extrato de levedura. Significância dos efeitos em nível de confiabilidade a 95% são representados pela linha de corte (p=0,05).	75
Figura 4.9. Valores preditos e observados para inibição de <i>S. aureus</i> . Erro puro: 0,1636333.....	76
Figura 4.10. Perfis para valores previstos e modelo desejável para otimizar a produção de bacteriocina. As linhas tracejadas indicam os valores de otimização.	77
Figura 4.11. Redução de tensão superficial (TS _{red}) sob influência da oxigenação, sendo: 0% (anaerobiose) (○), 5% (◇), 30% (■), 60% (▲) e 100 (◆) de OD	81
Figura 4.12. Concentração de Biossurfactante sob influência da concentração de oxigênio dissolvido, sendo: 0% (anaerobiose) (○), 5% (◇), 30% (■), 60% (▲) e 100 (◆) de OD.....	83
Figura 4.13. Concentração micelar crítica do biossurfactante produzido por <i>Lc. lactis</i> CECT-4434	86
Figura 4.14. Efeito do pH sobre o biossurfactante produzido por <i>Lc. lactis</i> CECT-4434.....	88
Figura 4.15. Efeito da temperatura sobre o biossurfactante produzido por <i>Lc. lactis</i> CECT-4434	88
Figura 4.16. Espectro FTIR do biossurfactante produzido por <i>Lc. Lactis</i> CECT-4434.	97
Figura 4.17. Espectro 1H-RMN do biossurfactante produzido por <i>Lc. lactis</i> CECT-4434.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Tabela de variáveis e níveis avaliados no delineamento.....	45
Tabela 3.2. Matriz do delineamento de composto central (CCD) 2 ⁴ com três pontos centrais, segundo a Tabela 3.1, exceto o ensaio controle.....	45
Tabela 4.1. Efeitos da temperatura sobre parâmetros analisados no ensaio preliminar.....	56
Tabela 4.2. Cinética da produção de biossurfactante.....	59
Tabela 4.3. Valores de crescimento celular, pH, produção de ácido lático, consumo de lactose, tensão superficial (TS), redução da tensão superficial (TSred), fator de diluição e concentração de [BS], obtidos no planejamento experimental proposto	62
Tabela 4.4. Coeficientes de regressão estatística para redução de TS (mN/m) após 6h.....	65
Tabela 4.5. Valores de crescimento celular, pH e halos de inibição de <i>S. aureus</i> obtidos no planejamento experimental proposto.....	72
Tabela 4.6. Coeficientes de regressão estatística para zona de inibição (mm) de <i>S. Aureus</i> CECT-239..	74
Tabela 4.7. Crescimento microbiano (g/L) sob influência de oxigênio dissolvido em biorreator	79
Tabela 4.8. pH e produção de ácido lático (g/L) sob influência de OD em biorreator	80
Tabela 4.9. Consumo de lactose (g/L) sob influência do oxigênio dissolvido.....	84
Tabela 4.10. Atividade antimicrobiana do biossurfactante produzido por <i>Lc. lactis</i> CECT-4434. Cepas indicadoras: (a) <i>S. aureus</i> ATCC 10390; (b) <i>S. aureus</i> CECT-239; (c) <i>L. monocytogenes</i> NACD 2045; (d) <i>L. monocytogenes</i> CECT-934; (e) <i>E. coli</i> ATCC 25922; (f) <i>S. enterica</i> CECT-724. Inibição: (+) até 50%; (++) acima de 50%; (+++) acima de 90%; propiciou crescimento: (-) até 50%; (- -) acima de 50%; (- - -) acima de 90%.	90
Tabela 4.11. Atividade antiadesiva do biossurfactante produzido por <i>Lc. lactis</i> CECT-4434. Cepas indicadoras: (a) <i>S. aureus</i> ATCC 10390; (b) <i>S. aureus</i> CECT-239; (c) <i>L. monocytogenes</i> NACD 2045; (d) <i>L. monocytogenes</i> CECT-934; (e) <i>E. coli</i> ATCC 25922; (f) <i>S. enterica</i> CECT-724. Redução de adesão: (+) até 50%; (++) acima de 50%; (+++) acima de 90%.	93
Tabela 4.12. Capacidade de remoção de microrganismos por limpeza com biossurfactante produzido por <i>Lc. lactis</i> CECT-4434. Cepas indicadoras: (a) <i>S. aureus</i> ATCC 10390; (b) <i>S. aureus</i> CECT-239; (c) <i>L. monocytogenes</i> NACD 2045; (d) <i>L. monocytogenes</i> CECT-934; (e) <i>E. coli</i> ATCC 25922; (f) <i>S. enterica</i> CECT-724. Remoção: (+) até 50%; (++) acima de 50%; (+++) acima de 90%.	95

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Tensão Superficial e CMC	15
1.2. Biossurfactantes e microrganismos produtores.....	17
<i>1.2.1. Classificação dos biossurfactantes</i>	<i>17</i>
<i>1.2.2. Tipos de microrganismos produtores de biossurfactante.....</i>	<i>18</i>
<i>1.2.3. Produção de biossurfactante e bacteriocina por bactérias lácticas.....</i>	<i>20</i>
1.3. Produção de Biossurfactantes	21
<i>1.3.1. Vias metabólicas para a produção de biossurfactantes</i>	<i>21</i>
<i>1.3.2. Estratégias para redução de custos.....</i>	<i>23</i>
<i>1.3.3. Substratos alternativos: Resíduos industriais</i>	<i>24</i>
<i>1.3.3.1. Melaço.....</i>	<i>25</i>
<i>1.3.3.2. Óleos de Fritura</i>	<i>26</i>
<i>1.3.3.3. Compostos lignocelulósicos.....</i>	<i>27</i>
<i>1.3.3.4. Soro de Leite</i>	<i>28</i>
<i>1.3.3.5. Vinhaça de uva.....</i>	<i>30</i>
<i>1.3.4. Efeito da oxigenação sobre a produção de biossurfactante</i>	<i>32</i>
1.4. Propriedades dos biossurfactantes	34
<i>1.4.1. Estabilidade sob pH e temperaturas extremos.....</i>	<i>34</i>
<i>1.4.2. Atividade antimicrobiana.....</i>	<i>35</i>
<i>1.4.3. Atividade Antiadesiva</i>	<i>36</i>
1.5. Aplicação industrial dos biossurfactantes.....	39
2. OBJETIVO GERAL	43
2.1. Objetivos específicos	43
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1. Microrganismos e pré-inóculo	44
3.2. Avaliação dos parâmetros de cultivo	44
3.3. Planejamento experimental.....	45
3.4. Procedimento experimental.....	46
<i>3.4.1. Condições de cultivo em agitador metabólico</i>	<i>46</i>
<i>3.4.2. Preparo dos substratos alternativos</i>	<i>47</i>
<i>3.4.2.1. Soro de leite.....</i>	<i>47</i>
<i>3.4.2.2. Vinhaça.....</i>	<i>47</i>
<i>3.4.3. Biorreator em regime descontínuo.....</i>	<i>48</i>
<i>3.4.3.1. Influência da oxigenação</i>	<i>48</i>
<i>3.4.4. Procedimento das análises.....</i>	<i>49</i>
<i>3.4.4.1. Extração de bacteriocina</i>	<i>49</i>

3.4.4.2. Recuperação e análise do biossurfactante	49
3.4.4.3. Determinação de ácido láctico, lactose e glicose	51
3.5. Semi-purificação do biossurfactante.....	51
3.6. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC).....	51
3.7. Avaliação das propriedades do biossurfactante.....	52
3.7.1. Estudos de estabilidade do biossurfactante em condições extremas de pH e temperatura.....	52
3.7.2. Estudo da capacidade antimicrobiana do biossurfactante frente a diversos microrganismos patogênicos.....	52
3.7.3. Estudo da inibição da adesão de microrganismos patogênicos a superfícies sólidas ao utilizar biossurfactante.....	53
3.7.4. Estudo da remoção de microrganismos patogênicos aderidos em superfície sólida através de limpeza com biossurfactante.....	54
3.8. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IV) e Ressonância magnética nuclear (RMN).....	55
3.9. Análise Estatística.....	55
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	56
4.1. Avaliação dos parâmetros de cultivo	56
4.2. Otimização da produção de biossurfactante e bacteriocina por <i>Lc. lactis</i> CECT-4434.....	61
4.2.1. Produção de biossurfactante por planejamento experimental	61
4.2.2. Otimização da produção de bacteriocina por planejamento experimental	71
4.2.2.1. Estudo estatístico da produção de bacteriocina	73
4.3. Biorreator – Influência da oxigenação.....	78
4.4. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC).....	85
4.5. Avaliação das propriedades do biossurfactante.....	87
4.5.1. Estabilidade do biossurfactante em condições extremas de pH e temperatura	87
4.5.2. Capacidade antimicrobiana do biossurfactante	89
4.5.3. Inibição da adesão de microrganismos patogênicos a superfícies sólidas ao utilizar biossurfactante.....	92
4.5.4. Remoção de microrganismos patogênicos aderidos em superfície sólida através de limpeza com biossurfactante	94
4.6. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância magnética nuclear (RMN).....	96
CONCLUSÕES.....	99
SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
APÊNDICE.....	115
ANEXOS.....	132

1. INTRODUÇÃO

Surfactantes compõem uma importante classe de produtos químicos com uma grande variedade de aplicações domésticas e industriais (SINGH; HAMME; WARD, 2007; FRANZETTI et al. 2010). Muitos desses surfactantes são derivados de petróleo ou quimicamente sintetizados, com produção anual estimada em mais de 15 milhões de toneladas em 2011 com expectativa de crescimento de apenas 2 a 3% ao longo desta década (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2013).

Algumas atividades básicas diárias são em sua maioria dependentes do uso de diferentes tipos de surfactantes como em produtos de higiene pessoal, cosméticos e farmacêuticos. O mercado para estes produtos, por conseguinte, é enorme e sua demanda cada vez maior (SATPUTE et al., 2010a; MARCHANT; BANAT, 2012). Em 2010, Cameotra et al. relataram que houve aumento de produção dos surfactantes em 2-4%, e Chen, Juang e Wei (2015) estimam que o mercado para estes compostos deva aumentar robustamente.

Randhawa (2015) relatou que o descarte do surfactante químico trifosfato de sódio, utilizado em diversos produtos industriais e domésticos, por exemplo detergente de roupas), tem causado eutrofização e, conseqüentemente, a proliferação de algas provocando a redução de oxigênio de águas naturais. Em virtude destes problemas, o Regulamento (EU) nº 259/2012 (SCHULZ; WAMMEN, 2012) limitou o uso de fosfatos em detergentes para roupa utilizados pelos consumidores para 0,5 g, vigorando a partir de junho de 2013, e para detergentes de louça estabeleceu um limite de 0,3 g, a partir de janeiro de 2017.

Devido a não-biodegradabilidade e à toxicidade dos surfactantes químicos, o aumento da preocupação ambiental com os danos causados por estes compostos levou a um avanço no campo da biotecnologia sustentável em busca por surfactantes de origem natural, denominados de biossurfactantes (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2011). *Transparency Market Research* (2013) publicou uma matéria descrevendo que o mercado mundial de biossurfactante está progredindo e é esperado que atinja \$ 2210,5 milhões de dólares em 2018 com um volume de 476.512,2 toneladas de produção.

O biossurfactante foi descoberto no final de 1960, sendo, na época, definido como um composto extracelular anfipático produzido em processo de fermentação utilizando petróleo como material base (KITAMOTO; TOMA; HATO, 2005). Segundo os referidos autores, no início de sua descoberta, os biossurfactantes atraíram maior atenção, devido principalmente à sua maior biodegradabilidade em comparação aos surfactantes químicos. Além desta

característica, os biossurfactantes ainda apresentam baixa toxicidade, maior compatibilidade com o meio ambiente, e estabilidade mesmo sob condições extremas de temperatura, pH e salinidade (CAMEOTRA et al., 2010; CHEN; JUANG; WEI, 2015), apresentando estruturas mais volumosas, baixa concentração micelar crítica e maior atividade superficial que os surfactantes químicos (KITAMOTO et al., 2009).

Segundo Yeh, Wei e Chang (2005), os surfactantes químicos são tipicamente categorizados de acordo com sua cadeia polar hidrofílica, sendo (i) aniônicos, (ii) catiônicos, (iii) não iônicos e (iv) zwitteriônicos. Já os biossurfactantes, conforme Chen, Juang e Wei (2015), são classificados em cinco categorias de acordo com sua estrutura química e origem microbiana: (i) glicolipídeos, (ii) fosfolipídeos e ácidos graxos, (iii) lipopeptídeos ou lipoproteínas, (iv) surfactantes poliméricos e (v) surfactantes particulados.

O termo biossurfactante é utilizado para referir-se a qualquer surfactante de origem natural, ou àqueles obtidos por ligações químicas de grupos polares e cadeias hidrofóbicas, obtidas de fontes naturais (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2011; HAUSMANN; SYDALTK, 2015). Estruturalmente, todos os biossurfactantes são formados por uma molécula hidrofílica (ácidos, peptídeos catiônicos ou aniônicos, mono-, di-, ou polissacarídeos) e uma porção hidrofóbica composta por cadeias de hidrocarbonetos saturados ou insaturados ou por ácidos graxos, compreendendo uma cadeia de aproximadamente 8-18 átomos de carbono (HAUSMANN; SYDATK, 2015; SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011).

Devido à sua característica tensoativa, os biossurfactantes reduzem a tensão superficial e interfacial de líquidos ou diferentes fases orgânicas entre gás, líquidos e sólidos (FRANZETTI et al., 2014). Estas propriedades desempenham um papel importante em vários campos, tais como biorremediação, biodegradação, recuperação de petróleo, alimentos, farmacêuticos, e muitas outras aplicações em diferentes setores industriais (BANAT et al., 2010; FRACCHIA et al., 2014).

1.1. Tensão Superficial e CMC

A tensão superficial está relacionada com as forças de atração e repulsão entre as moléculas de um fluido. Para manter as moléculas coesas na superfície líquida, estas exercem uma força de atração intermolecular forte sobre as moléculas mais próximas da superfície, denominada tensão superficial. Assim, os líquidos tendem a diminuir sua área de superfície, formando gotas esféricas que apresentam menor razão superfície/volume. Em termos físicos, a

tensão superficial seria a energia necessária para dilatar a superfície de um líquido. Quanto maior a coesão entre as moléculas do líquido, maior será o trabalho necessário para aumentar a distância entre elas, isto é, quanto maior a força de atração entre as moléculas, maior será a tensão superficial (PIRÔLLO et al., 2008).

Quando uma molécula anfipática de biossurfactante é adicionada em um meio aquoso, a porção hidrofóbica do mesmo se agrupa sobre a superfície do líquido, a fim de minimizar as interações energéticas das moléculas polares da água. Isto ocorrerá até a superfície líquida saturar, a partir de então, as pontes de hidrogênio que promovem a alta tensão superficial do líquido são rompidas, e a tensão superficial (líquido-ar) ou interfacial (líquido-líquido) tendem a baixar (MULLIGAN, 2009; SOBERÓN-CHÁVEZ; MAIER, 2011; VAN HAMME; URBAN, 2009).

Por conseguinte, a produção e atividade do biossurfactante é avaliada através da medição das mudanças de tensão superficial, utilizando um tensiômetro para tal (RAHMAN; GAKPE, 2008). Uma vez que as moléculas de biossurfactante estão presentes em um meio aquoso, sua tensão superficial reduz até chegar a um nível crítico, onde as moléculas anfipáticas formam complexos moleculares como micelas, vesículas e lamelas (bicamadas contínuas), conhecido como Concentração Micelar Crítica (CMC) (Figura 1.1), que é o estado de menor energia entre a água e as moléculas de biossurfactantes (DESAI; BANAT, 1997; VAN HAMME; URBAN, 2009). Esses complexos moleculares são resultado de numerosas interações químicas fracas entre a parte polar e porção não polar, incluindo pontes de hidrogênio e ligação de Van der Waals (SOBERÓN-CHAVEZ; MAIER, 2011).

Nas micelas, os monômeros de biossurfactante se organizam de maneira que a porção hidrofóbica fique voltada para o centro, constituindo o núcleo e a parte hidrofílica para a superfície da esfera, fazendo interface com a água (SOBERÓN-CHAVEZ; MAIER, 2011).

Figura 1.1. Ação do biossurfactante e formação de micelas (Concentração Micelar Crítica, CMC).

FONTE: Santos et al., 2016.

A eficiência do biossurfactante é determinada pela CMC (SOBERÓN-CHAVÉZ; MAIER, 2011). Um biossurfactante eficiente possui baixa CMC, ou seja, uma menor quantidade de surfactante é necessária para diminuir a tensão superficial, demonstrando maior efetividade e eficácia que os surfactantes químicos (APARNA; SRINIKETHAN; SMITHA, 2011; DESAI; BANAT, 1997). A surfactina é um dos biossurfactante mais eficientes que se tem conhecimento, reduzindo a tensão superficial da água de 72 mN/m para 27 mN/m, que é próximo do valor mínimo detectável (SEYDLOVÁ; SVOBODOVÁ, 2008).

1.2. Biossurfactantes e microrganismos produtores

1.2.1. Classificação dos biossurfactantes

A maioria dos biossurfactantes tem caráter aniônico ou neutro, enquanto alguns que, contém grupos amina, são catiônicos, mas todos compreendem uma parte hidrofóbica contendo uma grande cadeia de ácidos graxos, enquanto a parte hidrofílica pode ser composta por carboidratos, peptídeos cíclicos, amino ácidos, fosfatos carboxil ácidos ou álcoois (SANTOS et al. 2016). Sendo assim, os biossurfactantes exibem uma série de estruturas químicas classificadas como Glicolipídeos, Lipopeptídeos ou Lipoproteínas, Lipopolissacarídeos, Fosfolipídeos, Ácidos graxos, Lipídeos neutros e biossurfactantes poliméricos (CHEN; JUANG; WEI, 2015; RODRÍGUEZ et al., 2010a).

Glicolipídeos, são os tipos de biossurfactantes mais conhecidos, sendo rhamolipídeos, soforolipídeos (Figura 1.2) e trehaloselipídeos os mais encontrados (SANTOS et al., 2016). Eles consistem em mon-, di-, tri-, e tetrasacarídeos que incluem rhamnose, glicose, mannose, galactose, ácido glucurônico e sulfato de galactose (RAHMAN; GAKPE, 2008). Segundo Desai e Banat (1997), eles são formados por carboidratos combinados a uma longa cadeia de ácidos alifáticos ou ácidos hidroxialifáticos.

Lipopeptídeos ou lipoproteínas são peptídeos cíclicos de ocorrência natural que contém uma única cadeia de ácidos graxos, sendo a classe de biossurfactante mais descrita por sua atividade antimicrobiana (KANMANI et al., 2013). O lipopeptídeo mais conhecido é denominado surfactina (Figura 1.2), produzida por *Bacillus* sp., um dos biossurfactantes mais potentes, capaz de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m, com uma concentração menor que 0,005% (RAHMAN; GAKPE, 2008).

Os lipopolissacarídeos são constituídos por uma cadeia de polissacarídeos unida, por uma ligação éster, a uma fração lipídica composta por radicais ácidos saturados e/ou insaturados, com comprimento de 10 a 18 átomos de carbono (PROSPERI et al., 2000).

Figura 1.2. Representação de estruturas de biossurfactante.

FONTE: Soberón-Chavez; Maier, 2011.

Ácidos graxos e fosfolipídeos podem ser produzidos por diferentes bactérias e leveduras durante seu crescimento utilizando n-alcenos como substrato (SANTOS et al., 2016; RAHMAN; GAKPE, 2008). O tamanho da cadeia de hidrocarbonetos determina o balanço hidrofílico e lipofílico dos ácidos graxos, os biossurfactantes desta categoria são mais ativos quando em cadeia com C12-C14 carbonos (ROSENBERG; RON, 1999).

Os Biossurfactantes Poliméricos mais estudados são conhecidos como emulsan, liposan, lipomanan, alasan, mannoproteína e complexo polissacarídeo-proteína (DESAI; BANAT, 1997; SANTOS et al., 2016).

1.2.2. Tipos de microrganismos produtores de biossurfactante

O interesse científico em isolar microrganismos produtores de biossurfactante de baixo CMC, baixa toxicidade e alta atividade emulsificante tem aumento nas últimas décadas (CAMPOS et al., 2013). Sabe-se que diversos microrganismos, como bactérias, leveduras e

alguns fungos filamentosos, são capazes de produzir biossurfactante com diferentes estruturas moleculares e atividade superficial (SILVA et al., 2014).

A literatura descreve que os melhores produtores de biossurfactante são do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus*. Contudo, existem outros microrganismos que também tem apresentado ótimos resultados, como é o caso da *Candida bombicola* e *Candida lipolytica*, as leveduras mais estudadas quanto a produção de biossurfactante, além da *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, que possuem o status de GRAS, isto é, “geralmente consideradas seguras” (SANTOS et al., 2016). O Quadro 1.1 descreve alguns tipos de biossurfactantes e seus respectivos microrganismos produtores.

Quadro 1.1. Tipos de biossurfactantes e microrganismos produtores

Tipo de biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídeos	<i>Alcanivorax borkumensis</i> , <i>Arthrobacter</i> sp.,
	<i>Corynebacterium</i> sp., <i>Rhodococcus erythropolis</i> ,
	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Tsukamurela</i> sp.
Rhamnolipids	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Serratia rubidea</i>
Soforolipídeos	<i>Candida apicola</i> , <i>Candida bombicola</i>
	<i>Candida lipolytica</i> , <i>Candida bogoriensis</i>
Trehaloselipídeos	<i>Arthrobacter paraffineus</i> , <i>Corynebacterium</i> sp.
	<i>Mycobacterium</i> sp., <i>Nocardia</i> sp
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> .
Lipopolissacarídeos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (RAG1)
	<i>Pseudomonas</i> sp., <i>Candida lipolytica</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>
Lichenisina A e B	<i>Bacillus licheniformis</i>
Fosfolipídeos	<i>Acinetobacter</i> sp.
Ácidos Graxos	<i>Penicillium spiculispurum</i> , <i>Corynebacterium lepus</i>
	<i>Talaromyces trachyspermus</i> , <i>Nocardia erythropolis</i>
Particulado	<i>Pseudomonas marginalis</i>

FONTE: Santos et al., 2016

Conforme Campos et al. (2013) organismos considerados como GRAS, não oferecem riscos de toxicidade ou patogenicidade, permitindo seu uso nas indústrias farmacêuticas e alimentícias. As bactérias ácido-láticas (BAL) também reconhecidas como GRAS pela FDA (US-Food and Drug Administration) (ARAUZ et al., 2009), têm sido recentemente estudadas quanto à sua habilidade em produzir biossurfactantes (GALABOVA et al., 2014; PORTILLA-RIVERA et al. 2008; RODRÍGUEZ et al., 2010a).

1.2.3. Produção de biosurfactante e bacteriocina por bactérias lácticas

As bactérias ácido-láticas (BAL) são cocos ou bastonetes Gram-positivos, reconhecidas como *Generally Recognized as Safe* (GRAS) pela FDA (US-Food and Drug Administration) (ARAUZ et al., 2009), que produzem ácido lático como maior ou único produto de fermentação. Este microrganismos compreendem um grande número de espécies envolvidas na fermentação de produtos lácteos pertencentes principalmente aos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* e *Streptococcus* (PANESAR et al., 2007), além de ser capazes de fermentar açúcares por vias diferentes, produzindo vários compostos antimicrobianos como bacteriocinas, biosurfactantes, ácidos orgânicos, peróxido de carbono e de hidrogênio, que previnem o crescimento de potenciais patógenos (CERESA et al., 2015; SHARMA; SAHARAN; KAPIL, 2016).

As BAL são microrganismos extremamente exigentes no que diz respeito à composição nutricional do meio de cultivo. Para o seu crescimento, essas bactérias necessitam de um meio de cultura rico em aminoácidos, peptídeos e vitaminas (ARAUZ et al., 2008). Os meios de cultivo comerciais utilizados em escala laboratorial (MRS – Man, Rogosa & Sharpe e M17), possuem custo elevado, tornando-os inviáveis para a produção em larga escala. Além disso, estes meios geralmente contêm excesso de proteínas (triptona, peptona, extrato de carne e extrato de levedura), de maneira que grande parte não é consumida, envolvendo custos supérfluos e dificultando processos de purificação (VÁSQUEZ; MURADO, 2008).

É importante frisar que embora o ácido lático seja o principal metabólito gerado pelas BAL, ao mesmo tempo outras biomoléculas são produzidas, tais como peptídeos denominados bacteriocinas (ARAUZ et al., 2009).

As bacteriocinas produzidas por bactérias lácticas são proteínas ou complexos de proteínas com atividade antimicrobiana e potencial terapêutico inclusive como anticancerígeno (MORENO et al, 2000; PARADA et al., 2007). Sua importância econômica na preservação de alimentos tem aumentado a exploração das bacteriocinas como conservantes de alimentos (ROSA; FRANCO, 2002).

Atualmente, a bacteriocina mais estudada e explorada industrialmente é a nisina, a qual é produzida por algumas cepas de *Lactococcus lactis*, classificada com lantibiótico de 34 aminoácidos e peso molecular de 3,5 kDa (ARAUZ et al., 2009). A nisina é capaz de inibir patógenos e contaminantes e é a única bacteriocina legalizada internacionalmente para utilização como bioconservante natural de alimentos, uma vez que sua ingestão não apresenta efeitos tóxicos para o organismo humano, não altera a ecologia do trato gastrointestinal e, por

isso, não apresenta os mesmos riscos relacionados ao uso de antibióticos (ROSA; FRANCO, 2002; YONEYAMA; KATSUMATA, 2006).

Vários estudos têm reportado as bactérias ácido-láticas como produtoras de biossurfactante além de bacteriocinas e seu potencial para utilização em processos alimentícios e na saúde pública (RODRIGUES et al. 2006a; 2006b; GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2011; RODRÍGUEZ-PAZO et al. 2013; SHARMA et al. 2014). Trabalhos recentes descrevem a habilidade de diferentes BAL probióticas de produzir biossurfactantes extracelulares, intracelulares ou adsorvidos em sua membrana plasmática (GALABOVA et al., 2014; RODRIGUES; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2006; PORTILLA-RIVERA et al. 2008; RODRÍGUEZ et al., 2010a), entre as quais uma das mais conhecidas é justamente *Lc. lactis* (MACHADO et al., 2013).

Apesar do imenso potencial dos biossurfactantes de bactérias ácido-láticas tanto na área da saúde como na área de alimentos, sua aplicação ainda permanece inadequada em razão do seu alto custo de produção e a falta de evidências mais concretas quanto aos seus detalhes estruturais (SHARMA; SAHARAN; KAPIL, 2016).

Vários fatores podem afetar a produção e composição do biossurfactante, inclusive as condições de cultivo como pH, temperatura, concentração de oxigênio dissolvido e o grau de aeração, devido a alterações que estes parâmetros causam no crescimento celular (DESAI; BANAT, 1997; CHEN; JUANG; WEI, 2015). Segundo Mulligan et al. (2014) em alguns casos, a produção de biossurfactante pode ser regulada pelo pH e temperatura de cultivo.

1.3. Produção de Biossurfactantes

1.3.1. Vias metabólicas para a produção de biossurfactantes

Dependendo da natureza da fonte de carbono existente no meio de cultura, a síntese de biossurfactante pode ser direcionada para uma das diversas vias metabólicas envolvidas neste processo (SANTOS et al., 2016). Satpute et al. (2010b) descreveram quatro vias potenciais para a produção de biossurfactante (Figura 1.3). Maier (2003) já haviam reportado que complexas vias metabólicas estão envolvidas na produção de biossurfactante.

Figura 1.3. Potenciais vias biossintéticas para a produção de biossurfactante (BS).
 FONTE: Satpute et al., 2010b.

Conforme Satpute et al. (2010b) sabe-se que a maquinaria regulatória da produção de biossurfactante é diferente para cada microrganismo produtor, mas ainda não se entende porque os microrganismos produzem biossurfactante. De acordo com a pesquisa destes autores, algumas possíveis justificativas encontradas na literatura compreendem a sobrevivência na presença de substratos hidrofóbicos e dessorção destes substratos, permitindo o contato direto com células, e aumentando assim a biodisponibilidade de substratos insolúveis. Em 2008, Das, Mukherjee e Sen reportaram que a regulação da produção de certos biossurfactantes ocorre por meio do mecanismo de *quorum sensing*, processo de regulação de genes que permite que as células bacterianas expressem genes específicos ao atingir uma alta densidade celular. Confirmando esta posição, evidenciou-se que moléculas sinalizadoras de baixo peso molecular (como Furanosil burato diéster Al-2) estão envolvidas na produção de biossurfactante por diferentes microrganismos (DANIELS VANDERLEYDEN; MICHIELS, 2004).

Dentre os biossurfactantes descritos até o momento, apenas foram descritos a regulação biossintética molecular da surfactina, produzida por *Bacillus subtilis* e do rhamnolipídeo, do tipo glicolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* (DAS, MUKHERJEE, SEN, 2008).

Satpute et al. (2010) constataram que mais de 70% das pesquisas envolvendo biossurfactantes é referente a *Bacillus* spp.

A surfactina, conhecida por sua potente ação como biossurfactante, consiste em um heptapeptídeo ligado à uma cadeia de ácidos graxos, caracterizada como lipopeptídeo. Esta é biossintetizada por um complexo extenso de multienzimas peptídeo sintetases, sendo catalisada de forma não-ribossomal (DAS, MUKHERJEE, SEN, 2008).

Já a produção de rhamnolipídeo é regulada pelo sistema *quorum sensing rhl* da *P. aeruginosa* (DAS, MUKHERJEE, SEN, 2008). Em 1963, Burger, Glaser e Burton já haviam proposto que a síntese deste biossurfactante resulta de duas reações transferência de grupos glicosil sequenciais, cada uma catalisada por uma rhamnosiltransferase diferente.

Conforme Satpute et al. (2010), a compreensão dos mecanismos genéticos envolvidos na produção de biossurfactante formará a base para melhorar as condições de manipulação e otimização resultando em produção mais rápida e eficiente destes compostos, contribuindo na obtenção econômica do biossurfactante.

1.3.2. Estratégias para redução de custos

Apesar das várias propriedades atrativas e das numerosas vantagens comparadas aos surfactantes químicos, como maior biodegradabilidade, baixa toxicidade, maior compatibilidade com o meio ambiente, e estabilidade mesmo sob condições extremas de temperatura, pH e salinidade (CAMEOTRA et al., 2010; CHEN; JUANG; WEI, 2015), a produção de biossurfactante em escala industrial não tem sido realizada devido aos elevados custo de investimento (MAKKAR; CAMEOTRA, 2002; RAHMAN; GAKPE, 2008), não sendo capaz de competir economicamente com os sintéticos (JOSHI; DESAI, 2010). Em 2015, tanto Hausmann e Sydatk, quanto Chen, Juang e Wei, reafirmaram que o alto custo de produção dos biossurfactantes tem impedido o seu desenvolvimento em nível industrial, e em 2010, Joshi e Desai revelaram que sua produção é pelo menos 50 vezes mais cara, dependendo do tipo de biossurfactante e de sua pureza.

Embora os biossurfactantes tenham que competir com os surfactantes químicos em termos de custo, eles ainda podem ser utilizados em alguns produtos de preço mais elevado, como é o caso de cosméticos e medicamentos (CHEN; JUANG; WEI, 2015). O custo competitivo tem sido o ponto chave da produção de biossurfactante, contudo as empresas que comercializam biossurfactante se asseguram de suas propriedades favoráveis ao meio ambiente

e de sua especificidade de ação, como forma de manter o valor de mercado (RANDHAWA, 2015). A comercialização ainda é limitada a alguns biossurfactantes, tais como surfactina (SOBERÓN-CHAVEZ; MAIER, 2011), soforolipídeos, rhamnolipídeos e lipídeos manosileritirol (HAUSMANN; SYDALTK, 2015).

Como forma de contornar esta situação, a concentração de esforços, na última década, está focada na minimização dos custos de produção a fim de ampliar seu uso comercial (LEE; KIM, 2015). Saharan, Sahu e Sharma (2011) relataram que existem duas estratégias básicas para superar os custos excessivos da produção de biossurfactante que têm sido aplicadas em todo o mundo para tornar o processo mais rentável. A primeira consiste na redução do custo inicial com matérias-primas, através do uso de substratos de baixo custo e resíduos como meios fermentativos; a outra estratégia está voltada para o desenvolvimento de bioprocessos eficientes e otimizados quanto às condições de cultivo e nos processos de recuperação mais econômicos, maximizando a produção e recuperação do biossurfactante.

Makkar e Cameotra (2002) já haviam descrito que a produção de biossurfactantes, através de substratos alternativos de baixo custo e seu potencial industrial, estava sendo revista. Randhawa (2015), ratificou que os biossurfactantes podem ser produzidos facilmente a partir de resíduos agroindustriais de baixo custo como substrato. A escolha por matérias-primas de baixo custo é importante para a economia geral do processo, já que são responsáveis por 50% do custo final do produto, além de reduzir gastos com o tratamento de resíduos (JOSHI; DESAI, 2010).

1.3.3. Substratos alternativos: Resíduos industriais

Estratégias tecnológicas preliminares para a produção econômica de metabólitos microbianos devem ser elaboradas, primeiramente, de forma a avaliar qual microrganismo ideal para obtenção do produto desejado, e a partir de então determinar qual o substrato e balanço nutricional adequados com o uso de resíduos mais baratos para reduzir o custo inicial com as matérias-primas envolvidas no processo (MUKHERJEE et al. 2008; LEE; KIM, 2015). Utilizando matérias-primas mais baratas ou de resíduos agroindustriais renováveis como substrato, pode-se diminuir os custos e tornar sua produção mais competitiva com a síntese química dos surfactantes (MOLDES, 2014; THAVASI; MARCHANT; BANAT, 2014).

Quadro 1.2. Lista de diferentes matérias-primas de baixo custo utilizadas na produção de biossurfactante por diversos microrganismos

Resíduos de baixo custo	Microrganismo produtor	Tipo de Biossurfactante
Óleo de fritura residual	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 47T2 4	Rhaminolípídeo
Resíduos de óleo de refinaria	Levedura	Glicolípídeo
Melaço	<i>Bacillus</i> spp.	Lipopeptídeo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> GS3	Rhaminolípídeo
Resíduos ricos em amido	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 21332	Lipopeptídeos
Soro de leite	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> BS2	Rhaminolípídeo
	<i>Bacillus</i> spp.	Lipopeptídeos

Fonte: Joshi; Desai, 2010

O Quadro 1.2 demonstra alguns dos diferentes resíduos agroindustriais que já foram utilizados para a produção de biossurfactante. Como pode ser observado, diferentes fontes renováveis e resíduos agroindustriais contendo grande quantidade de carboidratos, podem ser utilizadas como fontes ricas de carbono e nitrogênio para o crescimento microbiano e obtenção de biomoléculas de interesse, além de contribuir na redução do impacto ambiental causado por estes resíduos (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011; MOLDES, 2014; THAVASI; MARCHANT; BANAT, 2014). Os itens a seguir descrevem mais detalhadamente o uso de alguns destes resíduos para a produção de biossurfactante.

1.3.3.1.Melaço

Melaço, um coproduto do processamento da cana-de-açúcar obtido na etapa final do processo de cristalização do açúcar, é amplamente utilizado como substrato devido ao seu baixo custo comparado com outras fontes de açúcar e a presença de vários outros compostos e vitaminas que são importantes para a fermentação. Com seu alto teor de açúcar, geralmente de 48 a 56% do açúcar total (principalmente sucrose), o melaço é um bom substrato para a produção de biossurfactante evidenciado por vários estudos ao longo de duas décadas (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011; SANTOS et al., 2016).

Reis et al. (2004) investigaram a produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* ATCC 6633 utilizando açúcar comercial, caldo de cana e melaço, vinhaça, glicerol, manitol e óleo de soja. Encontrando baixa tensão superficial e elevado índice de emulsificação, indicando

a viabilidade da produção de biossurfactantes a partir de fontes de carbono renováveis e de baixo custo. Seguindo o mesmo pensamento, quatro cepas produtoras de biossurfactante, *Bacillus licheniformis* K51, *B. subtilis* 20B, *B. subtilis* R1 e estirpe de *Bacillus* HS3, foram cultivadas a partir de diluições de melaço. A maior produção de biossurfactante foi observada com 5-7% (w/v) de diluição, atingindo 35-37 mN/m com a cepa de *Bacillus subtilis* R1, extraída da fermentação de arroz (JOSHI et al., 2008).

A produção de rhamolipídeos a partir de melaço por oito cepas de *Pseudomonas* sp. revelou que 5% de concentração de melaço é suficiente para obter produção máxima deste biossurfactante em 12h de cultivo (ONBASLI; ASLIM, 2009).

Ao avaliar o uso de melaço como substrato para a produção de biossurfactante por quinze cepas conhecidas como produtoras do biotensoativo, Takahashi et al. (2011) relataram que apenas a *Starmerella bombicola* NBRC 10243 produziu soforolipídeos, que são biossurfactantes na forma de lipídeos. Os autores demonstraram que houve produção de 1,6 vezes maior no cultivo em biorreator (22,8 g/L) do que em shaker (14,4 g/L), ambos após 120h de cultivo.

Quanto às cepas probióticas, *Lactococcus lactis* 53 e *Streptococcus thermophilus* A, foram utilizadas para a produção de biossurfactante tanto em meio sintético quanto com melaço como meio alternativo e econômico. Os resultados revelaram aumento de 1,2-1,5 vezes maiores em massa de biossurfactante produzido por grama de peso seco celular ao utilizar melaço, com redução de 60-80% dos custos da preparação do meio de cultivo (RODRIGUES; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2006).

1.3.3.2. Óleos de Fritura

Óleos de fritura são produzidos em larga escala tanto nas indústrias como no ambiente doméstico, e podem atuar efetivamente como um substrato de baixo custo para a produção de biossurfactante, uma vez que são excelentes fonte de carbono (SAHARAN; SAHU; SHARMA, 2011; SANTOS et al., 2016). Os óleos vegetais são constituídos por lipídeos, geralmente compreendendo ácidos graxos saturados e insaturados, com cadeias entre 16 e 18 átomos de carbono (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). Na literatura, diversos tipos de óleos de refinarias e da indústria alimentícia têm sido avaliados para a produção de biossurfactante. Conforme Saharan, Sahu e Sharma (2011) relataram o uso de óleos industriais como sebo, banha, óleos marinhos, e ácidos graxos livres para este fim.

Lima et al. (2009) demonstraram que *Pseudomonas aeruginosa* PACL foi capaz de produzir biossurfactante utilizando resíduos da produção do óleo de soja em fermentação submersa. O uso de resíduos da fabricação do óleo de oliva e de óleos de fritura obtidos do girassol, também promoveram a produção de rhamnolipídeos por *P. aeruginosa* 47 T2, em cerca de 8,1 mg/mL (ZHANG et al., 2009).

1.3.3.3. Compostos lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos são resíduos com compostos orgânicos mais abundantes da Terra e, do ponto de vista econômico, podem ser empregados para a produção biomoléculas de interesse, como os biossurfactantes, entre outros compostos (KUKHAR, 2009). O uso do material lignocelulósico para a produção de mais de um composto por um mesmo microrganismo é uma estratégia que torna o biossurfactante mais econômico e viável no mercado, além de reduzir a queima destes resíduos no meio ambiente.

O bagaço de uva, que consiste em um complexo material lignocelulósico, é um subproduto abundante da indústria vinícola obtido depois do esmagamento das uvas de durante o processo da produção do vinho. Parte deste bagaço é usualmente destilado em adegas para recuperar etanol para ser utilizado na produção de licores. Entretanto, uma grande quantidade do bagaço de uva permanece sem uso, e devido à enorme quantidade de hemiceluloses e ácidos orgânicos este pode ser utilizado para a produção de biomoléculas de interesse como ácido láctico e biossurfactantes (MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011). Portilla-Rivera et al. (2008), ao utilizarem os açúcares contidos em licores obtidos de hidrolisados de bagaço de uva para a produção de biossurfactantes e ácido láctico por *L. pentosus*, reportaram rendimento de 4,8 mg/L de biossurfactante intracelular, equivalente a 0,60 mg de biossurfactante intracelular por grama de açúcar.

Rodríguez-Pazo et al. (2013), avaliaram a utilização de co-culturas, *Lactobacillus plantarum* e *L. pentosus* para a produção de biossurfactante, ácido láctico e ácido polilático (PLA) a partir de cortes de ramos de videira, processado termicamente com ácido sulfúrico diluído a fim de separar os açúcares hemicelulósicos fermentáveis da parte sólida rica em celulose e lignina. Os resultados evidenciaram maior produção dos compostos após 144h de fermentação, com redução da tensão superficial em 17,2 Unidades.

O uso de vinhaça como fonte de carbono para a produção de biossurfactante sintetizado por *Bacillus pumilus* foi verificado por Oliveira e Garcia-Cruz em 2013. A vinhaça é um

subproduto subvalorizado obtido após a destilação das borras da vinificação da indústria vinícola. O uso deste resíduo proporcionou redução da tensão superficial em 27,8 mN/m, com 27,7g/L com 5% de vinhaça.

Rodríguez et al. (2010b) avaliaram o potencial do *Lactococcus lactis* CECT-4434 como produtor de ácido láctico e biossurfactante, utilizando os dois compostos lignocelulósicos descritos pelos outros autores descritos acima, isto é, ramos de videira como fonte de carbono e vinhaça da fabricação do vinho, como fonte de nitrogênio e fósforo. A partir da fração hemicelulósica, os autores obtiveram 14,3 g/L de ácido láctico e 1,7 mg/L de biossurfactante após 74h de fermentação, com redução da tensão superficial em 14,4 mN/m, enquanto a vinhaça promoveu a redução em 12,1 unidades em 72h de cultivo.

1.3.3.4. Soro de Leite

A indústria de laticínios produz uma quantidade considerável de subprodutos, tais como leite de manteiga, soro de leite, e seus derivados. Conforme Janczukowicz et al. (2008), os efluentes gerados pelas indústrias de laticínios podem ser tratados em conjunto, exceto o soro de leite que, segundo os autores, contém componentes complexos.

A fabricação de queijo é responsável por gerar dois tipos de resíduos: soro de leite e águas residuais de lavagem, resultante das operações de refrigeração e limpeza de tanques, tubos e outros equipamentos que contêm diferentes frações de soro de leite (CARVALHO et al., 2013), sendo sua produção estimada em 180 a 190 milhões de toneladas por ano a nível mundial (MOLLEA et al. 2013).

Segundo Carvalho et al., (2013), para cada kg de queijo produzido, são necessários 10 kg de leite, gerando, portanto, 9 kg de soro de leite. Este subproduto da indústria de laticínios possui uma carga orgânica relativamente alta, de DBO (Demanda bioquímica de oxigênio) e DQO (Demanda química de oxigênio) (YADAV et al., 2015) em uma faixa de 27–60 g/L e 50–102 g/L, respectivamente, causando um excesso de consumo de oxigênio do ambiente (CARVALHO et al., 2013; PRAZERES et al., 2012).

Para contornar os problemas gerados pelo despejo inadequado do soro de leite, uma série de tecnologias tem surgido com forma de reutilizá-lo convertendo-o em produtos de valor agregado. Estes avanços tecnológicos têm aumentado a utilização do soro de leite em 50% do total produzido, transformando-o em produtos como soro de leite em pó, proteína de soro, biopolímeros e bioetanol entre outros (YADAV et al., 2015), contudo os outros 50% são

considerados como resíduo poluente (JOSHI et al., 2008; MAKKAR; CAMEOTRA; BANAT, 2011).

O cultivo de microrganismos em soro de leite, como substrato fermentativo, tem sido proposto com alternativa para a redução do problema de eliminação desse resíduo, uma vez que se pode reduzir em 90-95% sua DBO, e resultar na produção de biomoléculas de alto valor agregado (RODRIGUES; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2006; PRAZERES et al., 2012).

O soro de leite pode ser considerado como deficiente em componentes de nitrogênio para processos biológicos, com taxas de carbono/nitrogênio e fósforo (C/N/P) $\approx 200/3,5/1$ (PRAZERES et al., 2012). Entretanto, a concentração de carbono presente é favorável para processos fermentativos utilizando microrganismos que consomem a lactose, presente em maior quantidade, como fonte de carbono. Prazeres et al. (2012) descreveram o soro de leite, como um efluente rico em nutrientes, contendo cerca de 4,5-6,0% de lactose, 0,6-1,1% de proteínas solúveis, 0,8-1,0% de minerais, 0,05-0,9% de ácido lático e 0,06-0,5% de gorduras. Cada kg de soro de leite desidratado contém cerca de 50 g de lactose, com alto valor nutricional e funcional (MOLLEA et al., 2013).

Na procura por meios fermentativos alternativos para a produção de biossurfactante a partir de *Lactococcus lactis* 53 e *Streptococcus thermophilus*, Rodrigues et al. (2006a) utilizaram soro de leite proveniente da produção de queijo. Eles obtiveram aumento de 1,2-1,5 vezes na massa de biossurfactante produzido por grama de peso seco, com 75% de redução dos custos, demonstrando que a suplementação do soro de leite com extrato de levedura e peptona, e melaço ao meio de cultura pode ser utilizado como alternativa econômica e relativamente barata que o meio sintético para produção de biossurfactante por estas bactérias probióticas.

Dubey e Juwakar (2004) cultivaram *Pseudomonas aeruginosa* BS2 em soro de leite para a produção de biossurfactantes. Em 48h de incubação, o rendimento de biossurfactante obtido foi de 0,92 g/L. Após recuperar o biossurfactante do resíduo fermentado, as concentrações de DQO, ácidos totais, nitrogênio e fosfato presentes no soro de leite foram significativamente reduzidos a 87, 90, 92 e 92% respectivamente.

A demanda por produtos derivados do leite tem aumentado, o que acresce a geração de soro de leite, representando um sério problema quanto à gestão e controle do mesmo (YADAV et al., 2015). É notável que o soro de leite não pode ser diretamente descartado no meio ambiente sem um tratamento adequado.

A grande quantidade de nutrientes encontrados no soro de leite demonstra o elevado potencial do mesmo como substrato econômico em processos biotecnológicos a fim de obter

biomoléculas de alto valor agregado evitando assim seu desperdício, e gerando lucros a partir de um resíduo que seria descartado, causando uma série de prejuízos ao meio ambiente.

1.3.3.5. Vinhaça de uva

A fabricação do vinho é uma das atividades agrícolas mais importantes, atingindo aproximadamente 270 Mhl (duzentos e setenta milhões de hectolitros) produzidos em 2014 (OIV, 2015). A quantidade de resíduos gerados na indústria vinícola é enorme, tornando-se necessária a elevação das taxas com a eliminação e multas para os despejos não autorizados (de 30 a 40 mil euros), com possível pena de prisão (DEVESA-REY et al., 2011).

De acordo com o regulamento EC 1493/1999 do Conselho Europeu, o bagaço de uva e a borra de vinho devem ser destinados às destilarias de álcool, gerando o esgotamento do bagaço de uva e um resíduo líquido, denominado vinhaça (BUSTAMANTE et al., 2008). Conforme os dados da União Brasileira de Vitivinicultura (UVIBRA), em 2010, a produção anual de vinho no Rio Grande do Sul foi superior a 195 milhões de litros, gerando cerca de 64 mil litros de vinhaça líquida.

A vinhaça é o principal resíduo líquido proveniente do processo de destilação, sendo um efluente ácido rico em carboidratos, compostos orgânicos, fenóis e compostos insaturados com alta DBO e DQO (SALGADO et al., 2010). Conforme os autores referidos, estes resíduos possuem uma quantidade razoável de nitrogênio, potássio e fósforo, alta concentração de compostos orgânicos dissolvidos e materiais celulósicos e lignocelulósicos. Bustamante et al. (2008), descreveram que os resíduos da indústria vinícola apresentam baixo pH (valores variam entre 3,8 a 6,8) e alto teor de matéria orgânica (669 a 920 g/kg).

Vários estudos têm sido realizados a fim de reduzir a DBO e DQO da vinhaça, todavia os tratamentos químicos e físicos não têm surtido efeito até o momento. A alta concentração de matéria orgânica deste resíduo o torna suscetível ao tratamento biológico, como microrganismos aeróbios, provendo benefícios adicionais através de seu uso como substrato de baixo custo em processos fermentativos biotecnológicos (SALGADO et al., 2010).

Assim como no caso do soro de leite, algumas alternativas tecnológicas têm sido propostas a fim de diminuir os prejuízos ao meio ambiente e valorizar os resíduos da indústria vinícola. Vários trabalhos na literatura vêm utilizando-os para produção de xilitol, etanol, ácido láctico, biossurfactante entre outros compostos por meio de processos fermentativos.

Bustos et al. (2004) evidenciaram que há diferenças de nutrientes entre os resíduos de vinho branco e vinho tinto. A concentração de C e N com valores referentes a quantidades obtidas após a destilação no vinho tinto (C = 117 mg; N = 12 mg por g de matéria seca) é maior se comparado ao vinho branco (C = 64 mg; N = 4 mg por g de matéria seca). Salgado et al. (2010) também evidenciaram a alta concentração de carbono, de 60,1 a 102,8 mg/g e nitrogênio de 3,1 a 22,1 mg/g na vinhaça contendo partes líquidas e sólidas.

As uvas e vinhos ricos em compostos nitrogenados, em formas inorgânicas e orgânicas, também são fonte de vitaminas para os microrganismos, como no caso das biotinas e niacinas presentes em níveis adequados, e capazes de preencher os requisitos vitamínicos necessários para o crescimento de bactérias ácido-láticas (DEVESA-REY et al., 2011).

As uvas acumulam açúcares (cerca de 15 a 25%) durante seu desenvolvimento na videira, no período de maturação as moléculas de sacarose, produzidas na fotossíntese, são hidrolisadas pela enzima invertase em glicose e frutose. Entretanto além da glicose e frutose (seis carbonos), ainda estão presentes açúcares com três, quatro, cinco e sete carbonos na uva (ROBINSON; HARDING, 2015).

Dentre os açúcares presentes no vinho, os polissacarídeos são os mais extensivamente estudados devido a sua importância tecnológica quanto às propriedades sensoriais do vinho (BORDIGA et al., 2012). Contudo, outros açúcares na forma de oligossacarídeos merecem atenção. Estes carboidratos são estritamente definidos como não-digeríveis, com estruturas químicas formadas por três e seis monossacarídeos covalentemente ligados através de ligações glicosídicas (BOEHM; STAHL, 2003). Os monossacarídeos glicose (49,7%), xilose (15,4%) e arabinose (9,6%), são os constituintes predominantes dos oligossacarídeos encontrados no vinho, seguidos por galactose (7,4%), manose (6,2%), ramnose (2,2%) e fucose (1,2%) encontrados em menor quantidade (BORDIGA et al., 2012). Durante o processo de fermentação, os açúcares presentes na uva são hidrolisados e convertidos pelas leveduras em etanol e dióxido de carbono. Mas nem todos os açúcares são fermentáveis, tais como os açúcares de cinco carbonos arabinose, ramnose e xilose, que continuam presentes no vinho mesmo após a fermentação (ROBINSON; HARDING, 2015). Conforme Sanchez et al. (2010) descreveram, a *Saccharomyces cerevisiae*, microrganismo mais utilizado para a produção de etanol, não é capaz de fermentar naturalmente pentoses.

Pérez-Bibbins et al. (2015) definiram a vinhaça como potencial suplemento nutricional para processos fermentativos industriais por seu conteúdo repleto de compostos interessantes para tal finalidade. Para os referidos autores, as tecnologias de fermentação de processos biotecnológicos devem ser competitivas com os da síntese de compostos químicos para levar

adiante a produção em escala industrial. Para Devesa-Rey et al. (2011) o uso de resíduos da indústria vinícola para a produção de biossurfactante e ácido láctico é uma forma promissora de reduzir o custo total com o processo biotecnológico, sendo também uma maneira ecologicamente favorável à remoção destes compostos que podem causar danos ao meio ambiente.

A produção de biossurfactante por *L. pentosus* a partir de resíduos de vinificação, neste caso por bagaço de uva hidrolisado, foi evidenciada por Portilla-Rivera et al. (2008), revelando alta capacidade de estabilizar emulsões entre querosene/água se comparado com surfactante químico (SDS) ou biossurfactante comercial (surfactina). A produção de biossurfactante e ácido láctico por *L. pentosus* a partir de 20g/L de vinhaça da produção do vinho branco também foi abordado por Bustos et al. (2007), onde obtiveram 21,8 g/L de ácido láctico, com redução da tensão superficial em 23,5 mN/m. Utilizando *Lactococcus lactis* CECT-4434 como produtor de biossurfactante, Rodríguez et al. (2010a) também utilizaram vinhaça de uva e verificaram redução da tensão superficial em 12,1mN/m.

É importante salientar que o rendimento financeiro e as suas propriedades de alto valor agregado, serão os fatores a serem considerados quanto à utilização de materiais renováveis para a produção de biossurfactantes. Outro fator importante para a rentabilidade do processo seria obter outras biomoléculas de alto valor agregado, além do biossurfactante, contribuindo assim, para obtenção de mais de um produto em um mesmo processo fermentativo.

1.3.4. Efeito da oxigenação sobre a produção de biossurfactante

Fatores como agitação e oxigênio dissolvido podem afetar a produção de biossurfactante, devido a alterações que estes parâmetros causam no crescimento ou atividade celular dos microrganismos (CAMEOTRA et al., 2010; CHEN; JUANG; WEI, 2015). Ghribi et al. (2009) reportaram que o controle de oxigênio dissolvido é necessário para a assimilação da fonte de carbono pelos microrganismos, afetando, consequentemente, a síntese de metabólitos.

Dependendo dos microrganismos produtores, os parâmetros ambientais e físicos podem afetar os padrões de produção do biossurfactante (JOSHI et al., 2013). Para Sheppard e Cooper (1990), a transferência de oxigênio é um dos parâmetros chave para o processo de otimização e *scale up* da produção de biossurfactante de *Bacillus subtilis*. Confirmando esta posição, Davis, Lynch e Varley (2001) observaram que o fornecimento de oxigênio dissolvido em um nível

suficiente promoveu maior produção de lipopeptídeos por *B. subtilis*. Porém, este fornecimento de oxigênio é comumente dirigido a bactérias aeróbias, que necessitam de uma quantidade considerável de oxigênio para que seu crescimento não seja comprometido e haja diminuição da produção de biossurfactante.

Mesmo após 20 anos, a maioria das pesquisas sobre bactérias produtoras de biossurfactante e os efeitos do oxigênio sobre estas são baseados em condições aeróbias (DESAI AND BANAT 1997; DOMINGUES et al., 2017; DUWAT et al., 2001; SATPUTE et al. 2010a). No entanto, poucos estudos têm sido conduzidos sob condições anaeróbias e microaeróbias, e poucas bactérias têm sido identificadas como produtoras de biossurfactante sob condições limitantes de oxigênio (DOMINGUES et al., 2017; DUWAT et al., 2001).

Conforme Domingues et al. (2017) um ambiente é classificado como aeróbio quando a concentração de oxigênio for superior a 30% de saturação de oxigênio em um meio aquoso, enquanto o microaeróbio corresponde de 1 a 30% e o anaeróbio a total ausência deste. Sendo assim, os microrganismos são categorizados como: a) obrigatoriamente aréobicos, que necessitam de oxigênio para seu crescimento; b) anaeróbios facultativos, podem atuar por vias fermentativas ou utilizar oxigênio como receptor de elétrons terminal; c) microaeróbios, que podem utilizar oxigênio apenas em concentrações abaixo da encontrada normalmente atmosfera e em soluções; d) anaeróbios aerotolerantes, não utilizam o oxigênio como receptor de elétron terminal, mas são tolerantes à sua presença; e) estritamente ou obrigatoriamente aeróbios, não apenas por não utilizar oxigênio, mas inclusive por serem inibidos ou o mesmo ser letal para estes (DOMINGUES et al. 2017; MADIGAN et al. 2014).

O oxigênio é um fator determinante tanto para a sobrevivência quanto para a letalidade de microrganismos (Duwat et al., 2001). Segundo estes autores, para a bactéria anaeróbia facultativa *Lactococcus lactis*, o oxigênio exerce efeito negativo sobre seu crescimento e a aeração prolongada pode levar à morte celular e degradação do DNA, além de provocar mudanças drásticas no metabolismo de carbonos (FELIPE; HUGENHOLTZ, 2001).

Segundo Gudiña, Teixeira e Oliveira (2011), bactérias ácido-láticas não possuem cadeia respiratória ou o ciclo de ácido cítrico, entretanto, estas bactérias conseguem crescer na presença de oxigênio devido à atividade de enzimas que metabolizam oxigênio, como as superóxido-dismutases e NADH oxidases ou peroxidases.

Sendo as bactérias ácido-láticas anaeróbias facultativas e de fermentação microaerofílica (DUWAT et al., 2000), torna-se necessário o controle da concentração de oxigênio dissolvido no meio de cultivo em uma porcentagem que evite o baixo crescimento e a produção ineficiente de biossurfactante.

1.4. Propriedades dos biossurfactantes

1.4.1. Estabilidade sob pH e temperaturas extremos

Uma das propriedades únicas dos biossurfactantes refere-se à sua estabilidade mesmo sob condições extremas de temperatura, pH e salinidade (CAMEOTRA et al., 2010; CHEN; JUANG; WEI, 2015). Esta característica permite inúmeras aplicações industriais e ambientais (DHANARAJAN; SEN, 2014). Conforme Gudiña et al. (2013), microemulsões de biossurfactante que demonstrem estabilidade em temperaturas acima de 40°C, os torna adequados para aplicações cosméticas e farmacêuticas.

A surfactina, um dos biossurfactantes mais potentes que se tem conhecimento, produzida por *Bacillus subtilis*, mostrou eficiente redução da tensão superficial mesmo sob 125°C de temperatura, também permanecendo estável com variação de pH entre 5-12 (BEZZA; CHIRWA, 2015). Similarmente, o rhamnolipídeo outro biossurfactante muito estudado, se revelou estável na mesma variação de pH que o *B. subtilis* (5-12) suportando temperaturas até 120°C (XIA et al., 2011).

Biossurfactantes do tipo soforolipídeos produzidos por *Candida bombicola* permaneceram estáveis após 2h de incubação em pH de 2 a 10 e com até 20% de NaCl (DAVEREY; PAKSHIRAJAN, 2010). Já o biossurfactante do tipo lipopeptídeo produzido por *Streptomyces* sp. se manteve estável apenas em meio alcalino, com pH entre 8-12, e suportou temperaturas de 30 a 100°C (KHOPADE et al., 2012), entretanto, Manivasagan et al. (2014) estudaram outra cepa de *Streptomyces* sp. que produziram biossurfactante do tipo glicolipídeo, que demonstrou estabilidade com temperaturas de 30 a 50°C e pH de 5 a 9, estando mais próximo do neutro.

Estes estudos evidenciam que dependendo do tipo de biossurfactante seu comportamento varia, permanecendo mais estável em valores de pH alcalinos ou ácidos, e sofrendo ou não maior influência da temperatura sobre sua atividade em reduzir a tensão superficial.

1.4.2. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de diversos biossurfactante já foi evidenciada contra bactérias, fungos, leveduras algas e vírus (ARAÚJO, FREIRE, NITSCHKE, 2013). Dentre os biossurfactantes já descritos, o rhamnolipídeo e a surfactina são os mais relatados quanto à ação antimicrobiana (DAS, MUKHERJEE E SEN, 2008).

Abalos et al. (2001) observaram alta atividade antimicrobiana de rhamnolipídeos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10, sobre uma grande variedade de microrganismos incluindo fungos como *Aspergillus niger*, *Gliocadium virens*, *C. globosum*, *P. crysogenum* e *A. pullulans*, afetando também bactérias gram-negativas e gram-positivas.

Os soforolipídeos produzidos por *Candida bombicola* expressaram atividade antimicrobiana de contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumonie*, *P. aeruginosa* e *Streptococcus pneumonie*, com uma concentração de 128 a 512 µg/mL do biossurfactante (SLEIMAN et al., 2009).

Gomaa (2013) obteve ação antimicrobiana do lipopeptídeo produzido por *B. licheniformis* contra diversas cepas gram-positivas e negativas (exceto *L. monocytogenes* e *Klebsiela pneumoniae*, respectivamente) além de atividade contra a leveduras *Candida albicans*.

Os biossurfactantes produzidos por bactérias ácido-láticas também têm apresentado propriedades antimicrobianas. Saravanakumari e Mani (2010), demonstraram que o xilolipídeo produzido por *Lactococcus lactis* teve atividade sobre *E. coli* e *S. aureus*, que é resistente a múltiplos antibióticos, obtendo halos de inibição de 13,8 mm e 12,6 mm, respectivamente. Gomaa (2013b) também demonstram o biossurfactante produzido por diversas cepas de *Lactobacillus* apresentaram atividade antimicrobiana sobre diversos microrganismos, incluindo *Bacillus* sp., *S. aureus*, *Proteus vulgaris* e *Candida albicans*, sendo a maioria não efetivos contra *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Serratia marcencens* e *Salmonella typhi*.

O mecanismo de ação dos biossurfactantes como antimicrobianos ainda não está bem definido, porém, tem-se proposto a hipótese de que ele ocasiona perda da integridade da membrana (SHARMA; SAHARAN; KAPIL, 2016). Gomaa (2013a) observou aumento do tamanho da membrana e mudanças ultra-estruturais, quando biossurfactantes do tipo ácidos graxos foram inseridos na membrana celular. Outra hipótese é a capacidade do biossurfactante em formar poros e obstruir a membrana plasmática (INÈS; DHOUHA, 2015).

Bouffioux et al. (2007) relataram que a surfactina, do tipo lipopeptídeo, interfere nas funções biológicas das membranas que contém fosfolipídeos de cadeia curta de forma intensa,

modificando a permeabilidade da membrana devido à inserção de bicamadas lipídicas ou solubilizando a membrana, devido à sua ação detergente, por meio do carregamento de cátions mono ou divalentes.

Já os rhamnolipídeos tem ação direta sobre a estrutura superficial da célula bacteriana, diminuindo a proporção de lipopolissacarídeos e aumentando a hidrofobicidade da célula, provocando mudanças nas proteínas da membrana e consequentemente na morfologia da célula (SOTIROVA et al., 2009).

Quanto aos glicolipídeos, a ação destes foi observada utilizando soforolipídeos, verificando-se que os mesmos promovem desestabilização e alteração da permeabilidade da membrana celular (SEUNG-HAK et al., 2003).

1.4.3. Atividade Antiadesiva

Quando em contato com uma superfície, os microrganismos presentes em um fluido tendem a se aderir a ela, e esta adesão pode gerar o processo de multiplicação microbiana formando o chamado biofilme, que pode ser constituído de apenas uma população bacteriana, ou de múltiplas espécies (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013). Biofilmes são a causa de várias infecções bacterianas, uma vez que a adesão de microrganismos patogênicos é o ponto inicial para a maioria das doenças infecciosas (SHARON, 2006). Um exemplo é dado pela adesão e formação de biofilme por *Staphylococcus* spp. em cateteres e outros instrumentos médicos, sendo o causador de diversas infecções hospitalares (SÁNCHEZ; SÁNCHEZ; FLORES, 2013). Conforme Yasuhiko, Otoole e Ming (2005), acredita-se que a fribrose cística, placas dentárias, pneumonia e endocardite infecciosa sejam causadas por bactérias formadoras de biofilmes.

Na indústria alimentícia os biofilmes também representam sérios problemas de contaminação, que pode levar à deterioração dos alimentos e à transmissão de doenças (NITSCHKE; COSTA, 2007). Visto que uma única célula aderida pode formar um biofilme, a Resolução-RDC nº 12 da Anvisa (2001), determinou que a concentração de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp., deve ser zero, isto é, ausente nas amostras coletadas para análise de produtos alimentícios. Segundo Nitschke e Costa (2007), controlar a aderência de microrganismos a superfícies de contato com alimentos é um passo essencial para fornecer produtos seguros e de qualidade aos consumidores.

Gomaa (2013b) relatam que os biofilmes podem ser até 1.000 vezes mais resistentes aos antibióticos, que as mesmas bactérias em estado planctônico, isto é, aquelas que permanecem livres ou em suspensão. Araújo, Freire e Nitschke (2013) descreveram que a contaminação microbiana de materiais e a inibição ou diminuição da formação de biofilmes podem ser notavelmente reduzidos a partir do pré-condicionamento de superfícies com biossurfactante (Figura 1.4).

Figura 1.4. Efeito inibitório da formação de biofilmes através do condicionamento da superfície por biossurfactante. FONTE: Araújo, Freire e Nitschke (2013).

A atividade antiadesiva dos biossurfactantes tem sido amplamente estudada nos últimos anos devido à formação de biofilmes por bactérias patogênicas em superfícies do processamento industrial, principalmente do ramo alimentício (GOMAA, 2013b; GUDIÑA et al., 2010; MEYLHEUC et al., 2006; SHARMA; SAHARAN, 2016). O processo industrial pode oferecer matéria prima e condições de crescimento de certos microrganismos tanto na água circulante quando na forma de biofilmes sobre superfícies. A prevenção geralmente é feita por meio da sanitização, porém as técnicas utilizadas atualmente são menos efetivas sobre microrganismos em biofilme que os planctônicos (ARAUJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

As propriedades antiadesivas do rhamnolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa* foram observadas por Araujo Livia et al. (2011), identificando inibição da adesão de *Listeria monocytogenes* de 41 a 71% em superfícies de poliestireno, geralmente utilizadas para esta avaliação. O mesmo tipo de rhamnolipídeo foi capaz de eliminar e interromper a formação de biofilme de *Bordetella bronchiseptica*, um patógeno do trato respiratório de muitos mamíferos (YASUHIKO; OTOOLE; MING, 2005).

Biossurfactantes do tipo lipopeptídeo também foram analisados. Nitschke et al. (2009) observaram que a surfactina reduziu a formação de biofilme por *L. monocytogenes* e *Enterobacter sakazakii*, e Mireles, Toguchi e Harshey (2001) já haviam reportado que a mesma teve efeito sobre *Salmonella typhimurium*, *S. enterica*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*, prevenindo a formação de biofilme por estas bactérias em placas de PVC e cateteres vinílicos uretrais. Em 2009, Rivardo et al. relataram que o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* e *B. licheniformis* reduziram a formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* e *E. coli* em 90 e 97%, respectivamente, sendo que houve efeito oposto quanto ao produzido por *B. subtilis*, que inibiu mais a adesão de microrganismos gram-positivos, ao passo que o produzido por *B. licheniformis* afetou mais os microrganismos Gram-negativos.

Fungos e leveduras também têm demonstrado propriedades antiadesivas por parte de seus biossurfactantes. Rivardo et al. (2011) evidenciou que o biossurfactante polimérico produzido por *Candida lipolytica* UCP 0988 inibiu a adesão de *S. aureus* em 88%, e de *Lactobacillus casei* em 91%, com uma concentração de 0,75 mg/mL. Por outro lado, *Candida sphaerica* UCP 0995, que produz um biossurfactante conhecido como lunasan, necessitou de 10 mg/mL para ter efeito antiadesivo de 100% sobre *S. aureus*, *Candida albicans* e *Streptococcus agalactiae* (LUNA et al. 2011).

Biossurfactantes provenientes de BAL, também apresentam aplicações vantajosas como agentes antiadesivos para combater a colonização de microrganismos patogênicos (SHARMA; SAHARAN; KAPIL, 2016). Conforme os referidos autores, esta capacidade vem sendo extensivamente avaliada como uma abordagem potencial na redução da adesão de patógenos não apenas para aplicações biomédicas, mas também em outras áreas, como na indústria de processos alimentícios, uma vez que as BAL são microrganismos probióticos e em sua maioria reconhecidos como seguro (GRAS).

Avaliando a atividade antiadesiva de biossurfactantes produzidos por diversos *Lactobacillus*, Gomaa (2013b) obteve mínimo de 12% e máximo 60% de redução da adesão de *S. aureus*, porém não tiveram efeito sobre *E. coli* ou *Salmonella typhi*. Em outro estudo, utilizando os biossurfactantes produzidos por *Lactococcus lactis* 53 e *Streptococcus thermophilus* A em próteses vocais de silicone, Rodrigues et al. (2004) observaram decréscimo significativo do número de bactérias, com redução de aproximadamente de 96 e 87% em relação ao controle, respectivamente, nos biofilmes formados por *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *S. aureus* e *Rothia dentocariosa*.

Já o biossurfactante produzido por *Lactobacillus paracasei* foi menos eficiente, reduzindo em pouco mais de 70% a adesão de microrganismos como *S. aureus*, *S. epidermidis*

e *Streptococcus sanguis* 12, com 50 mg/mL de concentração e redução de apenas 11,8% contra *E. coli*. (GUDIÑA et al., 2010).

Quanto ao biossurfactante produzido por *Lactobacillus helveticus* MRTL91, tanto *E. coli*, quanto *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *L. innocua* e *Bacillus cereus* foram reduzidos em mais de 90% com apenas 25 mg/mL (SHARMA; SAHARAN, 2016), demonstrando sua alta efetividade. Meylheuc et al. (2006) também já haviam observado redução em mais de 90% sobre todas as 4 cepas de *L. monocytogenes* avaliadas, devido ao pré-condicionamento com biossurfactante produzido por *L. helveticus* 1181.

Estes resultados promissores dos trabalhos mencionados sugerem uma potencial aplicação dos biossurfactantes tanto com foco hospitalar e de saúde quanto em indústrias alimentícias, uma vez que os mesmos apresentam baixa toxicidade, maior compatibilidade com o meio ambiente, e estabilidade mesmo sob condições extremas de temperatura, pH e salinidade.

1.5. Aplicação industrial dos biossurfactantes

Os biossurfactantes possuem uma ampla gama de aplicações biotecnológicas, e poderiam substituir os surfactantes químicos nos mais diversos campos de atuação com aplicações na agricultura, limpeza industrial, biorremediação, nanotecnologia, lubrificantes, na biorremediação de locais contaminados por substâncias orgânicas e inorgânicas, além de variados usos em indústrias alimentícias e de bebidas, de metal e papel, cosméticos, têxteis, farmacêuticas e petroquímicas (ARAÚJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013; DESAI; BANAT, 1997; REIS et al., 2013; RODRIGUES et al., 2006c).

Devido ao biossurfactante poder ser utilizado para diversos processos de recuperação de resíduos oleosos inclusive de tanques de estoque, de seu potencial de despoluição em casos de derrames de petróleo como agente de biorremediação tanto em solo como água, o principal mercado dos biossurfactantes é a indústria do petróleo (SANTOS et al., 2016). As possíveis aplicações dos biossurfactante na indústria estão especificadas no Quadro 1.3.

Quadro 1.3. Aplicações dos biossurfactantes para uso industrial.

Indústria	Aplicação	Papel dos biossurfactantes
Meio Ambiente	Biorremediação; Limpeza de derramamento de óleo; Remediação e lavagem do solo	Emulsificação, dispersão e solubilização de óleos, redução da tensão interfacial, espalhamento, detergência, formação de espuma, lavagem do solo, inibição de corrosão em óleos de combustível e de equipamentos.
Petróleo	Aumento da recuperação de óleo; De-emulsificação	Os mesmos usos descritos acima, além de de-emulsificação de emulsões de óleo, redução de viscosidade e redução da tensão superficial de superfícies sólidas.
Mineração	Operações de limpeza de metais pesados; Remediação do solo; Flotação	Reduzir a tensão superficial e espumar, remoção de íons metálicos a partir de soluções aquosas, solos e sedimentos, sequestrantes de metais pesados, espalhamento, inibição de corrosão em óleos.
Alimentos	Emulsificação e de-emulsificação; Ingredientes funcionais	Solubilização de óleos aromatizados, controle de consistência, emulsão, redução da tensão superficial, espalhamento, detergência, espuma, espessante.
Farmacêutica	Microbiológica; Farmacêutica e terapêutica	Agentes antiadesivos, antifúngicos, antibacterianos e antivirais, uso em vacinas, terapia genética, moléculas imunomoduladoras.
Agricultura	Biocontrole; Fertilizantes	Redução da tensão superficial, dispersão, suspensão de pesticidas e fertilizantes em pó, emulsificação de soluções de pesticidas, facilitação de mecanismos de biocontrole de microrganismos, eliminação de patógenos de plantas e aumento da biodisponibilidade de nutrientes para microrganismos benéficos associados a plantas.
Cosméticos	Produtos de saúde e beleza	Emulsificação, solubilização, redução da tensão superficial agentes espumantes e antimicrobianos produtos de limpeza, mediadores de ação enzimática.
Limpeza	Detergentes para lavagem	Detergentes e desinfetantes para lavagem, espalhamento, redução da tensão superficial, inibição de corrosão.
Têxteis	Preparação de fibras; Tingimento e impressão; Acabamento de têxteis	Molhagem, penetração, solubilização, emulsão, detergência e dispersão, redução da tensão superficial e emulsificação em formulações de acabamento, amaciamento.
Nanotecnologia	Síntese de nanopartículas	Emulsificação e estabilização

Fonte: Santos et al., 2016

Os biossurfactantes apresentam diversas propriedades úteis para a indústria alimentícia. Segundo Araujo, Freire e Nitschke (2013), estes podem ser utilizados como emulsificantes no processamento de matérias-primas, indispensáveis para produtos alimentícios que exigem estabilidade, superioridade sensorial e maior vida de prateleira, sendo aplicados em panificação, produtos derivados da carne e do leite (queijos cremosos e sorvetes), além de suas propriedades

como agentes antiadesivos e antimicrobianos que contribuem na diminuição da contaminação dos alimentos processados.

Freire et al. (2009) demonstraram o efeito de biossurfactantes associados e aliados a antibióticos como agentes antimicrobianos, e segundo eles, a combinação de nisina como rhamnolipídeos inibiu esporos termofílicos e aumentou a vida de prateleira em leites de soja UHT, enquanto o uso da natamicina com rhamnolipídeo também promoveu o aumento da vida de prateleira e inibiu o crescimento de leveduras em molhos para salada. Já a associação destes três (natamicina, nisina e rhamnolipídios) em queijo *cottage* inibiu o crescimento de bactérias e leveduras e prolongou sua vida de prateleira. O Quadro 1.4 descreve os tipos de biossurfactantes mais conhecidos e suas possíveis aplicações.

Quadro 1.4. Tipos de biossurfactantes (BS) e suas aplicações.

Tipo de biossurfactante		Microrganismo	Aplicação
Glicolipídeos	Rhamnolipídeos	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas putida</i>	Biorremediação
		<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Agente de biocontrole
		<i>Renibacterium salmoninarum</i>	Biorremediação
	Soforolipídeos	<i>Candida bombicola</i> <i>Candida apicola</i>	Emulsificante, MEOR
	Trehalose lipídeos	<i>Rhodococcus spp.</i>	Biorremediação
		<i>Tsukamurella sp.</i> <i>Arthrobacter sp.</i>	Agente antimicrobiano
	Manosileritritol lipídeos	<i>Candida antartica</i>	Antagonista neuroreceptor e agente antimicrobiano
		<i>Kurtzmanomyces sp</i>	Aplicação biomédica
Lipopeptídeos	Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>	Agente antimicrobiano e Aplicação biomédica
	Lichenisina	<i>B. licheniformis</i>	Agente hemolítico e quelante

FONTE: Reis et al., 2013.

Em 2006, Shete et al fizeram um mapeamento das patentes de biossurfactantes e bioemulsificantes, identificando ao todo 255 patentes em todo o mundo. Segundo este estudo, 24% das patentes era referente a soforolipídeos e a surfactina e os rhamnolipídeos

representavam 13 e 12% respectivamente, contudo estes valores eram subestimados, uma vez que muitas patentes não especificam o microrganismo produtor, sendo restritas apenas ao uso específico do biossurfactante produzido. Quanto à sua aplicação, um alto número de cerca de 33% das patentes abrangia a indústria de petróleo, 15% as de cosméticos, 12% como medicamentos e agentes antimicrobianos e 11% em relação a biorremediação.

Conforme Santos et al. (2016), mesmo que a produção em grande escala seja um desafio do ponto de vista econômico, em vista do investimento financeiro necessário e da viabilidade da produção industrial, a indústria de biossurfactantes teve um crescimento considerável nas últimas décadas. De acordo com Cameotra e Makkar (2004), se houver o desenrolamento de processos fermentativos para garantir maiores rendimentos, a desvantagem com custos do biossurfactante pode ter uma queda. Para estes autores, é necessário que haja melhorias na otimização de processos a nível biológico e de engenharia para uma produção de biossurfactante comercialmente viável.

Embora ainda sejam necessárias melhorias significativas, o avanço da tecnologia de produção de biossurfactantes já possibilitou um aumento de 10 a 20 vezes em sua produtividade (Cameotra; Makkar, 2004). Entretanto, apesar do crescente número de patentes, a comercialização dessa biomolécula anfipática ainda é dificultada devido à baixa variedade de biossurfactantes produzidos e caracterizados, mas principalmente pela ineficiente transferência do conhecimento científico para a indústria (GEYS; SOETAERT; VAN BOGAERT, 2014).

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho é a produção biotecnológica de biossurfactante por *Lactococcus lactis* CECT-4434, a partir de substratos alternativos de baixo custo, o soro de leite e a vinhaça proveniente da produção do vinho, com posterior avaliação das propriedades do biossurfactante produzido. Ademais, avaliar a capacidade desta bactéria láctica em sintetizar bacteriocina, contribuindo assim, para a rentabilidade do processo biotecnológico.

2.1. Objetivos específicos

- a. Avaliar a influência do soro de leite e da vinhaça de uva na produção de biossurfactante e bacteriocina por *Lactococcus lactis* CECT-4434;
- b. Avaliar, com auxílio de um planejamento fatorial fracionado 2⁴, com adição de três ensaios nos pontos centrais, a influência das variáveis relevantes (soro de leite, vinhaça, sacarose e extrato de levedura) nos cultivos conduzidos em *shaker*;
- c. Avaliar, em biorreator de 2 litros operado em regime descontínuo, a influência do oxigênio dissolvido no meio de cultivo que terá levado a maximização da resposta (produção de biossurfactante), nos estudos conduzidos em *shaker*;
- d. Analisar o tipo de biossurfactante obtido por meio de espectroscopia de infravermelho (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN);
- e. Avaliar as propriedades do biossurfactante como:
 - Estabilidade em condições extremas de pH e temperatura;
 - Capacidade antimicrobiana frente a microrganismos contaminantes;
 - Inibição da adesão de organismos contaminantes em superfícies sólidas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismos e pré-inóculo

Lactococcus lactis subsp. *lactis* CECT-4434 obtida da Coleção Espanhola (Valência, Espanha), foi mantida a -20°C em meio MRS (Man-Rogosa-Sharpe, Difco), com glicerol 15% (v/v) (RODRIGUES et al., 2006b; SADIQ et al. 2014; SHARMA et al., 2014). As cepas indicadoras utilizadas foram mantidas em meio específico com glicerol 20% (v/v), em ultrafreezer a -70°C.

Para o pré-inóculo de *Lc. lactis*, 1 mL da cultura estoque foi incubado a 37°C e 100 rpm em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de caldo MRS composto por: 10 g/L peptona, 10 g/L extrato de carne, 5 g/L extrato de levedura, 20 g/L dextrose, 1 g/L polissorbato, 2 g/L citrato de amônio, 5 g/L acetato de sódio, 0,1 g/L sulfato de magnésio, 0,05 g/L sulfato de manganês, 2 g/L fosfato de potássio dibásico. Até alcançar uma concentração celular de D.O. 0,8-0,9 a 600 nm. O pré-inóculo das cepas indicadoras foi realizado em meio específico, até alcançar uma D.O. de 0.3-0.4 a 600 nm.

3.2. Avaliação dos parâmetros de cultivo

Ensaio preliminares foram realizados a fim de avaliar a influência da temperatura (30, 37 e 40°C) na produção de biossurfactante, principal objetivo e, adicionalmente, bacteriocina (cepa indicadora *S. aureus*). Para tanto, a partir do pré-inóculo descrito no item 3.1, uma alíquota de 10 mL foi transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de MRS, e incubados sob agitação de 100 rpm por 24h, a 30, 37 e 40°C, amostras do meio de cultivo foram coletadas em tempos determinados. O estudo foi realizado em triplicata.

Após verificar a temperatura de cultivo, outra análise foi realizada para determinar o melhor tempo de coleta a fim de otimizar o estudo e verificar se a composição do meio de cultivo alteraria a cinética de produção de biossurfactante (total de 24h), para então prosseguir com o planejamento experimental proposto no item 3.3. Para tanto, ensaios foram realizados coletando-se amostras a cada três horas, com três meios de cultivos distintos, sendo: MRS, soro de leite 10% (controle, sem suplementação) e soro de leite suplementado (10% de soro de leite, 2,0% de vinhaça, 1,5% de sacarose e 1,0% de extrato de levedura).

3.3. Planejamento experimental

Um planejamento fatorial completo foi proposto para maximizar a produção de biossurfactante. O delineamento composto central (CCD) selecionado foi 2^4 com três pontos centrais, contendo quatro variáveis independentes em três níveis, englobando 19 ensaios. Este tipo de modelo permite estimar a significância dos parâmetros e de suas interações. As variáveis e suas concentrações (níveis) estão descritas na Tabela 3.1. Enquanto a Tabela 3.2 mostra a matriz do delineamento.

Tabela 3.1. Tabela de variáveis e níveis avaliados no delineamento.

Variáveis	Código	-1	0	1
Soro de leite (% m/v)	X_1	5	10	15
Vinhaça (% v/v)	X_2	1,0	2,0	3,0
Sacarose (% m/v)	X_3	1,0	1,5	2,0
Extrato de Levedura (% m/v)	X_4	0,5	1,0	1,5

Tabela 3.2. Matriz do delineamento de composto central (CCD) 2^4 com três pontos centrais, segundo a Tabela 3.1, exceto o ensaio controle.

Ensaio	X_1	X_2	X_3	X_4
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	-1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1
9	-1	-1	-1	+1
10	+1	-1	+1	+1
11	-1	+1	-1	+1
12	+1	+1	-1	+1
13	-1	-1	+1	+1
14	+1	-1	+1	+1
15	-1	+1	+1	+1
16	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

Os dados obtidos foram avaliados utilizando o software Statistica versão 13.0 (Start Soft, EUA), considerando erro puro, e cálculo do coeficiente de determinação (R^2), a fim de avaliar estatisticamente a fiabilidade do modelo. Os valores preditos e estimados foram utilizados para otimização da produção de biossurfactante, bem como para validação do modelo experimental. Os resultados foram sujeitos a análise de variância (ANOVA). A seguinte equação de resposta foi utilizada para correlacionar as variáveis dependentes e independentes:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 \cdot X_1 + \beta_2 \cdot X_2 + \beta_3 \cdot X_3 + \beta_4 \cdot X_4 + \beta_{12} \cdot X_1 \cdot X_2 + \beta_{13} \cdot X_1 \cdot X_3 + \beta_{14} \cdot X_1 \cdot X_4 + \beta_{23} \cdot X_2 \cdot X_3 + \beta_{24} \cdot X_2 \cdot X_4 + \beta_{34} \cdot X_3 \cdot X_4 + \beta_{123} \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_3 + \beta_{124} \cdot X_1 \cdot X_2 \cdot X_4 + \beta_{134} \cdot X_1 \cdot X_3 \cdot X_4 + \beta_{234} \cdot X_2 \cdot X_3 \cdot X_4$$

onde Y é a variável de resposta para redução de tensão superficial (para biossurfactante) ou zona de inibição (para bacteriocina); β_0 é uma constante de intercepção; $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \beta_4$ são os coeficientes de regressão para os efeitos lineares e; $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{14}, \beta_{23}, \beta_{24}, \beta_{34}, \beta_{123}, \beta_{124}, \beta_{134}, \beta_{234}$ são os coeficientes de interação das variáveis.

Para avaliar a influência das variáveis com maior acuidade, ensaios preliminares com meio comercial MRS, soro controle (10%, m/v) e base de soro de leite suplementado conforme ponto central do delineamento (corridas 17, 18 e 19), foram realizados para determinar o melhor tempo de amostragem, que seria utilizado no delineamento, no qual seria possível observar qual meio proporcionaria maior redução da tensão superficial (TS) e maior atividade de bacteriocina.

3.4. Procedimento experimental

3.4.1. Condições de cultivo em agitador metabólico

Uma alíquota de 10 mL do pré-inóculo descrito no item 3.1, foi transferida para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo as 100 mL das bases de soro de leite (BRF-Foods, São Paulo, Brasil) suplementadas conforme planejamento descrito nas Tabelas 3.1 e 3.2 do item 3.3. O cultivo foi conduzido em *shaker* a 100 rpm e 37°C por 24h, sendo amostras coletadas em tempos determinados para análise de crescimento celular (UFC/mL), pH, bacteriocina e biossurfactante.

3.4.2. Preparo dos substratos alternativos

3.4.2.1. Soro de leite

Foram preparadas as bases de soro de leite (BRF-Foods - composição 1,0% gordura, 76,81% lactose, 12,03% proteína, 8,67% sais minerais e 0,065% ácido láctico) para o delineamento composto central (CCD) nas concentrações 5, 10 e 15% (m/v). O preparo foi realizado segundo metodologia mesclada descrita por Kargi, Eren e Ozmihci (2012) e Sharma et al. (2014). Para tanto, após reduzir o pH (Quimis, Diadema, Brasil) das bases de soro de leite para 5,0 com HCl 6N, o mesmo foi desproteínizado por tratamento térmico a 121°C por 15 min. O precipitado foi então removido por centrifugação a 10°C e 4470 g por 10 min, em seguida, o pH do sobrenadante foi ajustado, de maneira estéril, para 6,7 com NaOH 2M e utilizado com meio de fermentação.

As bases de soro de leite foram então suplementadas com sacarose (Labsynth) como fonte de carbono, nas concentrações 1,0; 1,5; ou 2 % (m/v) e 0,5; 1,0; ou 1,5 % (m/v) de extrato de levedura (Difco) como fonte de nitrogênio. Adicionou-se também 1, 2 ou 3% (v/v) de vinhaça de uva (Vinícola Góes, São Roque, Brasil), previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min. Como controle foi preparada uma base de soro de leite a 10 % (m/v) de sólidos totais sem suplementação, e por motivos comparativos, utilizou-se o meio comercial MRS.

3.4.2.2. Vinhaça

A vinhaça de uva (vinho tinto) foi gentilmente fornecida pela cooperativa produtora de vinho Vinícola Góes (São Roque, Brasil). O preparo da mesma foi realizado primeiramente por meio de centrifugação a 4470 g e 10°C por 10 min, a fim de retirar os sólidos suspensos que prejudicam a extração do biossurfactante. O pH do sobrenadante foi ajustado para 6,7, seguido de esterilização em autoclave a 121°C por 15 min.

3.4.3. Biorreator em regime descontínuo

Após a avaliação dos efeitos das variáveis e da otimização das condições de cultivo em agitador metabólico por meio de análise estatística dos resultados obtidos pelo software Statistica 13.0, obteve-se a melhor condição para maximização da resposta (produção de biossurfactante). A partir disto, foi realizado do *scale up* para biorreator. A fim de reduzir a formação de espuma, a oxigenação foi não dispersiva (SANTA ANNA et al., 2004), injetando-se oxigênio puro ao invés de ar comprimido. Segundo Stika (2009) a técnica de uso de oxigênio puro é a mesma que a utilizada para ar comprimido, exceto pela quantidade de tempo que o gás borbulha através do meio de cultura. Isto é, uma vez que o ar contém apenas 21% de oxigênio, se torna necessário maior borbulhamento de ar para dissolver a quantidade de oxigênio na concentração desejada, provocando maior formação de espuma. Exemplificando, enquanto a aeração com ar precisa ser executada durante um período mínimo de 15 minutos para atingir uma oxigenação adequada, ao utilizar oxigênio puro o mesmo requer apenas um minuto ou dois, para alcançar o mesmo resultado.

Sendo assim, uma alíquota de 100 mL do pré-inóculo descrito no item 3.1 foi transferida para o biorreator de bancada Biostat® B (Sartorius AG, Gotinga - Alemanha) contendo 1 L do meio de cultivo em que houve maior produção de biossurfactante. O biorreator utilizado, com volume máximo de 2 L, é equipado com controle de oxigênio dissolvido (OD) automático avançado por cascata, que proporciona maior flexibilidade para o desenvolvimento e otimização da estratégia de controle de OD. Os experimentos foram conduzidos a 37°C por 24h, em regime de cascata e amostras foram coletadas a cada 3h para análise de BS, biomassa, pH, açúcares e ácido láctico.

3.4.3.1. Influência da oxigenação

O controle da concentração de OD por meio de cascata foi utilizado a fim de verificar a influência da oxigenação na produção de biossurfactante. A cascata permite ajuste paralelo de todas as definições de parâmetros que afetam o OD, como a velocidade de agitação e as taxas de fluxo de ar ou oxigênio puro, de maneira automática e simultânea. A importância desta avaliação se deve ao oxigênio dissolvido influenciar não só a produção do biossurfactante, mas também a taxa e rendimento do mesmo, além da oxigenação representar um parâmetro crítico na produção de biossurfactante, com considerado efeito sobre a eficiência do processo, bem como na

quantidade e qualidade do biossurfactante produzido (DOMINGUES et al., 2017).

A influência da oxigenação, foi avaliada variando a concentração de OD por cascata em microaerofilia a 5 e 30, e sob condições aeróbias a 60% de concentração de OD, e outro com meio de cultivo saturado em 100% de OD, sem posterior controle do mesmo, sob agitação de 100 rpm e 1,0 vvm. Além destes, foi realizado ensaio em anaerobiose (0% de OD).

3.4.4. Procedimento das análises

3.4.4.1. Extração de bacteriocina

Após centrifugação (15000 g por 15 min a 4°C) das amostras de meio fermentado em *shaker* e separação da biomassa, o sobrenadante foi filtrado em membrana com diâmetro dos poros de 0,45 µm (Millipore™, Massachussets, EUA). Em seguida o filtrado foi transferido em tubos Eppendorf e submetido a aquecimento por 3 min a 80°C para inibição das proteases, e posteriormente armazenado a 4°C para análise posterior.

A atividade antimicrobiana da bacteriocina produzida foi analisada através da técnica de difusão em poços. Para tanto 1% (150µL) da cepa indicadora *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* CECT-239 foi inoculada em TSB Agar 1% tamponado. No ágar solidificado foram feitos poços de 7mm de diâmetro com o auxílio de um cilindro metálico estéril, sendo posteriormente preenchidos com 50µL de cada extrato filtrado. Após as placas serem incubadas por 24h a 37°C, as áreas de inibição observadas pelas áreas claras ao redor do poço (zonas de inibição) foram medidas com a ajuda de um paquímetro.

3.4.4.2. Recuperação e análise do biossurfactante

Após centrifugação a 4470 g por 10 min a 10°C, separou-se o sobrenadante para medição de biossurfactante extracelular. Para extração do biossurfactante intracelular e/ou aderido, as células separadas na centrifugação foram lavadas com água deionizada e ressuspendidas em tampão fosfato salino PBS (10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ e 150 mM NaCl, pH 7,0) na proporção de 1,0 mL de PBS por 6,0 mL de amostra inicial, e submetidas a agitação por 2 h a 25°C (GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2011; PORTILLA-RIVERA et al, 2007;

RODRIGUES et al. 2006a; 2006b; 2006d; RODRÍGUEZ-PAZO et al., 2013). Transcorrido este tempo, as amostras foram centrifugadas a 4470 g por 10 min e 25 °C, e mediu-se a tensão superficial (TS) do sobrenadante.

A TS do meio de cultura livre de células e do extrato em PBS foram medidas pelo método do anel, utilizando Tensiômetro *Krüss* K9 (Hamburgo, Alemanha) equipado com anel de platina *De Noüy* 1,9 cm. Os valores de TS representam a média de três medições independentes a 25 °C.

A concentração de biossurfactante foi calculada utilizando uma curva de calibração reportada por Portilla-Rivera et al. (2007), obtida utilizando surfactina em diferentes concentrações abaixo da Concentração Micelar Crítica (CMC) com valores conhecidos de TS:

$$[BS](mg/L) = TS (mN/m) - \frac{76,984}{-8,6468}$$

A surfactina foi utilizada como um padrão tal como, por exemplo, albumina é utilizada como padrão em ensaios de quantificação de proteínas, uma vez que é um dos biossurfactantes mais estudados (RODRIGUES; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2006), proporcionando assim um método adequado para estimar a concentração de biossurfactantes (PORTILLA-RIVERA et al., 2007; RODRÍGUEZ-PAZO et al., 2013; SHARMA et al, 2014; RODRÍGUEZ et al. 2010b).

O método de tensão superficial é baseado na definição de que a atividade superficial é dependente da concentração em massa do biossurfactante (RASHEDI et al., 2006). Entretanto, ao atingir a CMC, a TS não diminui, se mais do surfactante estiver presente. Portanto, para estimar a concentração de biossurfactante é necessário, por vezes, diluir o extrato em PBS contendo o biossurfactante para alcançar a concentração micelar crítica (PORTILLA-RIVERA et al., 2007). Sendo assim, foi realizada a DMC (diluição micelar crítica) diluindo-se o extrato em PBS, e medindo a TS de cada uma das diluições, para determinar o fator de diluição (F_{cmc}). (PORTILLA-RIVERA et al., 2007; RODRÍGUEZ-PAZO et al., 2013), descrito na literatura como sendo proporcional à quantidade total do composto tensoativo presente na solução, e pode ser usado como uma medida aproximada da concentração de biossurfactante (RASHEDI et al., 2006). Conforme os referidos autores, o aumento de valores do F_{cmc} indica aumento da concentração em massa do biossurfactante. O F_{cmc} é calculado através do ponto de intersecção entre a reta linear referente à TS que se manteve estável, e a reta onde inicia o aumento da mesma, devido à diluição. A concentração de biossurfactante é dada pela equação citada acima (PORTILLA-RIVERA et al., 2007), multiplicada pelo F_{cmc}.

3.4.4.3. Determinação de ácido láctico, lactose e glicose

A determinação das concentrações de açúcares (lactose e glicose) e de ácido láctico foi realizada mediante Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE, Shimadzu - Japan). As amostras foram retiradas e centrifugadas a 15.000 g por 10 min. O sobrenadante foi então filtrado através de filtro de membranas de 0,45µm (MilliporeTM, Massachussets, EUA) e em seguida transferido em frascos (vials). A coluna de separação utilizada foi a de modelo SUPELGOGEL H 30 cm x 7,8 mm, a temperatura do sistema 50 °C e o eluente uma solução aquosa de H₃PO₄ 0,1%. O fluxo do sistema foi de 0,5 mL/min. A coluna foi estabilizada por 3 h antes utilizando a mesma solução sob as mesmas condições de separação. A quantificação dos açúcares foi executada através de curvas-padrão previamente obtidas com soluções-padrão de alta pureza para o uso em CLAE. Todas estas análises foram realizadas em triplicata.

3.5. Semi-purificação do biossurfactante

O extrato em PBS contendo o biossurfactante foi dialisado em tubo de membrana para diálise (peso molecular 6 a 8 kDa, Orange Science, Braine-l'Alleud, Bélgica) utilizando água deionizada a 4°C por 36h, seguido de liofilização. O biossurfactante liofilizado foi armazenado a -20°C para os experimentos posteriores (GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2010).

3.6. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

A redução de tensão superficial (TS) promovida pelo biossurfactante ocorre até chegar a um nível crítico, onde as moléculas anfipáticas formam complexos moleculares como micelas, conhecido como CMC, e a partir de então não há redução da TS, mesmo se houver uma maior concentração de biossurfactante (DESAI; BANAT, 1997; VAN HAMME; URBAN, 2009). Para determiná-la, diluiu-se o biossurfactante liofilizado em concentrações de 1,5 a 100 mg/mL, medindo a TS de cada concentração. O ponto de intersecção entre as duas retas formadas, sendo uma que permaneceu constrante e outra quando iniciou o aumento da TS, é determinado pela CMC.

3.7. Avaliação das propriedades do biossurfactante

3.7.1. Estudos de estabilidade do biossurfactante em condições extremas de pH e temperatura

Dado que os biossurfactantes podem ser empregados em condições extremas de temperatura assim como em diferentes valores de pH, a estabilidade do biossurfactante sintetizado por *Lc. lactis*, foi avaliada utilizando diferentes pH (2 - 12) e temperaturas (4 - 80 °C), a partir de uma solução aquosa do biossurfactante liofilizado a 50mg/mL. A influência destes parâmetros foi determinada medindo a tensão superficial a tempo zero e após 24 h de incubação.

3.7.2. Estudo da capacidade antimicrobiana do biossurfactante frente a diversos microrganismos patogênicos

A atividade antimicrobiana do biossurfactante liofilizado (0,2 a 100 mg/mL), dissolvido em água deionizada foi determinada pelo método de microdiluição em poços utilizando microplaca estéril de poliestireno de 96 poços (TPP) seguindo metodologia modificada descrita por Gudiña et al. 2010. Primeiramente, 150 µL de meio estéril específico para cada bactéria patogênica avaliada foram transferidos para os poços. A seguir, 150 µL do biossurfactante em solução PBS (200 mg/mL) foram adicionados na primeira coluna da microplaca, sendo misturados com o meio e resultando em uma concentração de 100 mg/mL de biossurfactante. A seguir, 150 µL desta mistura foram transferidas para os poços subsequentes, descartando 125 µL da mistura da décima coluna, assim, o volume final de cada poço foi de 150 µL. Este processo resulta em uma diluição seriada das 10 primeiras colunas (100-0,19 mg/mL). As colunas 11 e 12 não continham biossurfactante e serviram como controle negativo (PBS) e controle positivo (apenas cepa indicadora), respectivamente. Todos os poços, exceto a coluna 11, foram inoculados com 3 µL de microrganismos patogênicos (*Staphylococcus aureus* ATCC 10390; *S. aureus* CECT-239; *Listeria monocytogenes* NADC 2045; *L. monocytogenes* CECT-934; *Escherichia coli* ATCC 25922; *Salmonella enterica* CECT-724) multiplicados em meio específico durante 18 h, isolados a partir da cultura por meio de centrifugação (15000 g, 10 min, 10 °C), e diluída para uma suspensão a 10⁸ CFU/mL. As

microplacas foram cobertas e incubadas por 24h a 37°C. Os ensaios foram realizados em triplicata em todas as concentrações de biossurfactante para cada estirpe. Após o tempo de incubação, a absorbância de cada poço foi determinada a 600 nm (Abs_{600}) em leitor de microplacas (Synergy HTX - Biotek, Winooski, EUA). As porcentagens de inibição de crescimento sob as diferentes concentrações de biossurfactante para cada microrganismo foram calculadas como:

$$\% \text{ inibição de crescimento} = \left[1 - \left(\frac{Abs_c}{Abs_0} \right) \right] \times 100$$

onde Abs_c representa a absorbância do poço com uma concentração de biossurfactante e Abs_0 a absorbância do poço controle (sem biossurfactante). O estudo foi realizado em triplicata.

3.7.3. Estudo da inibição da adesão de microrganismos patogênicos a superfícies sólidas ao utilizar biossurfactante

Para avaliar as propriedades antiadesivas dos biossurfactantes, seguindo a metodologia modificada proposta por Gudiña et al. (2010) e Machado et al. (2013), poços de microplaca de cultura estéril de poliestireno (96 cavidades, TPP) foram ser impregnados com 150 μ L de soluções aquosas de biossurfactante liofilizado em diferentes concentrações (100 a 0,19 mg/mL), sintetizados por *Lc. lactis*. As microplacas placas foram incubadas por 18 h a 4°C, e subsequentemente os poços foram lavados duas vezes com tampão PBS. Uma alíquota de 150 μ L de microrganismos indicadores citados no item anterior (3.7.2), isolados a partir da cultura e diluídos para 10^8 CFU/mL (como descrito no item anterior) foram adicionados e incubados nos poços por 4 h a 4°C. O controle negativo foi feito com poço contendo apenas PBS e o controle positivo mantido adicionando 150 μ L da suspensão bacteriana em poço sem biossurfactante. Os poços foram subsequentemente lavados duas vezes com tampão PBS estéril de forma a remover as células bacterianas não-aderidas.

Os microrganismos aderidos foram então fixados com 150 μ L de metanol 99% por poço e, após 15 min, os poços forma esvaziados e deixados para secar. Em seguida, os poços foram corados com 150 μ L de solução de cristal violeta 1% em temperatura ambiente por 5 min. O excesso de corante foi lavado em água corrente. Após secar, o corante aderido aos microrganismos foi resolubilizado com 150 μ L de ácido acético glacial a 33% (v/v) por poço e

a absorvância de cada poço, correspondente ao número de microrganismos aderidos, foi medida em leitor de microplacas (Synergy HTX, Biotek) a 600 nm. A porcentagem de redução na adesão em cada concentração para cada microrganismo foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Redução da adesão} = \left[1 - \left(\frac{Abs_c}{Abs_0} \right) \right] \times 100$$

onde Abs_c representa a absorvância do poço a uma certa concentração de biossurfactante c e Abs_0 a absorvância do poço controle. A análise de antiadesão em microplacas estima a porcentagem de redução da adesão de microrganismos em relação ao poço controle que foram ajustados em 0% para indicar a ausência de biossurfactante e, portanto, suas propriedades de anti-adesão. Em contraste, resultados percentuais negativos indicam o aumento na adesão microbiana a uma dada concentração de biossurfactante em relação ao controle. O ensaio de antiadesão em microplacas permite a estimativa das concentrações brutas de biossurfactante que são eficazes na diminuição da adesão dos microrganismos estudados. O estudo foi realizado em triplicata.

3.7.4. Estudo da remoção de microrganismos patogênicos aderidos em superfície sólida através de limpeza com biossurfactante

Com metodologia desenvolvida pelo autor deste trabalho, a capacidade de remoção de microrganismos a superfícies sólidas pelo biossurfactante produzido foi avaliada por meio de limpeza (lavagem), utilizando biossurfactante em concentração de 100 a 0,19 mg/mL. Para tanto, 150 μ L do meio específico para cada microrganismo indicador foi adicionado em poços de microplaca de 96 poços (TPP), e adicionou-se 3 μ L de cada microrganismo a 10^8 CFU/mL, descritos no item 3.7.2. A placa foi coberta e incubada a 37°C por 24h, e após transcorrido este tempo, os poços foram esvaziados e deixados para secar.

Em seguida, os poços foram lavados com biossurfactante 2 vezes, nas concentrações previamente descritas, sendo o poço 11 o controle negativo (sem lavagem) e o 12 o controle positivo, lavagem com PBS. As bactérias ainda aderidas foram fixadas e coradas como descrito no item anterior e a seguir, leu-se a absorvância dos poços a 600nm. O estudo foi realizado em triplicata.

$$\% \text{ Remoção de microrganismos} = \left[1 - \left(\frac{Abs_c}{Abs_0} \right) \right] \times 100$$

onde Abs_c representa a absorbância do poço lavado com uma certa concentração de biossurfactante c e Abs_0 a absorbância do poço controle (lavado com PBS).

3.8. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FT-IV) e Ressonância magnética nuclear (RMN)

Para caracterização do biossurfactante foi realizada por espectroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier (FT/IR) na gama de 400-4000 cm^{-1} (Frontier - PerkinElmer, Massachusetts, EUA) resolução de 4 cm^{-1} . Esta técnica é particularmente útil para a identificação de diferentes tipos de ligações químicas (grupos funcionais) e pode, portanto, ser utilizados para identificar os componentes das misturas de composição desconhecida. Para isto, um miligrama de biossurfactante liofilizado foi moído com 100 mg de KBr a uma pressão de 7,500 kg durante 30 s, a fim de produzir pastilhas translúcidas, as quais foram analisadas por espectroscopia de infravermelho (SHARMA; SAHARAN, 2014).

Para melhor avaliação do resultado obtido, o biossurfactante purificado foi analisado pelo método de ressonância magnética nuclear (RMN) ^1H , realizada utilizando o espectrômetro Bruker AIII 500 MHz sendo a amostra dissolvida em água deuterada. As deslocamentos químicos de ^1H foram expressas em ppm em relação ao deslocamento do solvente utilizado como padrão.

3.9. Análise Estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram avaliados através de análise de variância (ANOVA) usando o software Statistica 13.0. Os valores foram comparados usando o teste de Tukey (SOKAL e ROHLF, 1979) a $P < 0,05$, e diferentes letras foram usadas para identificar as diferenças estatísticas entre eles.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Avaliação dos parâmetros de cultivo

Vários parâmetros externos podem interferir na produção e rendimento efetivo tanto de biossurfactantes como de bacteriocinas. Para tanto é necessário determinar as condições ideais da composição do meio de cultura, temperatura, pH e tempo de incubação (SÁNCHEZ; SÁNCHEZ; FLORES, 2013).

Nesse âmbito, realizou-se um experimento preliminar a fim de identificar os efeitos da temperatura (30, 37 e 40°C) na produção de biossurfactante, bacteriocina e ácido láctico, utilizando o microrganismo *Lc. lactis* CECT-4434, visando determinar qual a melhor condição para se obter maior quantidade do produto final desejado. Os ensaios foram realizados em MRS. A Tabela 4.1 demonstra os dados obtidos neste ensaio preliminar.

Tabela 4.1. Efeitos da temperatura sobre parâmetros analisados no ensaio preliminar

Temperatura (°C)	Tempo (h)	0	6	16	24
30	Biomassa (g/L)	0,1 ^a	4,6 ^d	5,3 ^e	5,7 ^e
	pH	5,3 ^f	4,7 ^d	4,2 ^{ab}	4,1 ^a
	TSred (mN/m)	0,0 ^a	7,9 ^b	13,4 ^d	14,3 ^{def}
	Zona de Inibição (mm)	0,0 ^a	14,0 ^f	13,0 ^d	13,8 ^{ef}
	Ácido láctico (g/L)	1,6 ^a	6,2 ^b	14,0 ^f	12,6 ^e
37	Biomassa (g/L)	0,1 ^a	4,8 ^d	5,0 ^e	5,4 ^e
	pH	5,3 ^f	4,7 ^d	4,3 ^b	4,2 ^a
	TSred (mN/m)	0,0 ^a	14,0 ^{de}	13,4 ^{def}	16,3 ^f
	Zona de Inibição (mm)	0,0 ^a	13,4 ^{de}	12,5 ^c	12,8 ^{cd}
	Ácido láctico (g/L)	1,6 ^a	5,9 ^b	14,3 ^f	14,2 ^f
40	Biomassa (g/L)	0,1 ^a	2,3 ^b	3,3 ^c	3,5 ^c
	pH	5,3 ^f	4,9 ^e	4,8 ^d	4,6 ^c
	TSred (mN/m)	0,0 ^a	9,20 ^c	13,2 ^{de}	14,2 ^{def}
	Zona de Inibição (mm)	0,0 ^a	12,9 ^{cd}	12,0 ^c	11,0 ^b
	Ácido láctico (g/L)	1,6 ^a	9,1 ^c	12,3 ^e	11,2 ^d

* Valores médios (n = 3). Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre valores do mesmo parâmetro na mesma tabela (P < 0.05).

É possível observar na Tabela 4.1 que os valores de pH a 30°C reduziram de forma semelhante aos do experimento conduzido a 37°C. Já em 40°C a redução do valor de pH foi menor ao longo do tempo de cultivo, reduzindo provavelmente devido a menor produção de ácido láctico em relação às outras temperaturas, decorrente de uma desaceleração do metabolismo à elevada temperatura. Como esperado pelo metabolismo homofermentativo de *Lc. lactis*, a produção de ácido láctico foi proporcional ao consumo de glicose (Figura 4.1).

Um comportamento similar foi observado por Rodríguez et al. (2010a) com a mesma cepa utilizada no presente estudo, onde a produção de ácido láctico foi de 7,8 g/L em 30h. Entretanto, quando os mesmos autores controlaram o pH a 6,8 em biorreator, houve aumento da produção de ácido láctico para 23 g/L em 6 h de cultivo a 30°C com consumo completo da glicose.

Figura 4.1. Consumo de glicose (●), tensão superficial (■) e produção de ácido láctico (◆). a. 30°C; b. 37°C; c. 40°C.

Quanto à atividade da bacteriocina, observou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de zona de inibição obtidos a 30°C (em média 13,6 mm) em relação aos obtidos com 37°C e 40°C (média de 12,9 e 11,9 mm, respectivamente), expressa como diâmetro de inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* CECT-239, grupo de risco 2. Alguns trabalhos já reportaram que bacteriocinas produzidas por *Lc. lactis* possuem atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* (GARCÍA-ALMENDÁREZ et al., 2008; PENNA et al., 2005; SADIQ et al., 2014). Em particular, a temperatura de 30°C favoreceu a produção de bacteriocina sendo superior em 4 e 8% sobre as amostras dos cultivos conduzidos a 37 e 40°C com 6h de cultivo e, após 24h, a diferença aumentou para 7 e 20%, respectivamente. Notou-se que em 30°C o diâmetro de inibição alcançou valores máximos em 6 h de cultivo, ou seja, o maior halo de inibição foi de 14 mm. Valores similares foram encontrados por García-Almendárez et al.

(2008) com zonas de inibição de 15,6, 8,0 e 5,5 mm frente às cepas de *S. aureus* 8943, 8855, 9993, respectivamente, empregando uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* UQ2.

No decorrer do cultivo, a zona de inibição sofreu uma redução em todas as temperaturas analisadas. Estes resultados corroboram com os de Sadiq et al. (2014) que observaram, a 25-30°C, atividade antimicrobiana da nisina de *Lc. lactis* PI-2 de 8 a 10 mm, e um decréscimo para aproximadamente 6 mm quando o cultivo foi conduzido a 33-37°C.

A maioria dos trabalhos reportados sobre *Lc. lactis* é concernente à cepa *Lc. lactis* 53, que segundo Rodrigues et al. (2006a) é capaz de produzir biossurfactante extracelular. No entanto, Rodríguez et al. (2010a), ao estudarem a mesma cepa utilizada no presente trabalho, relataram não haver produção de biossurfactante extracelular, contudo, após extração com PBS (pH 7,0), observaram redução da tensão superficial, caracterizando a produção de biossurfactante adsorvido nas células. No presente estudo foi avaliada a produção de biossurfactante baseada na capacidade de redução da tensão superficial (TSred) do meio de cultivo externo, e os valores de TSred (não mostrados) não foram estatisticamente significativos, confirmando assim as observações de Rodríguez et al. (2010a). Desta forma, os valores de TSred (Tabela 4.1) referem-se ao biossurfactante interno ou aderido à célula, extraído em PBS.

Rodríguez et al. (2006a) relataram que a concentração de biossurfactante produzido pela cepa *Lc. lactis* 53 está associada ao seu crescimento celular. A produção de biossurfactante concomitantemente com o crescimento celular também foi observada no presente estudo. Observou-se uma produção no início da fermentação, lembrando que uma substância é considerada biossurfactante se for capaz de reduzir a tensão superficial ao menos 8 mN/m (VAN DER VEGT et al., 1991). Todavia, a quantidade de biomassa não é determinante para maior concentração de biossurfactante. De fato, pode-se notar que em 6h de cultivo, tanto a 30°C como a 37°C, o crescimento foi similar (aproximadamente 4,7 g/L), entretanto, a TSred foi 43% maior no cultivo conduzido a 37°C.

Rodríguez et al. (2010a) também relataram que, a redução da TS começou no início do cultivo fermentativo, como consequência do metabolismo e do crescimento microbiano, e a TSred atingiu seu valor máximo (31,1 mN/m) após 9 h de cultivo, mas diminuiu em seguida na fase estacionária para apenas 17,5 mN/m devido a uma possível degradação ou pelo consumo do biossurfactante em condições de limitação de substrato.

A partir destes resultados preliminares, decidiu-se por continuar o estudo cultivando a *Lc. lactis* CECT-4434 a 37°C, por favorecer principalmente a produção de biossurfactante desde o início da fermentação evidenciada por uma redução da tensão superficial entre 14,0 e 16,3

mN/m, após 6-24 h de cultivo. Nestas condições de cultivo, este microrganismo apresentou a vantagem de produzir bacteriocina com atividade antimicrobiana satisfatória, apenas 7% menor que a obtida no cultivo a 30°C, com zona de inibição média de 12,9 mm *S. aureus* e ácido lático em concentração de 14,3 g/L.

A partir deste ponto, foi realizada uma cinética de produção a fim de identificar o melhor tempo de coleta para então prosseguir com o planejamento experimental proposto (item 3.3).

A partir da Tabela 4.2 foi possível notar que a quantidade de nutrientes não interfere diretamente na produção de biossurfactante, isto é, não determina se haverá maior concentração devido à maior carga nutricional.

Tabela 4.2. Cinética da produção de biossurfactante

Tempo (h)	Controle			Soro suplementado			MRS		
	TSred (mN/m)	Fcmc	[BS] (mg/L)	TSred (mN/m)	Fcmc	[BS] (mg/L)	TSred (mN/m)	Fcmc	[BS] (mg/L)
0	0,0 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,0 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,0 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
3	5,2 ^c	3,06 ^{gh}	5,18 ^f	3,7 ^b	2,48 ^{de}	3,75 ^{de}	0,3 ^a	2,82 ^g	3,47 ^d
6	7,5 ^d	3,10 ^h	6,64 ⁱ	10,1 ^f	3,29 ⁱ	7,04 ^j	9,3 ^e	2,58 ^e	5,78 ^g
9	10,7 ^f	1,19 ^b	2,76 ^c	14,9 ⁱ	2,25 ^d	6,20 ^h	16,5 ^k	3,19 ^h	6,25 ^{hi}
12	15,6 ^j	1,98 ^{cd}	5,18 ^{fg}	13,0 ^h	2,66 ^f	6,98 ^j	10,9 ^f	2,55 ^e	6,13 ^h
24	11,2 ^{fg}	1,55 ^{bc}	2,11 ^b	12,2 ^g	2,39 ^d	4,47 ^e	12,1 ^g	3,05 ^g	9,07 ^k

*Valores médios (n = 3). Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre valores do mesmo parâmetro na mesma tabela (P < 0.05).

Nota-se que a concentração de biossurfactante [BS], medida em equivalente de surfactina e multiplicada pelo fator de diluição (Fcmc), foi maior no tempo de 6h tanto para o controle (6,64 mg/L) quanto para o soro suplementado conforme ponto central do delineamento descrito na Tabela 3.2 (7,04 mg/L), enquanto em MRS a [BS] necessitou de 3h a mais para se equiparar estatisticamente a estes resultados com soro de leite, atingindo 6,25 mg/mL. Sharma et al. (2014) também obtiveram melhores resultados no início do cultivo em soro de leite com *Lactobacillus helveticus*, obtendo redução da TS nas primeiras 4 a 6h de cultivo, com redução de cerca de 14 mN/m.

Apesar de inúmeros trabalhos utilizarem a TSred como parâmetro para a produção de biossurfactante, notou-se na Tabela acima que a mesma não é ideal para analisar a [BS], uma vez que os valores obtidos de TSred foram maiores em outros tempos de amostragem que os obtidos em relação à [BS], atingindo 15,6 mN/m em 12h no ensaio controle, e 14,9 e 16,5 mN/m

(valor inclusive mais expressivo estatisticamente) em 9h de cultivo em soro suplementado e MRS, respectivamente. Isto pode ocorrer pois sabe-se que a medida de tensão superficial é qualitativa e instável, porém ainda é o método mais utilizado para análise de biossurfactante (RODRIGUES et al. 2006a;2006c; RODRÍGUEZ et al. 2010a; SHARMA et al. 2014). A diluição das amostras para determinação do fator de diluição F_{cmc} e da [BS], no entanto, demonstra maior precisão quanto a produção de biossurfactante. O F_{cmc} é obtido através das diluições sucessivas das amostras (RODRIGUÉZ-PAZO et al., 2013; PORTILLA-RIVERA et al., 2007). O aumento de valores do F_{cmc} indica aumento da concentração em massa do biossurfactante (RASHEDI et al., 2006), equivalente em surfactina. A Figura 4.2 exemplifica como estes dados foram obtidos.

Figura 4.2. Exemplo de análise do fator de diluição (F_{cmc}).

Observou-se que na amostra (a) foi necessária uma diluição aproximadamente 3 vezes maior que na amostra (b), para que perdesse a estabilidade conferida pelo BS e iniciasse o aumento da tensão superficial, dado que os valores estão em $1/F_{cmc}$. Verificou-se que ambas as amostras contendo soro de leite necessitaram de maior diluição logo em 6h de cultivo para diminuir a estabilidade do biossurfactante, mas em MRS, demorou 9h para atingir um F_{cmc} próximo dos cultivos referidos (3,19), estando ainda aquém, do ponto de vista estatístico, em relação meio de soro de leite suplementado (3,29).

A quantidade de nutrientes não influenciou no tempo de produção e na concentração de BS, nas amostras contendo o soro de leite. Nesse caso, determinou-se que o tempo de coleta mais favorável às análises seria 6h de cultivo, o qual seria possível analisar tanto a concentração de biossurfactante, quanto de bacteriocina.

4.2. Otimização da produção de biossurfactante e bacteriocina por *Lc. lactis* CECT-4434

4.2.1. Produção de biossurfactante por planejamento experimental

Visto que muitas variáveis podem interferir na produção de biossurfactantes, um planejamento fatorial completo foi proposto para maximizar a produção desta biomolécula, a fim de determinar os níveis ótimos das variáveis analisadas, prevendo a possível interação entre as mesmas. Segundo Zouari, Ellouze-Chaabouni e Ghribi-Aydi (2014), delineamentos experimentais são modelados com a finalidade de otimizar o rendimento de bioprocessos, permitindo obter mais dados com um menor número de experimentos.

Segundo Rodrigues, Teixeira e Oliveira (2006) e Sharma et al. (2014), a produção de biossurfactante ocorre durante a fase de crescimento exponencial do microrganismo (entre 3 a 12h de cultivo), fato que se confirmou neste estudo, visto que é possível observar uma redução da tensão superficial em 6h de cultivo. Rodrigues et al. (2006c) também observaram que a produção de biossurfactante ocorre principalmente nas primeiras horas de cultivo (4h), onde o consumo de substrato é muito baixo, com TSred em média entre 17,75 mN/m antes de 10h de cultivo.

Conforme a Tabela 4.3, e considerando a tensão inicial do PBS de 65,8 mN/m, pode-se notar que o meio de cultivo comercial MRS apresentou a menor TSred (7,5 mN/m), representado apenas 1,23 mg/L de biossurfactante, com crescimento celular de *Lc. lactis* de 4,5 g/L. Ao utilizar 5% de soro de leite e a maior concentração de vinhaça (condição 7), a TSred foi a menor obtida entre as condições contendo soro de leite (11,2 mN/m), com produção de biossurfactante de 4,64 mg/L. Em contrapartida, quando houve aumento da concentração de soro de leite (15%), notou-se que a síntese de biossurfactante foi favorecida, com produção de biossurfactante em 7,54, 7,58, 9,68 e 11,02 mg/L para as condições 16, 10, 14 e 12, respectivamente. Reforçando a interferência da concentração soro de leite na produção de biossurfactante, a amostra controle (10% soro de leite) mesmo sem suplementação reduziu a TS em 15,0 mN/m, com concentração de biossurfactante em 6,39 mg/L, sendo superior à obtida com 5% de soro (em média 5,39 mg/L).

Tabela 4.3. Valores de crescimento celular, pH, produção de ácido láctico, consumo de lactose, tensão superficial (TS), redução da tensão superficial (TSred), fator de diluição e concentração de [BS], obtidos no planejamento experimental proposto

Condição	x ₁	x ₂	x ₃	x ₄	Biomassa (g/L)	pH	Ácido láctico (g/L)	Lactose consumida (g/L)	TSred (mN/m)	Fcmc	[BS] (mg/L)
Controle	.	.	.	.	4,9	4,93	1,10	5,21	15,0	4,7	6,39
MRS	.	.	.	.	4,5	5,02	3,24	3,90	7,5	1,6	1,23
1	-	-	-	-	4,6	4,23	2,61	3,81	14,7	3,9	6,37
2	+	-	-	-	4,4	4,54	2,07	13,75	17,6	3,1	4,83
3	-	+	-	-	5,1	4,28	2,61	5,57	13,3	6,5	6,88
4	+	+	-	-	5,1	4,58	1,99	12,89	18,5	2,7	5,12
5	-	-	+	-	5,0	4,33	2,41	0,93	14,7	4,3	6,14
6	+	-	+	-	5,3	4,67	1,86	9,54	18,6	3,4	6,72
7	-	+	+	-	5,1	4,20	2,78	1,31	11,2	3,6	4,64
8	+	+	+	-	5,0	4,66	1,79	11,43	17,5	3,0	5,96
9	-	-	-	+	5,3	4,34	3,25	2,26	15,7	3,1	4,22
10	+	-	+	+	5,1	4,53	2,62	13,27	18,0	4,3	7,58
11	-	+	-	+	5,2	4,34	3,13	4,59	13,5	3,6	4,45
12	+	+	-	+	5,3	4,53	2,65	13,43	18,2	5,5	11,02
13	-	-	+	+	4,9	4,42	2,96	1,50	14,6	3,5	5,40
14	+	-	+	+	4,6	4,61	2,35	8,19	18,3	5,0	9,68
15	-	+	+	+	4,9	4,44	2,85	1,32	14,2	4,7	5,04
16	+	+	+	+	5,2	4,68	2,24	10,45	17,9	4,0	7,54
17	0	0	0	0	5,0	4,59	2,27	2,97	16,4	3,3	5,47
18	0	0	0	0	5,1	4,39	2,81	4,63	16,2	2,4	4,53
19	0	0	0	0	5,3	4,43	2,81	2,59	17,0	3,2	5,31

x₁: Soro de leite (5,10 e 15%, m/v); x₂: Vinhaça (1, 2 e 3%, v/v); x₃: Sacarose (1; 1,5 e 2%, m/v); x₄: Extrato de levedura (0,5; 1,0 e 1,5%, m/v).

Estes resultados estão de acordo com Gudiña, Teixeira e Rodrigues (2011), quando mencionaram que o aumento da concentração de lactose inicial garantiu maior produção de biossurfactante aderido às células por diferentes cepas de *Lactobacillus*, obtendo redução máxima da TS em 24,7 mN/m. Da mesma forma, no estudo realizado por Rodrigues, Teixeira e Oliveira (2006), utilizando *Lc. lactis* 53, ficou evidente que a alteração da fonte de carbono por lactose (em meio MRS) induziu a produção de biossurfactante em aproximadamente 1,5 vezes. Em comparação com o presente estudo, o soro de leite propiciou uma produção de biossurfactante 1,65 vezes maior que o meio de cultivo semi-sintético MRS. Conforme observaram Rodrigues e Teixeira (2008), presume-se que o uso de lactose, ao invés de glicose, pode induzir as células à outra via metabólica, e por isso, a quantidade de biossurfactante ligado à célula pode sofrer variações. Como pode ser visto no estudo preliminar realizado (Figura 4.1),

a glicose foi consumida concomitantemente com a produção de ácido láctico, o que era esperado em se tratando de uma bactéria com metabolismo homofermentativo, e demonstrando que pode ter havido desvio da via metabólica devido à presença de lactose ao invés de glicose, como sugeriram os autores supracitados.

Neste âmbito, verificou-se que nas condições onde continha 15% de soro de leite, o consumo de lactose foi 77% maior quando comparado ao tratamento com 5% do mesmo, isto é, o consumo diminuiu de 11,6 para 2,7 g/L em média. Quanto à produção de ácido láctico ocorreu o inverso, ou seja, a menor concentração de soro de leite (5%), proporcionou aumento de 23% da produção de ácido láctico em relação ao cultivo com 15% de soro de leite. Esta diferença demonstra que houve desvio da via metabólica devido à concentração de lactose, presente em quantidade significativa no soro de leite. Conforme Fu e Mathews (1999), a alta concentração de lactose pode inibir o crescimento celular, porém, no presente estudo o crescimento não foi afetado por este substrato, uma vez que a média da quantidade de biomassa, tanto para 5 quanto para 15% de soro de leite, foi de 5 g/L. Portanto, pode-se pressupor que com uma baixa concentração de lactose, o microrganismo utiliza este substrato para seu metabolismo vital, mas o excesso do mesmo, permite que outros metabólitos sejam formados, no caso o biossurfactante.

Ao analisar os dados de crescimento celular pode-se afirmar que a quantidade de células não é um fator determinante sobre a quantidade de biossurfactante produzido. Como exemplo, podemos observar as condições 9 e 12, onde ambas proporcionaram o maior crescimento obtido no delineamento (5,3 g/L), contudo, a condição 12 garantiu uma redução da TS em 18,2 mN/m com 11,02 mg/L de biossurfactante, enquanto a condição 9 proporcionou produção de biossurfactante de apenas 4,22 mg/L. O crescimento celular foi similar na maioria das condições estudadas no planejamento experimental, em média 5,0 g/L, não sendo significativo estatisticamente, de maneira que a composição do meio de cultura possa ser o fator determinante quanto à produção de biossurfactante.

Analisando os dados de Fcmc da Tabela 4.3, é possível notar que o cultivo em MRS proporcionou menor produção de biossurfactante em 6h (1,23 mg/L), por ser necessário menor diluição (Fcmc de 1,6) para atingir o ponto máximo de redução de TS neste momento (58,3 mN/m), enquanto em soro de leite controle, onde não houve suplementação, necessitou-se diluir mais vezes (Fcmc de 4,7), para que a TS com redução de 15,0 mN/m, aumentasse devido à redução da estabilidade.

Quanto ao uso de resíduos da indústria vinícola, Rodríguez et al. (2010b) reportaram TSred de 14,4 mN/m por *Lc. lactis* CECT-4434, a mesma utilizada no presente estudo, com

produção de biossurfactante, equivalente em surfactina, de 1,7 mg/L e Fcmc de 1,2, utilizando fração hemicelulósica de resíduos da indústria vinícola. Quando os mesmos autores utilizaram 20g/L de vinhaça, a TS reduziu 12,1 unidades, atingindo 59,9 mN/m de tensão superficial, com produção de biossurfactante de 1,5 mg/L e Fcmc de 1,8. Da mesma maneira, utilizando açúcares hemicelulósicos provenientes de resíduos da produção do vinho, Rodríguez-Pazo et al. (2013) obtiveram produção de biossurfactante de 5,6 mg/L na co-cultura entre *L. plantarum* e *L. pentosus*, com Fcmc abaixo de 0,3. Portilla-Rivera et al. (2007) também observaram redução da TS em 16,1 mN/m por *L. pentosus*, com Fcmc de 2,6 e concentração de biossurfactante de 4,8 mg/L. Nota-se que os dados destes autores demonstram que o aumento do uso de resíduos da indústria vinícola desfavoreceu a produção de biossurfactante. Neste presente estudo utilizamos vinhaça de uva, contudo em concentrações menores, priorizando o soro de leite como substrato de baixo custo, o que propiciou maior produção de biossurfactante por *Lc. lactis* CECT-4434.

4.2.1.1. Estudo estatístico da produção de biossurfactante

Os dados obtidos foram avaliados utilizando o *software* Statistica versão 13.0 (Start Soft, EUA), considerando erro puro, e cálculo do coeficiente de determinação (R^2), a fim de avaliar estatisticamente a fiabilidade do modelo. Os valores preditos e estimados foram utilizados para otimização da produção de biossurfactante, bem como para validação do modelo experimental, com o propósito de examinar a influência de resíduos de baixo custo sobre a produção de biossurfactante, no caso utilizando soro de leite e vinhaça de uva, além de sacarose e extrato de levedura como fonte adicional de carbono e nitrogênio, respectivamente.

A Tabela 4.4, refere-se ao coeficiente de regressão da variável dependente que permite verificar a correlação existente entre as variáveis (soro de leite, vinhaça, sacarose e extrato de levedura) e qual é o sentido desta correlação (positiva ou negativa) para redução da tensão superficial. Análise de variância (ANOVA) foi realizada para apurar quais os fatores estudados foram significativos para a melhor performance do método proposto, isto é, quais variáveis interferem na produção do biossurfactante, avaliada pela redução de tensão superficial.

Tabela 4.4. Coeficientes de regressão estatística para redução de TS (mN/m) após 6h

Fator	Coeficiente de Regressão	Valor (t)	Valor (p)
Intercepção ¹	16,2387	210,016	0,000023
(1) Soro de leite (%) ¹	2,0625	20,3947	0,002396
(2) Vinhaça (%) ²	-0,4825	-4,7711	0,041232
(3) Sacarose (%)	-0,1637	-1,6192	0,246824
(4) Ext. Levedura (%)	0,2725	2,6946	0,114543
1 by 2 ²	0,4362	4,3138	0,049761
1 by 3	0,1600	1,5821	0,254435
1 by 4	-0,2437	-2,4103	0,137503
2 by 3	-0,1850	-1,8293	0,208846
2 by 4	0,1437	1,4215	0,291091
3 by 4	0,1100	1,0877	0,390338
1*2*3	-0,1362	-1,3473	0,310232
1*2*4	-0,1475	-1,4585	0,28207
1*3*4	-0,1062	-1,0506	0,403647
2*3*4	0,3312	3,2755	0,081916
R ² =0,99111; Erro padrão = 0,101129; ¹ Coeficiente significativo com 99% de confiabilidade;			
² Coeficientes significativos acima de 95% de confiabilidade.			

Sob as condições avaliadas, apenas poucos fatores foram significativos. Das quatro variáveis analisadas, sendo elas: soro de leite, vinhaça, sacarose e extrato de levedura como fonte de carbono e nitrogênio adicionais; é evidente que o soro de leite foi o fator determinante quanto à produção de biossurfactante, com confiabilidade de 99% (Tabela 4.4). Sharma et al. (2014) utilizaram soro de leite e extrato de levedura para a produção de biossurfactante por *Lactobacillus helveticus* MRTL91, e observaram que com 6 h de fermentação, já houve redução da tensão superficial próximo da máxima obtida (14 mN/m) e, com cerca de 10 h de cultivo a lactose foi totalmente consumida. Sendo assim, a lactose do soro de leite pode estar diretamente envolvida no metabolismo de produção do biossurfactante. Pelo diagrama de Pareto (Figura 4.3) pode-se confirmar a observação supracitada.

Um efeito negativo é observado em relação à vinhaça (95% de confiabilidade), demonstrando que o aumento da mesma prejudica a produção de biossurfactante. Um efeito é considerado significativo quando atinge níveis acima de 95% de confiabilidade ($p < 0,05$), que é evidenciado pela linha vertical no gráfico de Pareto para redução de TS em função das variáveis.

No diagrama de Pareto, os valores mostrados nas colunas horizontais correspondem ao (t) *Student* calculado para cada variável ou interação. Os efeitos positivos indicam que as variáveis consideradas apresentam efeito favorável à produção de biossurfactante, isto é, o

aumento da concentração da variável resulta em maior redução da TS. Os efeitos negativos indicam que a elevação da mesma provoca efeito antagonista.

Figura 4.3. Diagrama de Pareto medindo a influência dos substratos na produção do biossurfactante, utilizando planejamento composto central 2^4 . (1) % Soro de leite; (2) % Vinhaça; (3) % Sacarose; (4) % Extrato de levedura. Significância dos efeitos em nível de confiabilidade a 95% são representados pela linha de corte ($p=0,05$).

As interações também podem ser positivas ou negativas. A interação soro de leite-vinhaça positiva (como mostrado na Figura 4.3) indica que ao mudar a variável vinhaça do maior (+1) para o menor nível (-1), o efeito do soro de leite aumenta, como consequência há maior produção de biossurfactante, e ao modificar-se a variável soro de leite do maior nível para o menor, o efeito da vinhaça, que foi negativo, aumenta, e há menor produção. Assim, o gráfico Pareto mostra que os principais efeitos sobre a redução de tensão superficial foram soro de leite e vinhaça, e a interação soro-vinhaça. Os efeitos dos demais elementos (extrato de levedura e sacarose), analisados separadamente ou em interações, não foram significativos para um nível de confiança de 95% na distribuição de (t) Student.

Notou-se que o soro de leite e a vinhaça são inversamente proporcionais quanto à produção de biossurfactante. Uma interpretação parcial de dados seria baseada no metabolismo da bactéria, que pode ter sido direcionado para a produção de bacteriocina com aumento da concentração de vinhaça, assunto que será abordado posteriormente no item 4.2.2.

Outrossim, por *Lc. lactis* ser uma bactéria ácido-lática não se pode descartar a produção de ácido lático, e a vinhaça já foi evidenciada como fonte econômica de nutrientes para a obtenção deste ácido orgânico (BUSTOS et al., 2004). Rodríguez et al. (2010b) demonstraram que o uso de 20g/L de vinhaça por *Lc. lactis* CECT-4434 como fonte de N, P e micronutrientes,

propiciou a biossíntese de 19,6g/L de ácido lático, e promoveu a redução da TS em 12,1 unidades, com produção de biossurfactante de 1,5 mg/L. Por outro lado, *L. pentosus* a partir dos mesmos 20g/L de vinhaça foi abordada por Bustos et al. (2007), onde obtiveram 21,8 g/L de ácido lático, e redução da TS em 23,5 mN/m.

Além disto, sabe-se que as uvas e vinhos são ricos em compostos nitrogenados, em formas inorgânicas e orgânicas e que também são fontes de vitaminas para os microrganismos, como no caso das biotinas e niacinas presentes em níveis adequados, atendendo os requisitos vitamínicos necessários para o crescimento de bactérias ácido-láticas (DEVESA-REY et al., 2011). Salgado et al. (2010) evidenciaram alta concentração nitrogênio de 3,1 a 22,1 mg/g na vinhaça.

Na literatura existem diversos trabalhos relatando a interferência do nitrogênio para a produção de biossurfactante. Em 2001, Dubey e Juwarkar constataram que sob condições limitantes de nitrogênio, isto é, quando o mesmo foi reduzido em 60% (24 h), iniciou-se maior produção de biossurfactante atingindo 0,9 g/L em 96h de cultivo, por *P. aeruginosa* BS2. Fontes et al. (2010), também indicaram que quando a concentração de nitrogênio é baixa, a produção de biossurfactante é favorecida. Fato também observado por Casas e García-Ochoa (1999), quando relataram que quando há excesso de fonte de nitrogênio, a produção de biossurfactante é reduzida. Contudo, a falta de nitrogênio diminui drasticamente a redução de tensão superficial, demonstrando que uma quantidade inicial suficiente de nitrogênio é necessária para maior produção do biossurfactante (FONTES et al., 2012).

Conforme a Figura 4.4, pode-se observar que os valores observados e preditos quanto à redução de TS foram praticamente similares, com $R^2 = 0,99111$.

Figura 4.4. Valores preditos e observados para redução da TS (mN/m). Erro puro: 0,1636333

A partir destes resultados foi possível observar que não houve diferença significativa entre valores preditos e observados em nenhum dos experimentos realizados, demonstrando a confiabilidade do modelo. A relação empírica entre a tensão superficial (Y) e as variáveis dependentes e independentes para determinação dos valores preditos é dada pela equação a seguir:

$$Y = 16,2387 + 2,0625 \cdot x_1 - 0,4825 \cdot x_2 + 0,4362 \cdot x_1 \cdot x_2$$

A Figura 4.5 exibe o modelo de superfície de resposta envolvendo as variáveis vinhaça e soro de leite (%), em relação à redução da TS (mN/m). Nesta superfície 3D é possível constatar o que já foi relatado anteriormente, ou seja, quanto menor a concentração de vinhaça, maior é a redução da TS, e, no tocante ao soro de leite, quanto maior sua concentração, maior a redução de TS.

Figura 4.5. Superfície de resposta de redução da TS, mediante diferentes porcentagens de vinhaça e soro de leite, mantendo-se as outras variáveis constantes no valor médio de concentração.

Pode-se notar através da Figura 4.5, que não houve um ponto ótimo central, mas sim um gráfico de comportamento ascendente. Para tanto, um experimento foi conduzido a fim de verificar se o aumento da concentração de soro de leite, além do avaliado no delineamento, seria favorável ou não à produção do biossurfactante, com maior redução da TS. Sendo assim, elevou-se a concentração de soro de leite para 20, 25 e 30%, com as outras variáveis (vinhaça, sacarose e extrato de levedura) em nível médio (0) do delineamento (Tabela 3.1), e uma amostra com 15% de soro de leite como comparativo (Figura 4.6).

Figura 4.6. Avaliação da contração de soro de leite sobre a redução da tensão superficial.

De acordo com a Figura 4.6, o aumento da concentração de soro de leite não foi conveniente para o aumento de redução da tensão superficial. Efetivamente, a redução da TS declinou com a elevação da porcentagem de soro, demonstrando que a melhor concentração para a produção de biossurfactante por *Lc. lactis* é de 15%, com redução de 26,33 mN/m. A quantidade de soro pode ser um fator limitante para a produção do biotensoativo, causando inibição com a elevação de sua concentração.

O uso de baixa concentração de soro de leite (5,47% de sólidos totais) como substrato econômico por *Pseudomonas aeruginosa* BS2 proporcionou redução da tensão superficial em 27 mN/m com 96 h de fermentação e 10,8 Log UFC/mL (DUBEY; JUWARKAR, 2001). Da mesma maneira, ao empregar soro de leite com 5% de lactose, suplementado com 3 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona, Rodrigues, Teixeira e Oliveira (2006), obtiveram aumento de 1,2 vezes que em meio MRS, com redução de cerca de 60% dos custos de preparação comparados com o meio sintético. Estes estudos demonstram que mesmo com baixas concentrações de soro de leite é possível obter valores relevantes de produção de biossurfactante. O mesmo foi observado no presente trabalho, porém os resultados foram mais expressivos ao utilizar 15% de soro de leite, conforme Figura 4.7.

A otimização da produção de biossurfactante proposta pelo planejamento fatorial completo 2^4 com relação a todas as variáveis estudadas, é explicitada na Figura 4.7. Segundo o modelo proposto pelo *software Statistica*, a maior redução de tensão superficial seria alcançada com 15% de soro de leite, 1% de vinhaça, 2% de sacarose e 0,75% de extrato de levedura.

Figura 4.7. Perfis para valores previstos e modelo desejável para otimizar a produção de biossurfactante. As linhas tracejadas indicam os valores de otimização.

Notou-se que a concentração de vinhaça, carbono e nitrogênio pouco interfere na produção de biossurfactante se analisados separadamente. Contudo, como já foi explanado anteriormente, a vinhaça interfere negativamente no uso do soro de leite para a produção de biossurfactante, ou seja, sua interação gera certa influência sobre a produção de biossurfactante.

Já os outros fatores (sacarose e extrato de levedura) não apresentaram efeitos significativos neste modelo para determinar se maior ou menor quantidade dos mesmos seria ideal para a otimização do processo. Contudo pode-se observar que a sacarose em maior concentração (2%) favoreceu a produção de biossurfactante, sendo que em contrapartida, uma quantidade próxima do mínimo utilizada de nitrogênio (0,75%) promoveu o mesmo efeito.

A concentração e o tipo de carbono podem influenciar no metabolismo do microrganismo. Conforme Rodrigues, Teixeira e Oliveira (2006), pode-se especular que a substituição da glicose por lactose ou sacarose, pode induzir do metabolismo das células para outra direção, proporcionando maior produção de biossurfactante por grama de biomassa celular. Em sua pesquisa comparando a produção de biossurfactante *Lc. lactis* 53 e *S. thermophilus* A em meio MRS, soro de leite e melaço, os autores demonstraram que ambos os meios alternativos apresentaram melhor resultado se comparado ao obtido com meio comercial MRS, com produção de biossurfactante (equivalente em surfactina) em soro de leite em 0,9 a

1,4g/L para *Lc. lactis* 53 e *S. thermophilus*, enquanto em MRS os mesmos microrganismos produziram 0,7 e 0,8g/L, respectivamente.

Observou-se no modelo proposto (Figura 4.7), que uma baixa concentração de nitrogênio (0,5 a 0,75%) favoreceu a produção de biossurfactante. Este resultado corrobora com trabalhos encontrados na literatura, explicitados anteriormente, relatando que a maioria dos microrganismos produzem biossurfactante sob condições limitantes de nitrogênio (DUBEY; JUWARKAR, 2001; FONTES et al. 2010; FONTES et al., 2012).

A partir da otimização proposta na Figura 4.7, realizou-se a validação do modelo. Para tanto, preparou-se a base de soro de leite a 15% adicionando-se 1% de vinhaça, 2% de sacarose e 0,75% de extrato de levedura. Os resultados revelaram a confiabilidade do modelo, com redução da tensão superficial em 22 mN/m e 12,6 mg/L de biossurfactante equivalente em surfactina.

Pode-se verificar que a produção de biossurfactante pela bactéria estudada aumentou de acordo com o crescimento celular. Entretanto, a quantidade de células presentes não caracteriza maior concentração de biossurfactante produzido, visto que a menor quantidade de células observadas (4,4 g/L), referente à condição 2, reduziu a TS em 17,6 mN/m com produção de 4,83 mg/L de biossurfactante, sendo aproximadamente 4 vezes superior à obtida no meio comercial MRS, onde a redução de TS foi a menor de todos os experimentos realizados (7,5 mN/m e 1,23 mg/L de biossurfactante), com 4,5 g/L de crescimento.

Um biossurfactante efetivo pode reduzir a tensão da água de 72,0 para 35,0 mN/m (MULLIGAN, 2009). O biossurfactante obtido neste estudo por *Lc. lactis* CECT-4434 reduziu a tensão superficial do PBS de 65,8 para 47,57 mN/m. Em outros estudos, *L. helveticus* MRTL91 reduziu a tensão de 72 para 39,5 mN/m (SHARMA et al., 2014), enquanto *Lactococcus lactis* 53 e *Streptococcus thermophilus* A, reduziram a tensão para aproximadamente, 48 e 31 mN/m respectivamente (Rodrigues et al, 2006a). Comparado aos valores de TS obtidos na literatura para *Lc. lactis*, os resultados obtidos estão em conformidade com esperado.

4.2.2. Otimização da produção de bacteriocina por planejamento experimental

Adicionalmente, o mesmo planejamento fatorial (2^4), descrito no item 3,2 foi empregado para analisar a produção de bacteriocina por *Lc. lactis* CECT-4434. Para tal, o experimento foi conduzido por 6h, melhor tempo para análise de biossurfactante e também onde

houve maior produção do composto antimicrobiano verificado em estudos preliminares (resultados não apresentados). Para este fim, empregou-se a cepa indicadora *Staphylococcus aureus* CECT-239, grupo de risco 2, para verificar a atividade da bacteriocina produzida, uma vez que já foi comprovada a efetividade de bacteriocinas produzidas por algumas cepas de *Lc. lactis* sobre *S. aureus* (GARCÍA-ALMENDÁREZ et al., 2008; PENNA et al., 2005; SADIQ et al., 2014).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.5, verificou-se que a maior concentração de sacarose (2%) juntamente com a menor concentração de vinhaça (1%), referente às condições 5, 6, 13 e 14, reduziu a produção de bacteriocina, identificada pela diminuição da atividade antimicrobiana obtida (zona de inibição média de 10,7 mm). Por outro lado, o inverso (concernente às condições 3, 4, 11 e 12) proporcionou maior inibição, com halo em média de 12,15 mm.

Tabela 4.5. Valores de crescimento celular, pH e halos de inibição de *S. aureus* obtidos no planejamento experimental proposto

Condição	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Log UFC/mL	pH	Halo (mm)
Controle	.	.	.	.	11,16	4,93	0,0
MRS	.	.	.	.	10,10	5,02	14,4
1	-	-	-	-	10,47	4,23	10,8
2	+	-	-	-	9,95	4,54	11,2
3	-	+	-	-	11,63	4,28	12,3
4	+	+	-	-	11,71	4,58	11,4
5	-	-	+	-	11,35	4,33	10,7
6	+	-	+	-	12,17	4,67	10,1
7	-	+	+	-	11,81	4,20	12,5
8	+	+	+	-	11,45	4,66	11,6
9	-	-	-	+	12,22	4,34	11,6
10	+	-	-	+	11,80	4,53	12,5
11	-	+	-	+	11,96	4,34	12,4
12	+	+	-	+	12,28	4,53	12,7
13	-	-	+	+	11,16	4,42	10,6
14	+	-	+	+	10,29	4,61	11,7
15	-	+	+	+	11,34	4,44	10,1
16	+	+	+	+	11,91	4,68	10,5
17	0	0	0	0	11,50	4,59	11,8
18	0	0	0	0	11,63	4,39	11,9
19	0	0	0	0	12,28	4,43	12,0

X₁: Soro de leite (5,10 e 15%); X₂: Vinhaça (1, 2 e 3%); X₃: Sacarose (1; 1,5 e 2%); X₄: Extrato de levedura (0,5; 1,0 e 1,5%).

Vale frisar que não houve relação entre crescimento celular e produção de bacteriocina, Penna et al. (2005) já haviam descrito que a produção de bacteriocina por *Lc. lactis* não está diretamente relacionada à concentração celular. Não sendo o crescimento um parâmetro interferente no processo, os nutrientes presentes no meio de cultivo são o que determinam a síntese do composto antimicrobiano. De fato, não houve produção de bacteriocina na amostra controle (soro de leite 10%) onde não havia suplementação, mas no meio MRS rico em nutrientes, a zona de inibição de 14,4 mm, foi a maior obtida em todo o ensaio.

Valores aproximados foram encontrado por García-Almendárez et al. (2008) com zonas de inibição de 15,6, 8,0 e 5,5 mm para cepas de *S. aureus* 8943, 8855, 9993, respectivamente, empregando uma bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* UQ2 em meio de cultivo contendo 1% (m/v) soro de leite e 1% (p/v) de extrato de levedura. Estes resultados foram entre 10 a 68% aquém dos obtidos por Sadiq et al. (2014), que estudaram bacteriocinas produzidas em MRS por várias cepas de *Lc. lactis* isoladas de pimentão verde, vermelho e tomate frente a *S. aureus* ATCC 25923, e obtiveram zona de inibição de 17,5 mm.

Conforme com Penna et al. (2005), a expressão de bacteriocina pode estar ligada às diferentes concentrações de fontes de carbono como sacarose, lactose e glicose. De acordo com os autores, a concentração de 0,14% de sacarose promoveu maior expressão da bacteriocina (7,5 AU/mL) por *Lc. lactis* sendo 50% maior que a obtida quando os autores utilizaram 12,5% de sacarose. No presente estudo a maior concentração de sacarose (2%) ocasionou uma diminuição da atividade antimicrobiana com zona de inibição média de 10,9 mm contra *S. aureus*, enquanto a menor concentração (1%) promoveu aumento de até 14,2% em halos de inibição.

4.2.2.1. Estudo estatístico da produção de bacteriocina

A Tabela 4.6 refere-se ao coeficiente de regressão da variável dependente que permite verificar a correlação existente entre as variáveis (soro de leite, vinhaça, sacarose e extrato de levedura) e qual é o sentido desta correlação (positiva ou negativa) quanto à atividade antimicrobiana da bacteriocina.

Diferentemente do modelo de efeitos estimados para produção biossurfactante, onde o soro de leite demonstrou ser o fator determinante, no que diz respeito à síntese de bacteriocina houve maior influência das variáveis avaliadas. Conforme a Tabela 4.8, seis fatores apresentaram 99% de confiabilidade do modelo, com influências positivas e negativas, sendo:

vinhaça (+), sacarose (-), a intercepção entre cada uma destas variáveis com extrato de levedura (-), e vinhaça, sacarose e extrato de levedura conjuntamente (-).

Tabela 4.6. Coeficientes de regressão estatística para zona de inibição (mm) de *S.aureus* CECT-239

Fator	Coeficiente de Regressão	Valor (t)	Valor (p)
Intercepção ¹	11,4125	456,50	0,000005
(1) Soro de leite (%)	0,0375	1,50	0,272393
(2) Vinhaça (%) ¹	0,2687	10,75	0,008543
(3) Sacarose (%) ¹	-0,4437	-17,75	0,003159
(4) Ext. Levedura (%)	0,0937	3,75	0,064326
1 by 2 ²	-0,1812	-7,25	0,018499
1 by 3	-0,0437	-1,75	0,222222
1 by 4 ¹	0,2937	11,75	0,007165
2 by 3	-0,0625	-2,50	0,129612
2 by 4 ¹	-0,3625	-14,5	0,004723
3 by 4 ¹	-0,3375	-13,5	0,005442
1*2*3	0,0625	2,50	0,129612
1*2*4	0,0125	0,50	0,666667
1*3*4	0,0875	3,50	0,072827
2*3*4 ¹	-0,2687	-10,75	0,008543
R ² =0,99224; Erro padrão = 0,025; ¹ Coeficiente significativo com 99% de confiabilidade;			
² Coeficientes significativos acima de 95% de confiabilidade.			

Como dito anteriormente, o soro de leite não demonstrou ser uma variável significativa quanto à produção de bacteriocina. Tomás, Bru e Nader-Macías (2010) também evidenciaram que não houve influência significativa da lactose na produção de bacteriocina por *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. Contudo, Iyapparaj et al. (2013) demonstraram que lactose como fonte de carbono suplementar em MRS, proporcionou maior atividade da bacteriocina produzida por *Lactobacillus* sp. MSU3IR em cerca de 26%. Esta divergência provavelmente se deve pelo fato do meio de cultura, contendo soro de leite, não ter a mesma carga nutricional que o meio comercial MRS possui, o qual demonstrou maior zona de inibição (14,4 mm).

Pelo diagrama de Pareto (Figura 4.8) é possível observar as variáveis mais significativas (níveis acima de 95% e $p < 0,05$) quanto à zona de inibição de *S. aureus*. Através do diagrama notou-se que a sacarose, como variável independente, exerceu um efeito negativo ($t = -17,75$) em relação à inibição da cepa bioindicadora, isto é, quanto maior a concentração desse açúcar,

menor será a zona de inibição. Em contrapartida, a vinhaça promoveu efeito oposto ($t = 10,75$), indicando que o aumento da concentração da mesma contribui para produção de bacteriocina.

Figura 4.8. Diagrama de Pareto medindo a influência dos substratos sobre a zona de inibição de *S. aureus*, utilizando planejamento composto central 2^4 . (1) % Soro de leite; (2) % Vinhaça; (3) % Sacarose; (4) % Extrato de levedura. Significância dos efeitos em nível de confiabilidade a 95% são representados pela linha de corte ($p=0,05$).

Como já foi abordado anteriormente, a sacarose em níveis mais baixos de concentração propiciou maior produção de bacteriocina em outro estudo (PENNA et al., 2005), sendo possivelmente a concentração da fonte de carbono um fator limitante para a produção de bacteriocina.

Embora não haja trabalhos reportando o uso específico da vinhaça de uva para a produção de bacteriocinas, este resíduo proporcionou maior inibição (média de 11,7 mm) quando adicionado em concentrações mais elevadas (3% v/v). A vinhaça pode ter atuado como fonte de nitrogênio de baixo custo, devido à alta concentração compostos nitrogenados, em formas inorgânicas e orgânicas presente na vinhaça (DEVESA-REY et al., 2011), o que provavelmente pode ter sido o fator para elevar a produção de bacteriocina. Tomás, Bru e Nader-Macías (2010) ao avaliarem a influência de diferentes fontes de carbono e nitrogênio, identificaram maior produção de bacteriocina por *L. salivarius* (70%), na presença das fontes de nitrogênio.

Ademais, a influência das variáveis independentes e suas interações podem ser positivas ou negativas. Neste modelo baseado na produção de bacteriocina, a maioria das interações

apresentaram interferência negativa com confiabilidade em 99% na distribuição de (t) *Student*, isto é, quanto maior a concentração da variável, menor a atividade da bacteriocina.

Embora a fonte de nitrogênio alternativa não tenha apresentado interferência significativa isoladamente, sua interação com a vinhaça e/ou sacarose interagiu de forma antagonista quanto às zonas de inibição. O aumento da concentração de extrato de levedura provocou uma redução de 13% da atividade antimicrobiana observada quando em conjunto com a maior concentração de vinhaça (3%) ($t = -14,5$). Provavelmente, a concentração de nitrogênio de ambos causou uma inibição por substrato. Por outro lado, em relação à sacarose, onde a concentração mínima (1%) favoreceu a inibição de *S. aureus* (em média 8,4%), e ao interagir com a maior quantidade de extrato de levedura (1,5%), houve aumento de atividade em 7,3% ($t = -13,5$), em relação à menor concentração do mesmo.

Apesar do extrato de levedura ter apresentado interferência negativa quando em interação com a vinhaça e sacarose, seu sinergismo com o soro de leite resultou em influência positiva na produção de bacteriocina ($t = 11,75$). O mesmo efeito foi observado por Cheigh et al. (2002), quando suplementaram o meio M17 com 0,5% de lactose e 3% de extrato de levedura, obtendo 87,5% de aumento de atividade antimicrobiana da bacteriocina produzida por *Lc. lactis* A164.

Figura 4.9. Valores preditos e observados para inibição de *S. aureus*. Erro puro: 0,1636333

Conforme os resultados apresentados na Figura 4.9, notou-se que não houve diferença significativa entre os valores observados e preditos, garantindo a confiabilidade do modelo

quanto às zonas de inibição de *S. aureus* ($R^2 = 0,99224$). A relação empírica entre a zona de inibição (Y) e as variáveis dependentes e independentes para determinação dos valores preditos é dada pela equação a seguir:

$$Y = 11,4125 + 0,2687 \cdot x_2 - 0,4437 \cdot x_3 - 0,1812 \cdot x_1 \cdot x_2 + 0,2937 \cdot x_1 \cdot x_4 - 0,3625 \cdot x_2 \cdot x_4 - 0,3375 \cdot x_3 \cdot x_4 - 0,2687 \cdot x_2 \cdot x_3 \cdot x_4$$

Figura 4.10. Perfis para valores previstos e modelo desejável para otimizar a produção de bacteriocina. As linhas tracejadas indicam os valores de otimização.

A otimização da produção de bacteriocina baseada no planejamento fatorial completo 2^4 com relação a todas as variáveis estudadas, é demonstrada na Figura 4.10. Em particular, a maior zona de inibição seria alcançada com 10% de soro de leite, 3% de vinhaça, 1% de sacarose e 1,5% de extrato de levedura.

Notou-se que a sacarose foi a variável que ofereceu maior interferência na produção de bacteriocina (Figura 4.10). Por outro lado, as demais variáveis exerceram maior influência quando em interação, como já foi explanado anteriormente. É importante frisar que não houve zona de inibição na amostra controle (soro de leite a 10%), contudo, o modelo sugeriu que

suplementasse esta base de soro de leite com as demais variáveis a fim de obter melhores resultados.

A partir da otimização proposta na Figura 4.10 foi realizada a validação do modelo. Para tanto, preparou-se a base de soro de leite suplementada como descrito acima, conforme modelo proposto para obtenção da maior inibição de *S. aureus*. O modelo se revelou confiável, formando zona de inibição de 12,8 mm. Os resultados revelaram que *Lc. lactis* CECT-4434 é capaz de produzir bacteriocina a partir de soro de leite e vinhaça de uva como substratos alternativos e econômicos.

4.3. Biorreator – Influência da oxigenação

O uso do biorreator é fundamental, pois o mesmo assegura o controle de vários parâmetros importantes do processo como temperatura, pH, agitação e aeração, mantendo-os dentro das condições operacionais especificadas. Além destes parâmetros, biorreatores mais sofisticados possibilitam o controle de oxigênio dissolvido (OD), denominado cascata, que mantém uma concentração de OD constante.

A partir da avaliação dos efeitos das variáveis em *shaker*, encontrou-se a melhor condição para maximização da resposta (produção de biossurfactante), composto por 15% (p/v) de soro de leite, 1 % (v/v) de vinhaça de vinho, 2 % (p/v) de sacarose e 0,75 % (p/v) de extrato de levedura. Com base neste resultado, foi realizado o *scale up* do bioprocesso. Para tanto, os experimentos foram conduzidos em biorreator de bancada equipado com controle de OD automático avançado por cascata, que proporciona maior flexibilidade para o desenvolvimento e otimização da estratégia de controle de OD. O controle por cascata também contribui quando altos níveis de oxigênio (O₂) são tóxicos para alguns microrganismos, como é o caso da cepa em questão, *Lc. lactis*, que é anaerobia facultativa (DUWAT et al., 2001).

A Tabela 4.7 demonstra a produção de biomassa em função da oxigenação, conduzido em biorreator. A partir desta, notou-se que o melhor índice de crescimento com diferença estatística significativa foi obtida no cultivo saturado em 100% de O₂, com uma aeração constante de 1,0 vvm. Este resultado é o inverso do que se esperava, visto que segundo Duwat et al. (2001), o oxigênio exerce um efeito negativo tanto no crescimento quanto na sobrevivência do *Lc. lactis*, e conforme Lahtinen et al. (2012), as bactérias ácido-láticas não possuem um sistema respiratório funcional.

Tabela 4.7. Crescimento microbiano (g/L) sob influência de oxigênio dissolvido em biorreator

Tempo (h)	0%	5%	30%	60%	100%
0	0,21 ^a	0,20 ^a	0,20 ^a	0,19 ^a	0,21 ^a
3	1,34 ^d	1,02 ^c	0,69 ^b	1,43 ^e	1,81 ^h
6	1,60 ^f	1,84 ^h	2,09 ⁱ	2,06 ⁱ	2,54 ^m
9	1,66 ^{fg}	2,27 ^k	2,41 ^l	2,20 ^j	2,80 ^{pq}
12	1,72 ^g	2,50 ^m	2,69 ^{no}	2,97 ^r	2,82 ^q
24	2,37 ^l	0,72 ^b	2,63 ⁿ	3,36 ^s	2,74 ^{op}

*Valores médios (n = 3). Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre valores do mesmo parâmetro na mesma tabela (P < 0.05).

No ensaio a 100% de OD, a fase estacionária iniciou em 9h de cultivo, mas a 5, 30 e 60% de O₂ a bactéria teve crescimento lento e reduzido, chegando ao fim da fase exponencial e atingindo concentração similar à obtida com 100% de OD em 12h de experimento. Segundo Joshi et al. (2013), taxas elevadas de aeração e agitação promovem maior crescimento celular e maior formação de espuma em um curto espaço de tempo. Estes autores ao realizarem um estudo em cascata em biorreator para a produção de biossurfactante por *B. licheniformis*, também observaram melhor crescimento no ensaio a 100% de OD, sem controle de cascata que nos outros experimentos conduzidos a 30, 50 e 70%. Ademais, no presente estudo, o crescimento foi decrescente de 60 para 5% de oxigenação, com uma taxa de redução de 3% de biomassa, a cada concentração 10% menor de OD.

O resultado supracitado é aparentemente controverso e a discussão pode se tornar contraditória em relação à influência da oxigenação no crescimento de *Lc. lactis*, uma vez que, segundo Duwat et al. (2001), o oxigênio exerce efeito negativo sobre o crescimento desta bactéria e a aeração prolongada pode levar à morte celular e degradação do DNA. Todavia, os mesmos autores relataram que o oxigênio pode ser benéfico para *Lc. lactis*, desde que exista a presença de uma heme proteína durante o cultivo sob aeração que contribui no consumo de oxigênio por este microrganismo, melhorando seu metabolismo respiratório e provendo aumento do crescimento microbiano. Verificou-se que cerca de 0,5 a 1,0% das proteínas do soro de leite é constituída por uma glicoproteína heme, denominada lactoperoxidase (LPO) (EC 1.11.1.7) (BORZOUEE et al. 2016; FOX; McSWEENEY, 1998; SHARMA et al., 2013). Sendo assim, o fato do crescimento ter sido favorecido com altas taxas de oxigenação, pode estar relacionado com a possível presença de uma glicoproteína heme na composição do soro de leite utilizado no presente estudo, que proveu uma melhoria de seu metabolismo respiratório.

No presente estudo, a cinética de produção de ácido láctico e o pH em função da

concentração de OD em biorreator também foram avaliados. Conforme Tabela 4.8, notou-se que a produção de ácido láctico foi favorecida no cultivo em anaerobiose (0%), com produção em média 97% superior às outras condições avaliadas nas 3 primeiras horas de cultivo. Concomitantemente, verificou-se que o pH em 0% de OD foi reduzido de 6,70 para 4,66 neste mesmo período, sendo que as fermentações sob aeração, levaram o dobro ou triplo do tempo (6 a 9h) para atingir redução semelhante. Fu e Mathews (1999) utilizaram uma bactéria ácido-láctica (*Lactobacillus plantarum*) em cultivo a 37°C, e observaram que em fermentação anaeróbia a produção de ácido láctico foi cerca de 2,3 vezes superior que sob aeração.

Tabela 4.8. Concentração de ácido láctico (g/L) e determinação do pH em função de OD.

	Tempo (h)	0%	5%	30%	60%	100%
Ácido láctico (g/L)	0	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
	3	2,44 ^{gh}	1,07 ^c	0,94 ^b	1,83 ^e	1,47 ^d
	6	3,20 ^m	2,38 ^h	1,95 ^f	2,67 ⁱ	2,37 ^g
	9	3,44 ^{no}	2,97 ^l	2,60 ⁱ	3,25 ^m	2,89 ^k
	12	3,50 ^o	3,14 ^m	2,76 ^j	3,43 ⁿ	2,99 ^l
	24	3,63 ^p	3,19 ^m	2,77 ^j	3,44 ⁿ	3,04 ^l
pH	0	6,70 ^p	6,60 ^p	6,58 ^o	6,55 ^o	6,58 ^o
	3	4,66 ^{hi}	5,41 ⁿ	5,35 ⁿ	5,16 ^l	5,26 ^m
	6	4,69 ^{hi}	4,66 ^{hi}	4,80 ^j	4,71 ⁱ	5,03 ^k
	9	4,47 ^{bcd}	4,57 ^g	4,58 ^g	4,59 ^{gh}	4,83 ^j
	12	4,43 ^{abc}	4,54 ^{efg}	4,56 ^{fg}	4,52 ^{defg}	4,85 ^j
	24	4,40 ^{ab}	4,38 ^a	4,45 ^{abcd}	4,49 ^{cdef}	4,66 ^{hi}

*Valores médios (n = 3). Letras diferentes significam diferença estatisticamente significativa entre valores do mesmo parâmetro na mesma tabela (P < 0.05).

Quanto à produção de ácido láctico evidenciou-se que no ensaio com 30% de OD houve menor síntese do mesmo e, com 60%, a produção deste foi superior em aproximadamente 8 e 13%, à obtida em 5 e 100%. Já em anaerobiose, o aumento foi cerca de 6% maior que no ensaio a 60% de OD neste mesmo período. Estudos revelam que sob condições anaeróbias, o metabolismo fermentativo de *Lc. lactis* promove a transformação de vários carboidratos em ácido láctico. Em contrapartida, em aerobiose, a produção de ácido láctico é reduzida, pois a via glicolítica é deslocada para uma fermentação mista, com produção de outros metabólitos como ácido acético, ácido fórmico, CO₂, entre outros (DUWAT et al., 2001; JENSEN et al., 2001; MIYOSHI et al., 2003). Em relação ao pH é visível uma redução em função da aeração, analisando a partir do cultivo com maior OD (100%) para 0%, em anaerobiose, sendo

praticamente oposto do observado em relação ao crescimento microbiano. Este fato pode ser explicado devido à presença de oxigênio, na qual os microrganismos tendem a realizar a respiração celular ou invés de fermentar, produzindo ácidos, porém, sendo a *Lc. lactis* um microrganismo anaeróbico facultativo, na presença de oxigênio irá fermentar e respirar simultaneamente (CAMPBELL; REECE, 2005), porém, quanto menor a quantidade de oxigênio dissolvido, maior a fermentação e produção de ácidos.

Em vista destas mudanças ocasionadas pela oxigenação, evidencia-se o fato de estudar a influência da concentração de OD para a produção de biossurfactante, principal metabólito estudado no presente trabalho. Desde 1990, Sheppard e Cooper já haviam reportado que a oxigenação é um dos parâmetros mais importantes para o processo de otimização e *scale up* da produção de biossurfactante em biorreator. Em 2017, Domingues et al. reforçaram esta afirmação, revelando que o oxigênio disponível pode influenciar não só a produção do biossurfactante, mas também o rendimento e composição do mesmo, e ainda evidenciaram que a oxigenação tem elevado impacto na eficiência do processo, bem como na quantidade e qualidade do biossurfactante produzido sendo um parâmetro crítico na produção deste.

Do ponto de vista de redução de tensão superficial (TSred), resultados similares foram observados para 5, 30 e 60% de OD, evidenciando maior redução (TSred em média de 16,9 mN/m) que os demais ensaios, nas 3 primeiras horas de cultivo (Figura 4.11). Sendo a condição que proporcionou melhor crescimento, com 100% de OD a produção de biossurfactante foi a menor de todos os experimentos, com redução da TS atingindo apenas 9,1 mN/m com 3h de cultivo, confirmando o que foi observado nos estudos realizados em *shaker*, onde verificou-se que uma maior quantidade de biomassa não determina maior produção de biossurfactante.

Figura 4.11. Redução de tensão superficial (TSred) sob influência da oxigenação, sendo: 0% (anaerobiose) (○), 5% (◇), 30% (■), 60% (▲) e 100 (◆) de OD

O oxigênio dissolvido é um dos fatores que mais influencia a produção de biossurfactantes (DESAI; BANAT, 1997; CHEN; JUANG; WEI, 2015). Sabe-se que bactérias aeróbias necessitam de boa oxigenação para seu crescimento e produção destes compostos. Este é o caso do *Bacillus licheniformis* R2, que apresentou melhor crescimento e produção de biossurfactante em termos de TS (28 mN/m) no cultivo conduzido a 100% de saturação de OD, sem posterior controle, seguido por 70, 50 e 30% de OD em um estudado realizado Joshi et al. (2013) e um dos poucos trabalhos relatando o uso do controle de cascata para a produção de biossurfactante. Contudo, para outras bactérias, a concentração de OD no meio de cultivo e o fornecimento excessivo do mesmo apontam ser desfavoráveis para a produção de biossurfactantes (LIN et al., 1994). Até mesmo para uma bactéria aeróbia como o *Bacillus subtilis*, que produziu maior concentração de biossurfactante com 30% de OD (4,92 g/L), sendo superior a níveis tanto inferiores de OD (10 e 20%) como superiores (40 e 60%), mesmo o crescimento celular tendo sido cerca de 44% mais elevado nesta última concentração de OD (GHRIBI; CHAABOUNI, 2011).

Em um estudo recente, Domingues et al. (2017) relataram que quase todo o conhecimento adquirido sobre a produção de biossurfactantes é limitado condições aeróbias, entretanto, já se sabe que algumas bactérias podem produzir biossurfactantes sob condições limitantes de oxigênio como do gênero *Anaerophaga*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* e *Thermoanaerobacter*. Segundo a revisão realizada por estes autores, apenas poucas bactérias estão descritas na literatura com habilidade em produzir biossurfactantes sob condições anaeróbias (0%) e principalmente microaróbias (1-30% de OD).

Quanto às bactérias ácido-láticas, geralmente os cultivos em biorreator são conduzidos em anaerobiose, como é o caso da *Lc. lactis* 53 e *Streptococcus thermophilus* A (RODRIGUES; TEIXEIRA; OLIVERIA, 2006) e do *Lactobacillus helveticus* (SHARMA et al., 2014). Em seu estudo, utilizando *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* A20, Gudiña, Teixeira e Rodrigues (2011) reportaram que sob aeração de 20% de OD houve menor produção de biossurfactante, em se tratando de redução da TS (18,9 mN/m) quando comparado aos ensaios em anaerobiose (22,5 mN/m).

Apenas pela TSred não é possível ter uma noção clara da produção de biossurfactante, isto porque a partir da concentração micelar crítica (CMC), mesmo que houver mais do produto em questão, não haverá mais redução da TS, fazendo-se necessário diluir a amostra a fim de melhor determinar sua concentração (PORTILLA-RIVERA et al., 2007). Tratando-se da concentração de biossurfactante ([BS], Figura 4.12), equivalente em surfactina, os resultados foram mais evidentes.

Figura 4.12. Concentração de Biossurfactante sob influência da concentração de oxigênio dissolvido, sendo: 0% (anaerobiose) (○), 5% (◇), 30% (■), 60% (▲) e 100 (◆) de OD

Quando observamos a Figura 4.11, contendo os resultados para TSred, não foi possível diferenciar qual foi a melhor condição para a produção de biossurfactante, dentre 5, 30 e 60% de OD. Por outro lado, a Figura 4.12 mostrou que a microaeração em 5 e 30% proporcionou melhor resultado. Em particular, com 5% de OD a produção de biossurfactante atingiu o máximo da [BS] obtida em todo ensaio após 9h de cultivo em biorreator (11,6 mg/L). Após este tempo de cultivo, houve um decréscimo da produção de biossurfactante de aproximadamente 66%. Isto demonstra que a produção ocorreu na fase exponencial de crescimento celular, e, que o pH abaixo de 4,5 pode ter reduzido o metabolismo da bactéria, devido à acidez do meio. Da mesma maneira, Kim et al. (1997) observaram que a produção de biossurfactante começou no início da fase exponencial e então declinou durante a fase estacionária.

Kim et al. (1997) também demonstraram que sob condições limitantes de oxigênio a produção de biossurfactante foi três vezes maior que sob concentração ideal de oxigênio para o crescimento do microrganismo estudado. Sendo que no presente trabalho, comparando 100% de OD que demonstrou melhor crescimento, a produção foi 24 vezes menor que no cultivo conduzido a 5% de OD. Confirmando o que foi observado, Jensen et al. (2001) relataram que quantidades diminutas de oxigênio tem um efeito grave sobre o perfil produto final resultante. É possível que a produção de biossurfactante reduza sob condições aeróbias, uma vez que há maior disponibilidade de energia e pode ser de preferência utilizada no metabolismo vital da bactéria ao invés da produção desta biomolécula. Já sob microaerofilia, para bactérias que produzem maiores quantidades de biossurfactante sob condições limitantes de oxigênio, Domingues et al. (2017) relataram que, provavelmente, as vias não essenciais para o desenvolvimento da bactéria, possam ter sido redirecionadas para a produção de

biossurfactante.

A ausência de oxigênio pode afetar diretamente o metabolismo envolvido na produção do biossurfactante, entretanto, a mesma não é diretamente dependente do oxigênio (DOMINGUES et al., 2017). Para estes autores, supõe-se que a preferência por substrato seja alterada, sob condições anaeróbias devido ao potencial redox das reações bioquímicas, e dessa forma, pode conduzir a alterações das vias metabólicas envolvidas na produção de biossurfactante sob uso de diferentes receptores de elétrons.

A partir dessa afirmação, identifica-se que é necessária uma concentração limitante de oxigênio para haver maior produção de biossurfactante por *Lc. lactis*, visto que a ausência do mesmo reduziu drasticamente a concentração desta biomolécula. Pode-se dizer, com base no que foi discutido anteriormente, que em anaerobiose o metabolismo da *Lc. lactis* foi direcionado para a produção de ácido lático, enquanto na presença de oxigênio, o mesmo foi deslocado para a produção de outros metabólitos, como é o caso do biossurfactante.

Nos estudos em *shaker* (item 4.2.1) foi possível observar que o aumento da concentração de soro de leite contribuiu para a produção de biossurfactante. Em vista deste resultado, avaliamos a cinética de consumo de lactose (Tabela 4.9), a fim de verificar se a oxigenação iria interferir na obtenção do mesmo pelo microrganismo estudado para a produção de biossurfactante.

Tabela 4.9 Consumo de lactose (g/L) sob influência do oxigênio dissolvido

Tempo (h)	0%	5%	30%	60%	100%
0	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
3	5,52 ^c	11,36 ^s	8,25 ^l	5,75 ^d	6,19 ^f
6	5,88 ^e	9,70 ^r	8,58 ^m	6,32 ^{gh}	6,57 ^j
9	5,71 ^d	9,00 ⁿ	9,08 ^o	6,49 ⁱ	6,67 ^k
12	6,30 ^g	9,38 ^p	9,71 ^r	6,66 ^k	6,38 ^h
24	5,92 ^e	9,62 ^q	8,96 ⁿ	5,04 ^b	5,55 ^c

Observou-se que o consumo de lactose está diretamente ligado à produção de biossurfactante (Tabela 4.9). Com 5% de OD, onde houve maior produção de biossurfactante (11,6 mg/L) conforme observado na Figura 4.12, verificou-se maior uso deste carboidrato, atingindo 11,36 g/L de consumo de lactose, sendo superior em mais de 40% que as demais condições, exceto com 30% de OD, que foi menor em apenas 14%. Estes resultados estão em conformidade com a [BS] obtida, demonstrando que os ensaios sob microaerofilia (5 e 30%)

proporcionaram maior uso da lactose como substrato para a produção de biossurfactante, e as condições onde houve menor produção (0% e 100%), apresentaram menor consumo do carboidrato em questão.

Observou-se também que após o consumo máximo de lactose com 5% de OD em 3h de cultivo, houve decréscimo do mesmo, provavelmente o pH ter influenciado este resultado, uma vez que houve redução deste de 6,60 para 4,66 em 6h de cultivo, reduzindo o metabolismo da *Lc. lactis*. Segundo Gudiña, Teixeira e Oliveira (2011), o controle de pH no ponto ótimo pode favorecer o consumo da lactose, promovendo rápida depleção e contribuindo para maior crescimento e produção de biossurfactante. Em um trabalho realizado por Dyrset et al. (1998), verificando a influência do pH no consumo de lactose por bactérias ácido-láticas, notou-se que em baixo valor de pH (4,2), o consumo de lactose sofreu redução principalmente em relação às cepas de *Lc. lactis*. Fu e Mathews (1999) também observaram que por causa do ambiente altamente ácido, o consumo de lactose foi muito lento. De fato, a produção de ácido láctico aumentou de 1,07 para 2,38 g/L, e o pH caiu de 5,41 para 4,66 entre 3 e 6h de cultivo em 5% de OD, afetando assim o consumo de lactose. Contudo este comportamento não interferiu na produção de biossurfactante, visto que com 100% de OD o aumento de ácido láctico foi similar ao de 5%, entretanto foi a condição que menos impulsionou a produção de biossurfactante.

Até o momento, pouco se sabe sobre a produção de biossurfactantes sob condições microaerofílicas e anaeróbias (DOMINGUS et al., 2017), sendo a maioria limitada aos microrganismos produtores mais comuns de biossurfactante (*Bacillus* e *Pseudomonas*). Muito menos se conhece a respeito do uso de soro de leite como substrato em cultivos fermentativos conduzidos em anaerobiose e aerobiose (FU; MATHEWS, 1999) e em microaerofilia. Destaca-se que nenhum estudo da influência do oxigênio dissolvido, principalmente em microaerofilia, para a produção de biossurfactante por bactérias láticas já havia sido realizado.

4.4. Determinação da Concentração Micelar Crítica (CMC)

Após a semi-purificação do biossurfactante produzido, o liofilizado foi ressuspendido em água para análise de sua Concentração Micelar Crítica (CMC), a fim de saber qual a faixa de concentrações a serem utilizadas nos experimentos seguintes.

Na Figura 4.13 é possível notar que ao reduzir a concentração de BS pela metade (de 100 para 50 mg/mL), a tensão superficial não sofreu alteração, mantendo-se em 49,2 mN/m. Por outro lado, de 50 para 25 mg/mL, já começou a ter aumento da tensão superficial,

demonstrando que havia passado o valor da CMC. Contudo, através do ponto de intersecção entre a reta que permaneceu constante e a reta ascendente, é possível determinar que a concentração exata da CMC para o biossurfactante produzido foi de 30 mN/m.

Figura 4.13. Concentração micelar crítica do biossurfactante produzido por *Lc. lactis* CECT-4434

Estirpes de *Bacillus*, principalmente *B. subtilis* que produz a surfactina, e de *Pseudomonas*, que produzem rhamnolipídeos, são os microrganismos mais estudados quanto à produção de biossurfactante. A surfactina é um dos biossurfactantes mais eficientes que se tem conhecimento, onde sua CMC é de 0,10 g/L, reduzindo a tensão superficial da água de 71,3 mN/m para 28,3 mN/m (Kim et al., 1997). Em contrapartida, *Pseudomonas aeruginosa* LBI, demonstrou uma CMC de 51,6 mg/L (Piróllo et al. 2008). De acordo com Lang e Wagner (1987), a CMC dos biossurfactantes extracelulares varia de 1 a 200 mg/L.

Os biossurfactantes aderidos à membrana, como é o caso do biossurfactante em questão, possuem menor eficiência que os externos. Com CMC variável entre 1,0 a 20 mg/mL (GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2010). Os mesmos autores relataram a TS mínima obtida para *Lactobacillus paracasei* (41,8 mN/m) foi obtida com 50 mg/mL de biossurfactante. Conforme a Figura 4.13, o biossurfactante produzido por *Lc. lactis* CECT-4434, apresentou CMC de 30 mg/mL, ficando abaixo dos poucos trabalhos na literatura que descrevem a CMC obtida para bactérias ácido-láticas (GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2010; RODRÍGUEZ et al, 2010; RODRIGUÉZ-PAZO et al, 2013; SHARMA; SAHARAN, 2016).

4.5. Avaliação das propriedades do biossurfactante

4.5.1. Estabilidade do biossurfactante em condições extremas de pH e temperatura

Biossurfactantes são conhecidos por sua capacidade de se manter estáveis mesmo sob condições extremas de pH e temperatura (CAMEOTRA et al., 2010; CHEN; JUANG; WEI, 2015), sendo esta uma vantagem sobre os surfactantes químicos. O emprego dos biossurfactantes em diversos campos depende desta estabilidade (GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2010).

A avaliação desta propriedade é feita por meio da tensão superficial (TS), verificando se a mesma sofre alguma alteração em razão da variação de pH ou temperatura após 24 de incubação, com TS no tempo 0 de 53,7 mN/m. Sendo assim, utilizou-se uma concentração acima da CMC (50 mg/mL) do biossurfactante produzido por *Lc. lactis* CECT-4434, a fim de avaliar estas propriedades, visto que a literatura utiliza esta concentração para estas análises (KHOPADE et al., 2012; GUDIÑA; TEIXEIRA; RODRIGUES, 2010).

Quanto à capacidade frente a pH extremos, apresentada na Figura 4.14, observou-se que a TS do biossurfactante em questão permaneceu entre 51,0 e 55,2 mN/m, com variação de pH entre 2 e 12. Analisando a mesma concentração de biossurfactante produzido por *Lactobacillus paracasei* frente à estabilidade em pH de 4 a 10, Gudiña, Teixeira e Oliveira (2010) também obtiveram maior estabilidade em pH alcalino do que em condições ácidas, com variação semelhante em cerca de 5 mN/m. Da mesma forma, o biossurfactante do tipo lipopeptídeo produzido por *Streptomyces* sp. se manteve estável apenas em meio alcalino, com pH entre 8-12 (KHOPADE et al., 2012).

Manivasagan et al. (2014) ao estudarem outra espécie de *Streptomyces* sp., que produz biossurfactante do tipo glicolipídeo, observaram estabilidade em valores de pH de 5 a 9. Em se tratando do lipopeptídeo produzido por um dos microrganismos mais estudados quando se trata de biossurfactantes (*Bacillus subtilis*), Bezza e Chirwa (2015) obtiveram estabilidade do mesmo em pH de 5 a 12, sendo que abaixo de pH 5 houve um aumento substancial da TS (cerca de 34%), demonstrando perda de estabilidade em pH mais ácido, fato que não ocorreu com o biossurfactante obtido no presente estudo.

Figura 4.14. Efeito do pH sobre o biossurfactante produzido por *Lc. lactis* CECT-4434

Similarmente, os biossurfactantes produzidos por *P. aeruginosa*, *B. subtilis* e *Rhodococcus erythropolis* se revelaram estáveis na mesma variação de pH (5-12), evidenciando-se que quando houve decréscimo do pH abaixo de 5, houve aumento da tensão superficial, perdendo a estabilidade devido à uma possível precipitação ácida do biossurfactante (XIA et al., 2011). No presente estudo, o biossurfactante produzido por *Lc. lactis* demonstrou certa redução da TS em pH ácido.

No que diz respeito à influência da temperatura na estabilidade do biossurfactante, notou-se que houve pouca oscilação da TS (menor que 2 mN/m) mesmo variando a temperatura de 4 para 80°C e após 24h de incubação (Figura 4.15). Avaliou-se também se a temperatura de 100°C por 30 min afetaria a TS, e a mesma permaneceu em 55,3 mN/m. Esta observação mostra o quão estável é o biossurfactante produzido pela bactéria ácido-lática estudada no presente trabalho.

Figura 4.15. Efeito da temperatura sobre o biossurfactante produzido por *Lc. lactis* CECT-4434

Khopade et al. (2012) também reportaram que aquecendo o biossurfactante em 100°C por 30 min, não houve efeito significativo sobre a performance do mesmo, em relação ao biossurfactante do tipo lipopeptídeo produzido por *Streptomyces* sp. B3. Entretanto, biossurfactante do tipo glicolipídeo produzido por outra espécie de *Streptomyces* sp. demonstrou baixa estabilidade em altas temperaturas, sustentando-se apenas entre 30 a 50°C (MANIVASAGAN et al., 2014). Já o biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* permaneceu constante mesmo sob 125°C (BEZZA E CHIRWA, 2015), mostrando que o mesmo é de caráter externo e não aderido à célula como o estudado no presente estudo, contudo, apresenta semelhante estabilidade.

Estes resultados demonstram que o biossurfactante produzido no presente trabalho se mostrou altamente estável tanto em valores de pH quanto em temperaturas extremos, podendo ser aplicado em diversas finalidades industriais e ambientais, como na solubilização de compostos na indústria de cosméticos, e na penetração, amaciamento e solubilização de componentes para tingimento nas indústrias têxteis como sugeriram Dhanarajan e Sen (2014). Conforme Gudiña et al. (2013), microemulsões de biossurfactante que demonstrem estabilidade em temperaturas acima de 40°C, os torna adequados para aplicações cosméticas e farmacêuticas.

4.5.2. Capacidade antimicrobiana do biossurfactante

A capacidade antimicrobiana do biossurfactante sintetizado por *Lc. lactis* CECT-4434 foi avaliada utilizando os microrganismos indicadores *Staphylococcus aureus* ATCC 10390, *S. aureus* CECT-239, *Listeria monocytogenes* NADC 2045, *L. monocytogenes* CECT-934, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella enterica* CECT-724.

Tanto os surfactantes químicos quanto os biossurfactantes são potencialmente tóxicos para alguns microrganismos, abrindo um campo a ser explorado como agentes antimicrobianos contra patógenos microbianos, vegetais e humanos (SINGH; HAMME; WARD, 2007).

A partir da Tabela 4.10 nota-se que apenas a cepa espanhola *S. aureus* CECT-239, não sofreu inibição pelo biossurfactante produzido por *Lc. lactis*. As demais indicadoras apresentaram inibição em diferentes concentrações de biossurfactante.

Segundo a Anvisa (2007), *Staphylococcus aureus* é um microrganismo Gram-positivo e está associado a infecções hospitalares, sendo classificado como um patógeno humano oportunista. As duas cepas de *S. aureus* analisadas (ATCC e CECT) são categorizadas como

risco 2 em biossegurança. Conforme Tabela 4.10, o biossurfactante produzido por *Lc. lactis* foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* ATCC 10390 (A) em mais de 90% a partir de 1,6 mg/mL, enquanto o da cepa espanhola CECT-239 (B) propiciou o crescimento do microrganismo bioindicador em nível considerável com 12,5 mg/mL.

S. aureus é uma das cepas mais utilizadas para avaliação da capacidade antimicrobiana de biossurfactantes. Gudiña et al (2010) revelaram que o biossurfactante sintetizado por *Lactobacillus paracasei* spp. *paracasei* A20 inibiu o crescimento de *S. aureus* em mais de 90% a partir de 25 mg/mL, abaixo do observado no presente estudo. Já o biossurfactante produzido por *Lc. lactis* 53 e *Streptococcus thermophilus* A somente inibiram de forma significativa com 50 mg/mL e 100 mg/mL, respectivamente (RODRIGUES et al. 2004). Sambanthamoorthy et al. (2014) observaram que o biossurfactante de *Lactobacillus jensenii* e de *L. rhamnosus* mostrou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* com 25 a 50 mg/mL. Diante destes dados verifica-se a eficácia do biossurfactante de *Lc. lactis* em estudo sobre a *S. aureus* ATCC 10390 com apenas 1,6 mg/mL.

Tabela 4.10. Atividade antimicrobiana do biossurfactante produzido por *Lc. lactis* CECT-4434. Cepas indicadoras: (A) *S. aureus* ATCC 10390; (B) *S. aureus* CECT-239; (C) *L. monocytogenes* NADC 2045; (D) *L. monocytogenes* CECT-934; (E) *E. coli* ATCC 25922; (F) *S. enterica* CECT-724. Inibição: (+) até 50%; (++) acima de 50%; (+++) acima de 90%; propiciou crescimento: (-) até 50%; (- -) acima de 50%; (- - -) acima de 90%.

[BS] (mg/mL)	A	B	C	D	E	F
100	+	---	+++	++	+++	+++
50	+	---	+++	++	+++	+++
25	+	---	+++	++	-	+++
12,5	+	---	+++	++	--	+++
6,2	+	-	+++	+	--	+++
3,1	+	-	+++	+	--	+++
1,6	+	-	+++	-	--	+++
0,8	-	-	+++	-	--	+++
0,4	-	-	+++	-	--	+++
0,2	-	-	+++	-	--	+++

No caso da *Listeria monocytogenes*, as cepas testadas também apresentaram divergências quanto à eficácia do biossurfactante. A *L. monocytogenes* NADC 2045 (C), proveniente do Centro Nacional de Doenças Animais sofreu inibição desde a concentração mais baixa avaliada (0,2 mg/mL), enquanto a cepa espanhola CECT-934 (D), conhecida por seu grau

de risco 2, teve início de inibição com 3,1 mg/mL, não superando 90% de ação antimicrobiana mesmo com 100 mg/mL, demonstrando certa resistência.

L. monocytogenes é um patógeno gram-positivo de origem alimentar, muitas vezes encontrados em leite e produtos lácteos (BORGES et al, 2009). Em 2001, a Resolução-RDC nº 12 de Anvisa, determinou que a concentração deste microrganismo, bem como da *Salmonella* spp. deve ser ausente em 25g de amostra, evidenciando a importância em se avaliar a inibição desta espécie pelo biossurfactante produzido.

Sharma e Saharan (2016) demonstraram que a *L. monocytogenes* foi inibida em quase 100% com 25 mg/mL de biossurfactante produzido por *Lactobacillus helveticus* MRTL91. Em contrapartida, um biossurfactante externo do tipo rhamnolípido, produzido por *Pseudomonas*, largamente estudado devido à sua alta eficiência em redução da tensão superficial, apresentou concentração mínima inibitória de 0,15 mg/mL contra *L. monocytogenes* 12, e de 2,5 mg/mL contra *L. monocytogenes* 17 (MAGALHÃES; NITSCHKE, 2013). Ressalta-se neste ponto que o biossurfactante de *Lc. lactis* não possui a mesma capacidade de redução da TS como o rhamnolípido, entretanto o mesmo inibiu de forma satisfatória esta cepa indicadora.

Outro microrganismo avaliado foi a *E. coli*, normalmente caracterizado como microrganismo que coloniza intestinos de pessoas e animais. Sendo algumas cepas patogênicas, estando associadas com diarreia, e referidas como diarreogênicas (CDC, 2015). Em relação a esta cepa indicadora Gram-negativa, ATCC 25922 (E), a inibição somente ocorreu acima de 50 mg/mL. O mesmo foi observado por Sambanthamoorthy et al. (2014) utilizando o biossurfactante sintetizado por *Lactobacillus jensenii*. Apesar de ser menos suscetível ao biossurfactante em questão, este resultado ainda é superior ao obtido por Gomaa (2013b), que estudou a capacidade antimicrobiana de biossurfactantes produzidos por diversos *Lactobacillus* e não obteve inibição em nenhum dos casos. O mesmo resultado negativo foi obtido por Machado et al. (2013) utilizando um biossurfactante produzido por *Lc. lactis*. Entretanto, Gudiña et al. (2010) obtiveram inibição de *E. coli* com 12,5 mg/ml do biossurfactante produzido por *L. paracasei*.

Uma segunda cepa indicadora Gram-negativa, a *Salmonella enterica* CECT-724 (F), de risco 2, também foi avaliada. De acordo com o PHAC (Public Health Agency of Canada, 2010), existem seis subespécies de *Salmonella* e, todas elas podem infectar humanos. A infecção geralmente ocorre através do consumo de alimentos e água contaminados. Sabe-se que o alimento com maior risco de contaminação é o ovo. Conforme o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, 2017), ovos aparentemente normais podem conter *Salmonella*, infectando a pessoa que o ingerir, especialmente se comê-los crus ou levemente cozidos. Como

já foi mencionado anteriormente, a Anvisa (2001) regulamentou que a *Salmonella* deve estar ausente em amostras analisadas na indústria alimentícia.

No presente estudo, a inibição de *Salmonella* se deu com apenas 0,2 mg/mL de biossurfactante, demonstrando sua eficiência contra esta cepa Gram-negativa. Resultado não obtido por Gomaa (2013b) com diversos *Lactobacillus* testados nem por Machado et al. (2013) com *Lc. lactis*, exibindo inibição zero mesmo com 10 mg/mL de biossurfactante. Com 25 mg/mL de biossurfactante produzido por *L. helveticus*, Sharma e Saharan (2016) obtiveram menos de 80% de inibição de *Salmonella*.

Em suma, o biossurfactante produzido por *Lc. lactis* demonstrou potencial antimicrobiano em todas as cepas testadas tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas, exceto a *S. aureus* CECT-239 (B), em que o mesmo promoveu o crescimento deste microrganismo, provavelmente por ter utilizado o biossurfactante como substrato. Todavia, as inibições obtidas foram, em geral, superiores às proporcionadas por biossurfactantes de bactérias ácido-láticas encontrados na literatura.

4.5.3. Inibição da adesão de microrganismos patogênicos a superfícies sólidas ao utilizar biossurfactante

Biofilmes podem ser até 1.000 vezes mais resistentes a antibióticos que as mesmas bactérias formadoras destes em estado planctônico, isto é, em suspensão (GOMAA, 2013b). Araújo, Freire e Nitschke (2013) descreveram a contaminação microbiana de materiais e que a inibição e/ou diminuição da formação de biofilmes podem ser notavelmente reduzidas a partir do pré-condicionamento de superfícies com biossurfactante. Em vista disto, o estudo da atividade antiadesiva dos biossurfactantes tem ganhado campo nos últimos anos (GOMAA, 2013b; GUDIÑA et al., 2010; MEYLHEUC et al., 2006; SHARMA; SAHARAN, 2016).

Na Tabela 4.11 verificou-se que todos os microrganismos avaliados neste estudo sofreram redução ou inibição da adesão à superfície sólida da placa de poliestireno, mesmo sob baixa concentração de biossurfactante. Evidencia-se também que os resultados de sua atividade antiadesiva não estão totalmente relacionados aos obtidos na análise antimicrobiana. Neste ponto observa-se que a *S. aureus* 10390 (A), que foi inibida em mais de 90% com apenas 1,6 mg/mL de biossurfactante no ensaio de atividade antimicrobiana, apresentou menor capacidade antiadesiva, com redução da adesão desta cepa em menos de 50%, não sendo tão considerável quanto as outras indicadoras. Já em relação a *L. monocytogenes* NADC 2045 (C) e a *S. enterica*

CECT-724 (F), ambas as propriedades do biossurfactante inibiram o crescimento e a adesão destes microrganismos em mais de 90%.

Avaliando a atividade antiadesiva de diversos *Lactobacillus*, Gomaa (2013b) obteve máximo 60% e mínimo de 12% de redução da adesão de *S. aureus* com os biossurfactantes testados. No presente trabalho, a cepa ATCC 10390 apresentou menos de 50% de redução, enquanto a adesão da CECT-239 foi reduzida em mais de 50% a partir de 3,1 mg/mL, atingindo 88% de redução a 100 mg/mL. Já o biossurfactante produzido por *L. paracasei* iniciou a redução em mais de 50% com 6,2 mg/mL, atingindo redução de 76,8% com 50 mg/mL do mesmo (GUDIÑA et al., 2010). Rodrigues et al. (2004) demonstrou que 5 mg/mL do biossurfactante de *Lc. lactis* 53 foi capaz de inibir a adesão de *S. aureus*, em borracha de silicone de aplicação biomédica, em cerca de 90%.

Em relação à *L. monocytogenes*, tanto a NADC 2045 (C) quanto a CECT-934 (D) sofreram redução da adesão, porém a cepa espanhola (CECT-934) foi a mais resistente, sendo reduzida em mais de 90% apenas com 12,5 mg/mL, enquanto a outra foi inibida logo com a menor concentração avaliada (0,2 mg/mL). Já o biossurfactante produzido por *L. helveticus* não chegou a atingir 90% de redução com 25 mg/mL (SHARMA; SAHARAN, 2016). Todavia, o biossurfactante produzido por *L. helveticus* 1181 promoveu redução em mais de 90% sobre todas as 4 cepas de *L. monocytogenes* avaliadas (MEYLHEUC et al., 2006).

Tabela 4.11. Atividade antiadesiva do biossurfactante produzido por *Lc. lactis* CECT-4434. Cepas indicadoras: (A) *S. aureus* ATCC 10390; (B) *S. aureus* CECT-239; (C) *L. monocytogenes* NADC 2045; (D) *L. monocytogenes* CECT-934; (E) *E. coli* ATCC 25922; (F) *S. enterica* CECT-724. Redução de adesão: (+) até 50%; (++) acima de 50%; (+++) acima de 90%.

[BS] (mg/mL)	A	B	C	D	E	F
100	+	++	+++	+++	++	+++
50	+	++	+++	+++	++	+++
25	+	++	+++	+++	++	+++
12,5	+	++	+++	+++	++	+++
6,2	+	++	+++	++	++	+++
3,1	+	++	+++	++	++	+++
1,6	+	+	+++	++	++	+++
0,8	+	+	+++	++	++	+++
0,4	+	+	+++	++	++	+++
0,2	+	+	+++	++	++	++

Quanto às cepas Gram-negativas, a *E. coli* (E) foi a que menos sofreu a ação do biossurfactante, apresentando atividade antiadesiva acima de 50%, enquanto a adesão *Salmonella enterica* (F) foi reduzida em mais de 90% a partir de apenas 0,4 mg/mL de biossurfactante. Estes resultados demonstram maior eficiência do biossurfactante analisado, uma vez que Gudiña et al. (2010) mesmo com 50 mg/mL de biossurfactante produzido por *L. paracasei*, conseguiram redução de apenas 11,8% contra *E. coli*. Gomaa (2013b) também não obteve resultado significativo na redução da adesão de *Salmonella* pelos biossurfactantes produzidos por diversos *Lactobacillus*. Já Sharma e Saharam obtiveram diminuição da adesão em menos de 60% tanto para *E. coli* quanto para *Salmonella*, ambos com 25 mg/mL de biossurfactante produzido por *L. helveticus*.

No que se refere à capacidade antiadesiva do biossurfactante de *Lc. lactis*, pode-se dizer que o mesmo é eficiente na redução da adesão de microrganismos patogênicos, mesmo de risco 2 em biossegurança, conforme observado no presente estudo.

4.5.4. Remoção de microrganismos patogênicos aderidos em superfície sólida através de limpeza com biossurfactante

Devido à formação de biofilmes em indústria alimentícia por microrganismos patogênicos, o desenvolvimento de novos produtos tem sido constante a fim de melhorar a eficiência de limpeza das superfícies que entram em contato com o alimento durante o processamento (ARAÚJO; FREIRE; NITSCHKE, 2013).

Em vista deste problema, foi verificada neste trabalho a eficácia do biossurfactante não só pela atividade antimicrobiana e antiadesiva, mas inclusive, na remoção dos mesmos microrganismos avaliados anteriormente, estando já aderidos à superfície. Destaca-se que este estudo não foi realizado em nenhum trabalho verificado na literatura, sendo uma inovação neste quesito. Em particular, a Tabela 4.12 mostrou que todas as cepas indicadoras sofreram redução da quantidade de microrganismos em relação ao poço onde foi lavado apenas com PBS, utilizado como parâmetro.

Tabela 4.12. Capacidade de remoção de microrganismos por limpeza com biossurfactante produzido por *Lc. lactis* CECT-4434. Cepas indicadoras: (A) *S. aureus* ATCC 10390; (B) *S. aureus* CECT-239; (C) *L. monocytogenes* NADC 2045; (D) *L. monocytogenes* CECT-934; (E) *E. coli* ATCC 25922; (F) *S. enterica* CECT-724. Remoção: (+) até 50%; (++) acima de 50%; (+++) acima de 90%.

[BS] (mg/mL)	A	B	C	D	E	F
100	+	+	+	+	+++	+
50	+	+	+	+	+++	+
25	+	+	+	+	+++	+
12,5	+	+	+	+	+++	+
6,2	+	+	+	+	+++	++
3,1	+	+	+	+	+++	++
1,6	+	+	+	+	+++	++
0,8	+	+	+	+	+++	++
0,4	+	+	+	+	+++	++
0,2	+	+	+	+	+++	++

A ação do biossurfactante em remover os microrganismos aderidos foi mais evidente em relação a *E. coli* (E), uma vez que esta foi inibida em mais de 90% mesmo com 0,2 mg/mL de biossurfactante. Este resultado é interessante, uma vez que este foi um dos microrganismos mais resistentes quanto às atividades antimicrobiana e antiadesiva. Em contrapartida, a *L. monocytogenes* NADC 2045, que sofreu maior inibição nos experimentos anteriores, demonstrou índice de redução menor que 50% das células aderidas quando submetido à limpeza com o biossurfactante, demonstrando que esta biomolécula foi mais eficiente quando pré-utilizada que como substância de limpeza. Tanto *S. aureus* CECT-239 quanto *L. monocytogenes* CECT-934 também apresentaram redução em menos de 50% das células aderidas, sendo que as mesmas demonstraram certa resistência nos procedimentos anteriores. Contudo, para *S. aureus* ATCC 10390, o processo de limpeza foi mais eficiente que a capacidade de antiadesão.

Com relação à *Salmonella enterica* (F), observou-se que houve maior remoção deste microrganismo acima de 50% nos poços contendo menor concentração de biossurfactante (0,2 a 6,2 mg/mL), sendo que o aumento da concentração do composto anfipático diminuiu sua eficiência em remover a *Salmonella*.

Portanto, a ação do biossurfactante produzido por *Lc. lactis* CECT-4434 possui uma eficiência diferente dependendo do microrganismo bioindicador, de sua propriedade antimicrobiana, antiadesiva e como substância para limpeza.

4.6. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância magnética nuclear (RMN)

A análise do biossurfactante obtido foi realizada por meio das duas técnicas mais empregadas para este fim, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e Ressonância magnética nuclear (RMN) (BAKHSHI et al., 2017; SHARMA et al. 2014; SOUSA et al., 2014; VECINO et al. 2015). Devido à alta complexidade de elucidação deste tipo de biomolécula, poucos trabalhos na literatura reportam sua caracterização. Segundo Sharma et al. (2015) poucos trabalhos envolvendo a produção de biossurfactante por bactérias ácido-láticas oferecem informações adequadas de sua composição química, isto porque geralmente estas biomoléculas são caracterizadas como misturas multicomponentes. Já foi descrito na literatura que biossurfactantes produzidos por bactérias ácido-láticas não são compostos homogêneos, mas inicialmente caracterizados como misturas multicomponentes que consistem em porções de proteínas, polissacarídeos e peptídeos (GOLEK et al., 2009; SHARMA et al., 2015; VECINO et al., 2015)

Conforme Bakhshi et al. (2017), a análise de espectroscopia de infravermelho (FTIR) é o método mais utilizado na determinação preliminar de compostos, permitindo elucidar a estrutura química de amostras desconhecidas por meio da identificação seus grupos funcionais.

De acordo com a análise de FTIR o biossurfactante produzido por *Lc. lactis* CECT-4434 é composto por carboidratos, lipídeos e proteínas (Figura 4.16). O espectro indicou a presença de grupos peptídicos resultantes do alongamento de O-H e N-H, correspondente à banda em 3227 cm^{-1} . Em 2929 cm^{-1} corresponde às vibrações C-H (CH_3) e (CH_2), indicando cadeias alifáticas que podem estar associadas com a porção lipopetídica da molécula. Além disto, o espectro de FTIR também denotou a existência de bandas fracas de proteínas relacionadas, mais especificamente ligações C=O em 1639 cm^{-1} , referente a uma ligação amida I, e ligações N-H (amida II) em 1544 cm^{-1} . A banda 1215 cm^{-1} indica a presença de ligações C-O de éteres, representando vibrações de açúcares. A confirmação é dada em 1037 cm^{-1} , característico de polissacarídeos e pela ligação glicosídica C-O-C.

Figura 4.16. Espectro FTIR do biossurfactante produzido por *Lc. Lactis* CECT-4434.

Para melhor definir a caracterização do biossurfactante produzido, a disposição espacial dos prótons na biomolécula foi realizada por espectroscopia de ^1H RMN (Figura 4.17).

Figura 4.17. Espectro ^1H -RMN do biossurfactante produzido por *Lc. lactis* CECT-4434

Os espectros de prótons de RMN parecem complexos, porém alguns picos distintos ficaram evidentes e seu deslocamento químico foi avaliado. Segundo Prosperi et al. (2000), os picos entre 5,5 e 4,5 ppm correspondem aos sinais de prótons na posição 1 de monossacarídeos. É possível observar inúmeros picos entre 4,20 e 3,56 ppm, indicando a presença de várias frações de açúcares e de lipídeos, confirmando os dados constatados no espectro de FTIR. As cadeias alifáticas (CH₃ e CH₂) são representadas pelos picos entre 1,49 e 0,94 ppm. Segundo Chai, Allen e Hicks (2014), a faixa entre 4,5 a 3,5 ppm está relacionada com a presença de polissacarídeos, e, os picos de 1,5 a 0,5 ppm correspondem aos prótons de cadeia lateral da região de lipídeos de um lipopolissacarídeo. A alta intensidade do pico em 3,71 ppm revelou elevada interação entre peptídeos e polissacarídeos.

Conforme as bandas obtidas no espectro de FTIR, o biossurfactante produzido é semelhante ao sintetizado por *Lactobacillus pentosus*, que foi estudado por Vecino et al. (2015), o qual também é composto por carboidratos, lipídeos e proteínas, com bandas em 3290, 2961, 1644-1544 e 1089 cm⁻¹, definindo-o como glicolipopeptídeo. Ademais, verifica-se também a presença de polissacarídeos.

CONCLUSÕES

Lc. lactis CECT-4434 se mostrou produtora de biossurfactante e bacteriocina, o que pode proporcionar rendimento ao bioprocesso por se tratar de duas biomoléculas de importante aplicação no campo farmacêutico, alimentar e ambiental. A composição do meio de cultivo interferiu positivamente na produção destas duas biomoléculas. O soro de leite propiciou produção de biossurfactante 1,65 vezes maior que o meio semi-sintético MRS, mesmo sem suplementação de nutrientes. No delineamento proposto, observou-se o soro de leite, na concentração de 15 % influenciou positivamente na produção de biossurfactante (média de 12,21 mg/L), reduzindo a tensão superficial em cerca de 24,13 mN/m. Já em relação à síntese de bacteriocina, a sacarose foi a variável que mais interferiu em sua produção, de forma antagonista, ou seja, quanto menor sua concentração, maior a síntese de bacteriocina (com aumento da zona de inibição em 14,2%). Verificou-se que a menor concentração de vinhaça utilizada (1%) e a maior concentração de sacarose (2%) contribuíram para a produção de biossurfactante. Por outro lado, a maior concentração de vinhaça e a menor de sacarose favoreceu a síntese de bacteriocina. Sendo assim, os resíduos soro de leite e/ou vinhaça demonstraram potencial para serem utilizados como substrato para a produção de biossurfactantes ou bacteriocina por *Lc. lactis* CECT-4434.

Verificou-se que o biossurfactante obtido no presente estudo não é muito eficiente na redução da tensão superficial, necessitando de 30 mg/mL para atingir sua CMC. Por outro lado, o mesmo se mostrou altamente estável frente a pH e temperaturas extremos apresentando uma capacidade notável quanto à sua ação antimicrobiana, antiadesiva e na remoção dos microrganismos bioindicadores por meio de limpeza.

Destaca-se, portanto, que o soro de leite é um fator importante na produção de biossurfactante por *Lc. lactis* CECT-4434 e que a mesma deve ser conduzida sob microaeração (5%) para obter maior concentração do biossurfactante.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Considerando os resultados aqui apresentados sugere-se:

- Avaliar o uso de Soro de leite proveniente de descarte da indústria de laticínios;
- Buscar, por meio da Biologia molecular, maneiras para aumentar a produção e rendimento do biossurfactante;
- Avaliar possível toxicidade e/ou citotoxicidade do biossurfactante para assegurar sua futura aplicação;
- Avaliar sua capacidade antiadesiva em outras superfícies utilizadas na indústria de alimentos como aço inoxidável, vidro, polipropileno, assim como outros microrganismos;
- Avaliar a ação do biossurfactante sob diferentes condições, maiores intervalos de tempo e formação de biofilmes de forma a determinar a influência desses parâmetros sobre o controle dos biofilmes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, A.; PINAZO, A.; INFANTE, M.R.; CASALS, M.; GARCIA, F.; MANRESA, A. Physicochemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir*, v.17, n.5, p.1367-1371, 2001.

ANVISA. Antimicrobianos - Base Teóricas e Uso Clínico: Resistência microbiana - Mecanismos e Impacto Clínico. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/gramp_staphylo.htm. Acesso em: 25/05/2017.

ANVISA - Resolução-RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b. Acesso em 25/05/2017.

APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Effect of addition of biosurfactant produced by *Pseudomonas* ssp. on biodegradation of crude oil. In: *International Conference on Environmental Science and Technology*, 2, Singapore, 2011. Singapore: CBEES, IEEE, 2011. v.6, p.71-75.

ARAÚJO, L.V.; FREIRE, D.M.G.; NITSCHKE, M. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Quimica Nova*, v. 36, n.6, p.848-858, 2013

ARAUJO LÍVIA, V.; ABREU, F.; LINS, U.; MELO SANTA ANNA, L.M.; NITSCHKE, M.; GUIMARÃES FREIRE, D.M. Rhamnolipid and surfactin inhibit *Listeria monocytogenes* adhesion. *Food Research International*, v.44, p.481-488, 2011.

ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; PINHEIRO, G.S.; MAZZOLA, P.G.; PESSOA JR., A.; VESSONI PENNA, T.C. Nisin expression production from *Lactococcus lactis* in milk whey medium. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.83, p.325-328. 2008.

ARAUZ, L.J.; JOZALA, A.F.; MAZZOLA, P.G.; PENNA, T.C.V. Nisin biotechnological production and application: a review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 20, p.146-154, 2009.

BAKHSHI, N.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. SHEIKH-ZEINODDIN, M. Dynamic surface tension measurement for the screening of biosurfactants produced by *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* PTCC 1896. *Enzyme and Microbial Technology*, v.101, p.1-8, 2017.

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

BEZZA, F.A.; CHIRWA, E.M.N. Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochemical Engineering Journal*, v.101, p.168-178, 2015. DOI: 10.1016/j.bej.2015.05.007

BOEHM, G.; STAHL, B. Oligosaccharides. In: MATTILA-SANDHOLM, T., SAARELA, M. *Functional Dairy Products*. Woodhead Pub. Ltd: Cambridge, England, 2003. v.1, cap.9, p.203-243.

- BORDIGA, M. et al. Identification and Characterization of Complex Bioactive Oligosaccharides in White and Red Wine by a Combination of Mass Spectrometry and Gas Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.60, p.3700–3707, 2012.
- BORGES, M.F.; ANDRADE, A.P.C.; ARCURI, E.F.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos. Embrapa Agroindústria Tropical Fortaleza, CE. 2009. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Agroindústria. Tropical Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2009.
- BORZOUEE, F.; MOFID, M.R.; VARSHOSAZ, J.; SHARIAT, S.Z.A.S. Purification of lactoperoxidase from bovine whey and investigation of kinetic parameters. *Advanced Biomedical Research*, v.5, n.189, 2016. DOI: 10.4103/2277-9175.192738.
- BOUFFIOUX, O. et al. Molecular organization of surfactin-phospholipid monolayers: effect of phospholipid chain length and polar head. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1768, n.7, p.1758-1768, 2007.
- BURGER, M.M.; GLASER, L.; BURTON, R.M. The enzymatic synthesis of a rhamnase-containing glycolipid by extracts of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, v.238, p.2595-2601, 1963.
- BUSTAMANTE, M.A.; MORAL, R.; PAREDES, C.; PÉREZ-ESPINOSA, A.; MORENO-CASELLES, J.; PÉREZ-MURCIA, M.D. Agrochemical characterization of the solid byproducts and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management*, v.28, p.372–380, 2008.
- BUSTOS, G., MOLDES, A.B., CRUZ, J.M., DOMÍNGUEZ, J.M. Formulation of low-cost fermentative media for lactic acid production with *Lactobacillus rhamnosus* using vinification lees as nutrients. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, n.4, p.801–808. 2004.
- BUSTOS, G.; DE LA TORRE, N.; MOLDES, A.B.; CRUZ, J.M.; DOMÍNGUEZ, J.M. Revalorization of hemicellulosic trimming vine shoots hydrolyzates through continuous production of lactic acid and biosurfactants by *L. pentosus*. *Journal of Food Engineering*, v.78, p.405–12, 2007.
- CAMEOTRA, S.S.; MAKKAR, R.S.; KAUR, J.; MEHTA, S.K.; Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. v.672, p.261-280, 2010.
- CAMPBELL, N.A.; REECE, J.B.; HEYDEN, R. Biology, 7 Ed. Benjamin Cummings: Califórnia, EUA, 2005. 1312p.
- CAMPOS, J.M.; STAMFORD, T.L.M.; SARUBBO, L.A.; LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; BANAT, I.M. Microbial biosurfactants as additives for food industries. *Biotechnology Progress*, v.29, p.1097-1108, 2013.
- CARVALHO, F.; PRAZERES, A.R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. *Science of the Total Environment*, v.445-446 p.385-96, 2013.
- CASAS, J.A.; GARCÍA-OCHOA, F.; Sophorolipid production by *Candida bombicola*: medium composition and culture methods. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v.88, n.5, p.488–494, 1999.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. *E.coli Homepage*. 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ecoli/general/index.html>. Acesso em 25/05/2017.

CDC - Center for Disease Control and Prevention. *Diseases & Conditions: Salmonella and eggs*. 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/features/salmonellaeggs/>. Acesso em: 26/05/2017

CERESA, C.; TESSAROLO, F.; CAOLA, I.; NOLLO, G.; CAVALLO, M.; RINALDI, M.; FRACCHIA, L. Inhibition of *Candida albicans* adhesion on medical-grade silicone by a *Lactobacillus*-derived biosurfactant. *Journal of Applied Microbiology*, v.118, n.5, p.1116–1125, 2015.

CHAI, H.; ALLEN, W.E.; HICKS, R.P. Synthetic Antimicrobial Peptides Exhibit Two Different Binding Mechanisms to the Lipopolysaccharides Isolated from *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 13p. Doi:10.1155/2014/809283.

CHEIGH, C.I.; CHOI, H.J.; PARK, H.; KIM, S.B.; KOOK, M.C.; KIM, T.S.; HWANG, J.K., PYUN, Y.R. Influence of growth conditions on the production of anisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. *Journal of Biotechnology*, v.95, p.225-235, 2002.

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

DANIELS, R.; VANDERLEYDEN, J.; MICHIELS, J. Quorum sensing and swarming migration in bacteria *FEMS Microbiology Reviews*, v.28, p.261-289, 2004.

DAS, P.; MUKHERJEE, S.; SEN, R. Genetic Regulations of the Biosynthesis of Microbial Surfactants: An Overview. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v.25, p.165-186, 2008.

DAVEREY, A.; PAKSHIRAJAN, K. Sophorolipids from *Candida bombicola* using mixed hydrophilic substrates: Production, purification and characterization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.79, p.246-253, 2010.

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The application of foaming for the recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, v.28 p.346-354, 2001.

DESAI, J.D.; BANAT, I.M. Microbial production of surfactant and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v.61, p.47-64, 1997.

DEVESA-REY, R.; VECINO, X.; VARELA-ALENDE, J.L.; BARRAL, M.T.; CRUZ, J.M.; MOLDES, A.B. Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management*, v.31, p.2327-2335, 2011.

DHANARAJAN, G.; SEN, R. Amphiphilic molecules of microbial origin. In: MULLIGAN, C.N.; SHARMA, S.K.; MUDHOO, A. *Biosurfactant: Research Trends and Applications*, CRC Press: Boca Raton. p. 31-48, 2014.

DOMINGUES, P.M.; ALMEIDA, A.; LEAL, L.S.; GOMES, N.C.M.; CUNHA, A. Bacterial production of biosurfactants under microaerobic and anaerobic conditions. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 34p. 2017. DOI: 10.1007/s11157-017-9429-y

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v.17, p.61-69, 2001.

DUBEY, K.; JUWARKAR, A. Determination of genetic basis for biosurfactant production in distillery and curd whey wastes utilizing *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2. *Indian Journal of Biotechnology*, v.3, p.74-81, 2004.

DUWAT, P. et al. Respiration capacity of the fermenting bacterium *Lactococcus lactis* and its positive effects on growth and survival. *Journal of Bacteriology*, v.183, n. 5, 2001. DOI: 10.1128/JB.183.15.4509-4516.2001.

DYRSET, N.; OLSEN, E.S.; HAVREVOLL, O.; RATNAWEERA, H.; STORRO, I.; BIRKELAND, D.E. Feed supplement recovered from dairy wastewater by biological and chemical pretreatment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.73, p.175-182, 1998.

FONTES, G.C.; AMARAL, P.F.F.; NELE, M.; COELHO, M.A.Z. Factorial Design to Optimize Biosurfactant Production by *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v.2010, 2010. DOI: <http://doi.org/10.1155/2010/821306>.

FONTES, G.C.; RAMOS, N.M.; AMARAL, P.F.F.; NELE, M.; COELHO, M.A.Z. Renewable resources for biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.29, n.3, p.483-493, 2012.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. *Dairy chemistry and biochemistry*. Londres, Inglaterra: Ed. Blackie Academic & Professional. 1998. 478p

FRACCHIA, L. et al. Industrial applications of biosurfactants; In: KOSARIC, N.; SUKAN, F.V. *Biosurfactants: production and utilization – processes, technologies and economics*, 12, New York, 2014. Surfactant Sciences Series. Boca Raton: CRC Press, v.159, 245–p. 260, 2014.

FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI, G.; BANAT, I.; (Bio)surfactant and bioremediation, Successes and failures. In: PLAZA, G. *Trends in bioremediation and phytoremediation*. Kerala, India: Research Signpost, p.145-156, 2010.

FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; FRACCHIA, L.; VAN HAMME, J.; GKOREZIS, P.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Biosurfactant use in heavy metal removal from industrial effluents and contaminated sites. In: KOSARIC, N.; SUKAN, F.V. *Biosurfactants: production and utilization – processes, technologies and economics*, 17, New York, 2014. Surfactant Sciences Series. Boca Raton: CRC Press, v.159, p.361-366, 2014.

FREIRE, D.M.G.; ARAUJO, L.V.; KRONEMBERGER, F.A.; NITSCHKE, M. Biosurfactants as emerging additives in food processing. In: PASSOS, M.L.; RIBEIRO, C.P. *Innovation in Food Engineering: New Techniques and Products*. Taylor & Francis Group: Boca Raton, p.685-705, 2009.

FU, W.; MATHEWS, A.P. Lactic acid production from lactose by *Lactobacillus plantarum*: Kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochemical Engineering Journal*, v.3, n.3, p.163-170, 1999.

GALABOVA, D.; SOTIROVA, A.; KARPENKO, E.; KARPENKO, O. Role of Microbial Surface-Active Compounds in Environmental Protection. In: FANUN, M. *The Role of Colloidal Systems in Environmental Protection*, 3, Amsterdam: Elsevier, p.41-83, 2014.

GARCÍA-ALMENDÁREZ, B.E.; CANN, I.K.O.; MARTIN, S.E.; GUERRERO-LEGARRETA, I.; REGALADO, C. Effect of *Lactococcus lactis* UQ2 and its bacteriocin on *Listeria monocytogenes* biofilms. *Food Control*, v.19, p.670–680, 2008.

GEYS, R.; SOETAERT, W.; VAN BOGAERT, I. Biotechnological opportunities in biosurfactant production. *Current Opinion in Biotechnology*, v.30, p.66–72, 2014. DOI: 10.1016/j.copbio.2014.06.002

GHRIBI, D.; CHAABOUNI, S.E. Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnology Research International*, v.2011, 6p, 2011. DOI:10.4061/2011/653654

GHRIBI, D.; SAYARI, A.; GARGOURI, Y.; BEZZINE, S. Improvement of *Staphylococcus xylosus* lipase production through optimization of the culture conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.111, n.10, p.967–971, 2009.

GOŁEK, p.; BEDNARSKI, w.; Bartosz BRZOZOWSKI, b.; DZIUBA, b. The obtaining and properties of biosurfactants synthesized by bacteria of the genus *Lactobacillus*. *Annals of Microbiology*, v.59, p. 119-126, 2009.

GOMAA, E.Z. Antimicrobial activity of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* strain M104 grown on whey. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.56, n.2, p.259–268, 2013a.

GOMAA, E.Z. Antimicrobial and anti-adhesive properties of biosurfactant produced by lactobacilli isolates, biofilm formation and aggregation ability. *The Journal of General and Applied Microbiology*, v.59, p.429-436, 2013b.

GUDIÑA, E.J.; RANGARAJAN, V.; SEN, R.; RODRIGUES, L.R. Potential therapeutic applications of biosurfactants. *Trends in Pharmacological Sciences*, v.34, n.12, 2013.

GUDIÑA, E.J.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Biosurfactant-producing lactobacilli: screening, production profiles, and effect of medium composition. *Applied and Environmental Soil Science*, v. 2011, 9p. doi:10.1155/2011/201254.

HAUSMANN, R.; SYDALTK, C. Types and Classification of Microbial Surfactants. Cap 1. In: KOSARIC, N.; SUKAN, F.V. *Biosurfactants: Production and utilization – process, technologies, and economics*. CRC Press: Boca Raton. 2015, 389p.

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

IYAPPARAJ, P. et al. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. MSU3IR against shrimp bacterial pathogens. *Aquatic Biosystems*, v.9, n.12, 2013. DOI: 10.1186/2046-9063-9-12

JANCZUKOWICZ, W.; ZIELINSKI, M.; DEBOWSKI, M. Biodegradability evaluation of dairy effluents originated in selected sections of dairy production. *Bioresource Technology*, v.99, p.4199–4205, 2008.

JENSEN, N.B.S.; MELCHIORSEN, C.R.; JOKUMSEN, K.V.; VILLADSEN, J. Metabolic behavior of *Lactococcus lactis* mg1363 in microaerobic continuous cultivation at a low dilution rate. *Applied And Environmental Microbiology*, p. 2677–2682, 2001.

JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A.J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. *Bioresource Technology*, v.99, n.1, p.195–199, 2008.

JOSHI, S.J.; DESAI, A.J. Biosurfactant's role in bioremediation of NAPL and fermentative production. In: SEN, R. *Biosurfactants, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer: New York, v.672, p.222-235, 2010.

KANMANI, p.; KUMAR, R.S.; YUVARAJ, N.; PAARI, K.A.; PATTUKUMAR, V.; ARUL, V. Probiotics and Its Functionally Valuable Products-A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.53, n.6, p.641-658, 2013. DOI: 10.1080/10408398.2011.553752.

KARGI, F.; EREN, N.S.; OZMIHCI, S. Bio-hydrogen production from cheese whey powder (CWP) solution: Comparison of thermophilic and mesophilic dark fermentations. *International Journal of Hydrogen Energy*, v.37, p.8338-8342, 2012.

KHOPADE, A.; REN, B.; LIU, X.Y.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; KOKARE, C. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3, *Journal of Colloid and Interface Science*, v.367, n.1, p.311-318, 2012.

KIM, H.; YOON, B.; LEE, G.; SUH, H.; OH, H.; KATSURAGI, T.; TANI, Y. Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 8, p.41-46, 1997.

KITAMOTO, D.; MORITA, T.; FUKOUKA, T.; KONISHI, M.; IMURA, T. Self-assembling properties of glycolipid biosurfactants and their potential applications. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v.14, p.315-328, 2009.

KITAMOTO, D.; TOMA, K.; HATO, M. Glycolipid-based nanomaterials. In: NALWA, H.S. editor. *Handbook of Nanostructured Biomaterials and Their Applications in Nanobiotechnology*, vol. 1. California: American Science Publishers, p. 239-271, 2005.

KUKHAR, V. Biomass - Feedstock for organic chemicals. *Kemija u Industriji*, v. 58, p.57–71, 2009.

LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.; WRIGHT, A.V. *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. 4ed. CRC Press: Boca Raton, EUA, 2011, 798P.

LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants. *Surfactant Science Series*, v.25, p.21-45, 1987.

- LEE, S.Y.; KIM, H.U. Systems strategies for developing industrial microbial strains. *Nature Biotechnology*, v.33, n.10, p.1061-1072, 2015.
- LIMA, C.J.B.; RIBEIRO, E.J.; SÉRVULO, E.F.C.; RESENDE, M.M.; CARDOSO, V.L. Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* grown in Residual Soybean Oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.152, p.156-168, 2009.
- LIN, S.C.; MINTON, M.A.; SHARMA, M.K.; GEORGIU, G. Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Applied Environmental Microbiology*, v.60, p.31-38, 1994.
- LUNA, J.M.; RUFINO, R.D.; SARUBBO, L.A.; RODRIGUES, L.R.M.; TEIXEIRA, J.A.C.; TAKAKI, G.M.C. Evaluation antimicrobial and antiadhesive properties of the biosurfactant lunasan produced by *Candida sphaerica* UCP 0995. *Current Microbiology*, v.62, p.1527-1534, 2011.
- MACHADO, T.R.; MOHIDEEN, R.A.H.; SARAVANAKUMARI, M.; PRABHAVATHI, P. Anti-adhesive, antimicrobial and biodegradability assay of a lipopeptide biosurfactant from *Lactococcus lactis*. *International Journal of Science Innovations and Discoveries*, v.3, n.4, p.478-483, 2013.
- MADIGAN, M.T. et al Brock biology of microorganisms, 14th ed. Pearson, London, 2014.
- MAGALHÃES, L.; NITSCHKE, M. Antimicrobial activity of rhamnolipids against *Listeria monocytogenes* and their synergistic interaction with nisin. *Food Control*, v.29, p.138-142, 2013.
- MAIER, R.M. Biosurfactant: evolution and diversity in bacteria. *Advanced Applied Microbiology*, v.52, p.101-121, 2003.
- MAKKAR R.S.; CAMEOTRA S.S. An update on use of unconventional substrates for biosurfactants production and their new applications. *Applied Microbiology Biotechnology*, v.58, p.428-434, 2002.
- MAKKAR, R.S.; CAMEOTRA, S.S.; BANAT, I.M. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. *AMB Express*, v.1, p.5, 2011.
- MANIVASAGAN, P.; SIVASANKAR, P.; VENKATESAN, J.; SIVAKUMAR, K.; KIM, S.K. Optimization, production and characterization of glycolipid biosurfactant from the marine actinobacterium, *Streptomyces* sp. MAB36. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v.37, n.5, p.783-797, 2014.
- MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Biosurfactants: a sustainable replacement for chemical surfactants? *Biotechnology Letters*, v.34, p.1597-1605, 2012.
- MEYLHEUC, T.; METHIVIER, C.; RENAULT, M.; HERRY, J.M.; PRADIER, C.M.; FONTAINE, M.N.B. Adsorption on stainless steel surfaces of biosurfactants produced by gram-negative and gram-positive bacteria: Consequence on the bioadhesive behavior of *Listeria monocytogenes*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.52, p. 128-137, 2006.
- MIRELES, J.R.; TOGUCHI, A.; HARSHEY, R.M. *Salmonella enterica* serovar *Thyphimurium* swarming mutants with altered biofilm-forming abilities: Surfactin inhibits biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, v.183, n.20, p.5848-5854, 2001.

- MIYOSHI, A.; ROCHAT, T.; GRATADOUX, J.J.; LE LOIR, Y.; OLIVEIRA, S.C.; LANGELLA, P.; AZEVEDO, V. Oxidative stress in *Lactococcus lactis*. *Genetics and Molecular Research*, v.2, n.4, p.348-359, 2003.
- MOLDES, A.B. Review on the utilization of low-cost substrates to obtain metabolites for protection of the environment. In: FANUN, M. *The Role of Colloidal Systems in environmental protection*, 4, Amsterdam: Elsevier. p.85-96, 2014.
- MOLLEA, C.; MARMO, L.; BOSCO, F. Valorization of cheese whey, a by-product from the dairy industry, food industry. In: MUZZALUPO, I. *Food Industry* (Ed.), 24, 2013. ISBN: 978-953-51-0911-2, InTech, DOI: 10.5772/53159.
- MORENO, I.; LERAYER, A.S.; L.; BALDINI, V.L.S.; LEITÃO, M.F.F. Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, p.184-192, 2000.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Enhanced production of biosurfactant by a marine bacterium on statistical screening of nutritional parameters. *Biochemical Engineering Journal*, v.42, p.254-260, 2008.
- MULLIGAN, C.N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. v.14, p.372–378, 2009.
- MULLIGAN, C.N.; SHARMA, S.K.; MUDHOO, A.; MAKHIJANI, K. Green chemistry and biosurfactant research. Cap 1. In: MULLIGAN, C.N.; SHARMA, S.K.; MUDHOO, A. *Biosurfactants: research trends and applications*. CRC Press: Boca Raton, 2014. 352p.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S.G.V.A.O. Biosurfactants in food industry. *Trends in Food Science & Technology*, v.18, p. 252-259, 2007.
- NITSCHKE, M. et al. Surfactin reduces the adhesion of food-borne pathogenic bacteria to solid surfaces. *Letters in Applied Microbiology*, v.49, n.2, p.241–247, 2009.
- OIV. THE INTERNATIONAL ORGANIZATION OF VINE AND WINE. *OIV Statistical report on World vitiviniculture: 2015 - World vitiviniculture situation*, 2014. Disponível em: <http://www.oiv.int/public/medias/2777/report-mainz-congress-2015-oiv-en-7.pdf>. Acesso em: 19/04/2016.
- OLIVEIRA, J.G.; GARCIA-CRUZ, C.H. Properties of a biosurfactant produced by *Bacillus pumilus* using vinasse and waste frying oil as alternative carbon sources. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.56, 2013. ISSN 1678-4324
- ONBASLI, D.; ASLIM, B. Determination of rhamnolipid biosurfactant production in molasses by some *Pseudomonas* spp. *New Biotechnology*. v.25, p.255–255, 2009. DOI: 10.1016/j.nbt.2009.06.569.
- PANESAR, P.S.; KENNEDY, J.F.; GANDHI, D.N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, v.105, p.1-14, 2007.

PARADA, J.L.; CARON, C.R.; MEDEIROS, A.B.P.; SOCCOL, C.R. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v.50, n.3, p.521-542, 2007.

PENNA, T.C.V.; JOZALA, A.F.; NOVAES, L.C.L.; PESSOA JR., A.; CHOLEWA, O. Production of nisin by *Lactococcus lactis* in media with skimmed milk. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.121-124, p.619-637, 2005.

PÉREZ-BIBBINS, B.; TORRADO-AGRASAR, A.; SALGADO, J.M.; OLIVEIRA, R.P.S.; DOMÍNGUEZ, J.M. Potential of lees from wine, beer and cider manufacturing as a source of economic nutrients: An overview. *Waste Management*, v.40, p.72–81, 2015.

PHAC - Public Health Agency of Canada. PATHOGEN SAFETY DATA SHEET - INFECTIOUS SUBSTANCES: SALMONELLA ENTERICA SPP. 2010. Disponível em: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/salmonella-ent-eng.php>. Acesso em: 26/05/2017

PIRÔLLO, M.P.S. et al. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydrocarbon-contaminated site. *Journal of Applied Microbiology*, v. 105, p. 1484–1490. 2008.

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

PORTILLA-RIVERA, O.; TORRADO, A.; DOMÍNGUEZ, J.M.; MOLDES, A.B. Stability and emulsifying capacity of biosurfactants obtained from lignocellulosic sources using *Lactobacillus pentosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, p.8074-8080, 2008.

PRAZERES, A.R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, v.110, p.48-68, 2012.

PROSPERI, G.; MARCELLO, C.; FRANCESCO, C.; EUGENIO, F.; FILIPPO, P. PASQUALE, S. Lipopolysaccharide biosurfactante. US Pat. 6033901, 16 mai. 2000. 16p.

RAHMAN, P.K.S.M; GAKPE, E. Production, characterization and applications of biosurfactants - Review. *Biotechnology*, v.7, n.2, p.360-370, 2008.

RANDHAWA, K.K.S. Biosurfactants produced by genetically manipulated microorganisms: Challenges and opportunities. In: KOSARIC, N.; SUKAN, F.V. *Biosurfactants: Production and utilization – process, technologies, and economics*, 4, CRC Press: Boca Raton. 2015, 389p.

RASHEDI, H.; JAMSHIDI, E; ASSADI, M.M.; BONAKDARPOUR, B. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in culture with glucose as carbon source. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, v.20, n.1, p.99–106, 2006.

REIS, F.A.; SERVULO, E.F.; DE FRANCA, F.P. Lipopeptide Surfactant Production by *Bacillus subtilis* Grown on Low-Cost Raw Materials. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. v.115, p.899–912, 2004. DOI: 10.1385/ABAB:115:1-3:0899

RIVARDO, F.; TURNER, R.J.; ALLEGRONE, G.; CERI, H.; MARTINOTTI, M.G. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.83, n.3, p.541-553, 2009.

ROBINSON, J.; HARDING, J. The Oxford Companion to Wine (4 ed.) Oxford University Press, 2015. 912p. DOI: 10.1093/acref/9780198705383.001.0001.

RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A. Biosurfactants production from cheese whey. In: CERDÁN, M.E.; GONZÁLEZ-SISO, M.I.; BECERRA, M. *Advances in Cheese Whey Utilization*, 8, Trivandrum: India-Transworld Research Network, p.81–104, 2008.

RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, J.A.; OLIVEIRA, R. Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, v.32, n.3, p.135-142, 2006.

RODRIGUES, L.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R.; VAN DER MEI, H.C. Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process Biochemistry*, v.41, p.1–10, 2006a.

RODRIGUES, L.R.; TEIXEIRA, J.A.; VAN DE MEI, H.C.; OLIVEIRA, R. Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.49, p.79-86, 2006b.

RODRIGUES, L.R.; BANAT, I.M.; TEIXEIRA, J.A.; OLIVEIRA, R. Biosurfactants: Potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.57, p.609-618, 2006c.

RODRIGUES, L.; MOLDES, A.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Kinetic study of fermentative biosurfactant production by *Lactobacillus* strains. *Biochemical Engineering Journal*, v.28, p.109-116, 2006d.

RODRIGUES, L.; VAN DER MEI, H.C.; TEIXEIRA, J.; OLIVEIRA, R. Influence of Biosurfactants from Probiotic Bacteria on Formation of Biofilms on Voice Prostheses. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4408–4410, 2004.

RODRÍGUEZ, N.; SALGADO, J.M.; COSTÉS, S.; DOMÍNGUEZ, J.M. Alternatives for biosurfactants and bacteriocins extraction from *Lactococcus lactis* cultures producer under different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology*, v.51, n.2, p.226-233, 2010a.

RODRÍGUEZ, N.; TORRADO, A.; CORTÉS, S.; DOMÍNGUEZ, J.M. Use of waste materials for *Lactococcus lactis* development. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.90, p.1726-1734, 2010b.

RODRÍGUEZ-PAZO, N.; SALGADO, J.M.; COTÉZ-DIÉGUEZ, S.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of phenyllactic acid and biosurfactants from trimming vine shoot hydrolyzates by microbial coculture fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.169, p.2175–2188, 2013.

ROSA, C.M.; FRANCO, B.D.G.M. Bacteriocinas de bactérias lácticas. *ConScientiae Saúde*, v.1, p.9-15, 2002.

- ROSENBERG, E.; RON, E.Z. High and low-molecular-mass microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.52, n.2, p.154-162, 1999.
- RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SARUBBO, L.A.; RODRIGUES, L.R.M.; TEIXEIRA, J.A.C.; CAMPOS, T.G.M. Antimicrobial and anti-adhesive potential of a biosurfactant Rufisan produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.84, p.1–5, 2011.
- SADIQ, S; IMRAN, M.; HASSAN, M.N.; IQBAL, M.; ZAFAR, Y.; HAFEEZ, F.Y. Potential of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhabiting low pH vegetables to produce nisin variants. *LWT- Food Science and Technology*, v.59, p.204-210, 2014.
- SAHARAN, B.S.; SAHU, R.K.; SHARMA, D. A Review on Biosurfactants: Fermentation, Current Developments and Perspectives. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, v.1, p.1-14, 2011.
- SALEK, S.S.; TURNHOUT, A.G.; KLEEREBEZEM, R. LOOSDRECHT, M.C. pH control in biological systems using calcium carbonate. *Biotechnology and Bioengineering*, v.112, n.5, p.905-913, 2015
- SALGADO, J.M.; CARBALLO, E.M., MAX, B., DOMÍNGUEZ, J.M. Characterization of vinasses from five certified brands of origin (CBO) and use as economic nutrient for the xylitol production by *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*, v.101, p. 2379–2388, 2010.
- SAMBANTHAMOORTHY, K.; FENG, X.; PATEL, R.; PATER, S.; PARANAVITANA, C. Antimicrobial and antibiofilm potential of biosurfactants isolated from lactobacilli against multi-drug-resistant pathogens. *BMC Microbiology*, v.14, 2014.
- SANCHEZ, R.G. et al. Improved xylose and arabinose utilization by an industrial recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain using evolutionary engineering. *Biotechnology for Biofuels*, v.3, n.13, p.1-11, 2010.
- SÁNCHEZ, A.C.; SÁNCHEZ, H.H.; FLORES, M.E.J.; Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiological Research*, v.168, p.22-32, 2013.
- SANTA ANNA, L.M.M. et al. Biossurfactante e uso do mesmo em remediação de solos impactados por óleo, *Patent PI0405952-2, Petróleo Brasileiro S.A.*, Brazil, 2004.
- SANTOS, D.K.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Biosurfactants: Multifunctional Biomolecules of the 21st Century. *International Journal of Molecular Sciences*, v.17, n.401, 31p., 2016. DOI: 10.3390/ijms17030401
- SARAVANAKUMARI, P.; MANI, K. Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogens. *Bioresource Technology*, v.101, p.8851-8854, 2010.
- SATPUTE, S.K.; BANPURKAR, A.G.; DHAKEPHALKAR, P.K.; BANAT, I.M.; CHOPADE, B.A. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, v.30, p.127-144, 2010.

SATPUTE, S.K. et al. Molecular Genetics of Biosurfactant Synthesis in Microorganisms. In: SEN, R. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v.672, p.14-41, 2010. DOI: 10.1007/978-1-4419-5979-9_2

SCHULZ, M; WAMMEN, N. Regulation (EU) no 259/2012 of the European Parliament and of The Council of 14 March 2012 amending Regulation (EC) No 648/2004 as regards the use of phosphates and other phosphorus compounds in consumer laundry detergents and consumer automatic dishwasher detergents. *Official Journal of the European Union*, L94, p.16-21, 2012. Disponível em: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32012R0259&rid=3>. Acesso em: 04/04/2017.

SEUNG-HAK, B., et al. Mitigation of harmful algae blooms by sophorolipid. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.13, p.651, 2003.

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

SHARMA, D.; SAHARAN, B.S.; CHAUHAN, N.; BANSAL, A.; PROCHA, S. Production and structural characterization of *Lactobacillus helveticus* derived biosurfactant. *The Scientific World Journal*, v. 2014, 2014. 9p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/493548>

SHARMA, D.; SAHARAN, B.S.; KAPIL, S. Biosurfactants of Probiotic Lactic Acid Bacteria. In: SHARMA, D.; SAHARAN, B.S.; KAPIL, S. *Biosurfactants of Lactic Acid Bacteria*, 2, Springer International Publishing, p.17-29, 2016. ISBN: 978-3-319-26213-0. DOI: 10.1007/978-3-319-26215-4.

SHARMA, S. et al. Lactoperoxidase: structural insights into the function, ligand binding and inhibition. *International Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v.4, n.3, p.108-128, 2013.

SHARON, N. Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1760, p.527–537, n.4, 2006.

SHEPPARD, J.D.; COOPER, D.G. The effects of a biosurfactant on oxygen transfer in a cyclone column reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v.48, n.3, p.325–336, 1990.

SHETE, A.M.; WADHAWA, G.; BANAT, I.M.; CHOPADE, B.A. Mapping of patents on bioemulsifier and biosurfactant: A review. *Journal of Sciences and Industrial Research*, v.65, p.91-115, 2006.

SILVA, N.M.P.R.; RUFINO, R.D.; LUNA, J.M.; SANTOS, V.A.; SARUBBO, L.A. Screening of *Pseudomonas* species for biosurfactant production using low-cost substrates. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v.3, p.132-139, 2014.

SINGH, A.; HAMME, J.D.; WARD, O.P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances*, v.25, p.99-121, 2007.

SLEIMAN, J.N, et al. Sophorolipids as antibacterial agents. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, v.39, p.60–63, 2009.

STIKA, J. Aerating wort: Techniques Brew: Projects&Equipaments, 2009. Disponível em: <http://byo.com/malt/item/1894-aerating-wort-techniques>. Acesso em: 28/04/2017.

SOBERÓN-CHAVÉZ, G.; MAIER, R.M. Biosurfactants: A general overview. Cap 1. In: SOBERÓN-CHÁVEZ, G. *Biosurfactants: From genes to applications*, 2011. 216p.

SOTIROVA, A.; SPASOVA, D.; VASILEVA-TONKOVA, E.; GALABOVA, D. Effects of rhamnolipid biosurfactant on cell surface of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiological Research*, v.164, p.297–303, 2009.

SOUSA, M.; DANTAS, I.T.; FEITOSA, F.X.; ALENCAR, A.E.V.; SOARES, S.A.; MELO, V.M.M.; GONÇALVES, L.R.B.; SANT'ANA, H.B. Performance of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* LAMI005 on the formation of oil / biosurfactant / water emulsion: study of the phase behaviour of emulsified systems. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.51, n.3, p.623, 2014.

TAKAHASHI et al. Production of sophorolipid glycolipid biosurfactants from sugarcane molasses using *Starmerella bombicola* NBRC 10243. *Journal of Oleo Science*, v.60, n.5, p.267-273, 2011.

THAVASI, R.; MARCHANT, R.; BANAT, I.M. Biosurfactant applications in agriculture. In: KOSARIC, N.; SUKAN, F.V. *Biosurfactants: Production and Utilization – Processes, Technologies, and Economics*, 15, New York, 2014. Surfactant Sciences Series. Boca Raton: CRC Press, v.159, p. 313–326, 2014.

TOMÁS, M.S.J.; BRU, E.; NADER-MACÍAS, M.E.F. Estimation of combined effects of carbon and nitrogen sources on the growth and bacteriocin production of *Lactobacillus salivarius* from human source. *Journal of Basic Microbiology*, v.5, n.2, p.190-199,

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. 2012. *Biosurfactants market: Global scenario, raw material and consumption trends, industry analysis, size, share and forecasts, 2011-2018*. Disponível em: <http://www.transparencymarketresearch.com/biosurfactants-market.html>. Acesso em: 28/07/2016.

UVIBRA. *Dados da Vitivinicultura – EMBRAPA Vinho e Uva*, 2010. Disponível em: http://www.cnpuv.embrapa.br/prodserv/vitivinicultura/producao/2010_2014_rs.html. Acesso em: 15/04/2016.

VAN DER VEGT, W.; VAN DER MEI, H.C.; NOORDMANS, J.; BUSSCHER, H.J. Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v.35, p.766–770, 1991.

VAN HAMME, J.D.; URBAN, J. Biosurfactants in bioremediation. In: SINGH, A.; KUHAD, R.C.; WARD, O.P. Cap 4. *Advances in applied bioremediation*. Springer: New York, 2009. 378p.

VÁSQUEZ, J.A.; MURADO, M.A. Mathematical tools for objective comparison of microbial cultures: Application to evaluation of 15 peptones for lactic acid bacteria productions. *Biochemical Engineering Journal*, v.39, n.2, p.276-287, 2008.

VECINO, X.; BARBOSA-PEREIRA, L.; DEVESA-REY, R.; CRUZ, J.M.; MOLDES, A.B. Optimization of extraction conditions and fatty acid characterization of *Lactobacillus pentosus* cell-bound biosurfactant/bioemulsifier. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.95, p.313-320, 2015.

XIA, W.J.; DONG, H.P.; YU, L.; YU, D.F. Comparative study of biosurfactant produced by microorganisms isolated from formation water of petroleum reservoir. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.392, p.124-130, 2011.

YADAV, J.S.S.; YAN, S.; PILLI, S.; KUMAR, L. TYAGIA, R.D.; SURAMPALLI, R.Y. Cheese whey: A potential resource to transform into bioprotein, functional/nutritional proteins and bioactive peptides. *Biotechnology Advances*, v.33, n.6, p.756-774, 2015.

YASUHIKO, I.; OTOOLE, G.A.; MING, H.Y. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids disperse *Bordetella bronchiseptica* biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, v.250, p.237-243, 2005.

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

YONEYAMA, H.; KATSUMATA, R. Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.70, p.1060-1075, 2006.

ZHANG, H.; XIANG, H.; ZHANG, G.; CAO, X.; MENG, Q. Enhanced treatment of waste frying oil in an activated sludge system by addition of crude rhamnolipid solution. *Journal of Hazard Material*, v.167, p.217-223, 2009.

ZOUARI, R.; ELLOUZE-CHAABOUNI, S.; GHRIBI-AYDI, D. Optimization of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactant production under solid-state fermentation using by-products of a traditional olive mill factory. *Achievements in the Life Sciences*, v.8, n.2, p.162-169, 2014.

APÊNDICE

PUBLICAÇÕES, SUBMISSÕES E PARTICIPAÇÕES

- Publicação – SOUZA, E.C.; AZEVEDO, P.O.S.; DOMINGUÉZ, J.M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R.P.S. Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. *CyTA - Journal of Food*. Open Access. p.1-6, 2017. Doi: 10.1080/19476337.2017.1306806.....116
- Artigo Submetido – Central Composite Design (ccd) 24 for otimization of biosurfactant and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. Para o periódico: *Waste Management*, submetido dia 16/06/2017.....123
- Participação – FARINHA, L.R.L.; SABO, S.S.; PORTO, M.C.; SOUZA, E.C.; OLIVEIRA, M.N.; OLIVEIRA, R.P.S. Influence of Prebiotic Ingredients on the Growth Kinetics and Bacteriocin Production of *Lactococcus lactis*. *Chemical Engineering Transactions*, v.43, p.313-318, 2015.....125
- Participação - 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP – SIICUSP em 2014.....131

Publicação – SOUZA, E.C.; AZEVEDO, P.O.S.; DOMINGUÉZ, J.M.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R.P.S. Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434. *CyTA - Journal of Food*. Open Access. p.1-6, 2017. Doi: 10.1080/19476337.2017.1306806

CyTA - Journal of Food

ISSN: 1947-6337 (Print) 1947-6345 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/tcyt20>

Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434

Ellen Cristina Souza, Pamela Oliveira de Souza de Azevedo, José Manuel Domínguez, Attilio Converti & Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira

To cite this article: Ellen Cristina Souza, Pamela Oliveira de Souza de Azevedo, José Manuel Domínguez, Attilio Converti & Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira (2017): Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434, *CyTA - Journal of Food*, DOI: [10.1080/19476337.2017.1306806](https://doi.org/10.1080/19476337.2017.1306806)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2017.1306806>

© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.

Published online: 10 Apr 2017.

Submit your article to this journal [↗](#)

Article views: 70

View related articles [↗](#)

View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tcyt20>

CYT – JOURNAL OF FOOD, 2017
http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2017.1306806

OPEN ACCESS Check for updates

Influence of temperature and pH on the production of biosurfactant, bacteriocin and lactic acid by *Lactococcus lactis* CECT-4434

Elen Cristina Souza^a, Pamela Oliveira de Souza de Azevedo^a, José Manuel Domínguez^b, Attilio Converti^c and Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira^a

^aDepartment of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; ^bDepartment of Chemical Engineering, Faculty of Science, University of Vigo (Campus Ourense), Ourense, Spain; ^cDepartment of Civil, Chemical and Environmental Engineering, Genoa University, Genoa, Italy

ABSTRACT

Operational conditions such as temperature and pH are well known to influence the production of biosurfactants, bacteriocins, and lactic acid by lactic acid bacteria. The bacterial strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT-4434 was used to investigate the effects of temperature (30°C, 37°C and 40°C) and pH control on the production of these biomolecules, in order to establish whether they are able to preferentially address its metabolism towards one product or another. It was observed that the pH control within the range 5.0–5.3 favored the production of lactic acid, which was 38% higher than that obtained without control. The bacteriocin production was higher in the temperature range between 30°C and 37°C, evidenced by the formation of inhibition zones against *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus aureus*, 5–22% and 4–14% higher, respectively, compared with those achieved at 40°C. Finally, the best results for biosurfactant synthesis occurred at 37°C without pH control, with a surface tension reduction between 22.5 and 24.7 mN/m after 6–24 h of culture, respectively.

ARTICLE HISTORY

Received 20 December 2016
Accepted 12 March 2017

KEYWORDS

Lactococcus lactis;
biosurfactant; bacteriocin;
lactic acid; pH; temperature

PALABRAS CLAVE

Lactococcus lactis;
biosurfactantes;
bacteriocinas; ácido láctico;
pH; temperatura

Influencia de la temperatura y pH en la producción de biosurfactantes, bacteriocinas y ácido láctico por *Lactococcus lactis* CECT-4434

RESUMEN

Es bien conocido que determinadas condiciones operacionales, tales como la temperatura y el pH, influyen en la producción de biosurfactantes, bacteriocinas y ácido láctico por parte de las bacterias ácido lácticas. En este trabajo se empleó la cepa bacteriana *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT-4434 para investigar los efectos de la temperatura (30, 37 y 40°C) y el control del pH en la producción de estas biomoléculas, con el fin de determinar como influyen en su metabolismo. Se observó que a pH controlado, dentro del rango 5,0–5,3, se favoreció la producción de ácido láctico, que resultó 38% superior a la obtenida sin control. La producción de bacteriocina fue mayor dentro del rango de temperatura 30–37°C, evidenciada por la formación de zonas de inhibición frente a las cepas indicadoras *Lactobacillus sakei* y *Staphylococcus aureus*, 5–22% y 4–14% respectivamente superiores que aquellos valores alcanzados a 40°C. Finalmente, se observaron los mejores resultados para la síntesis de biosurfactantes a 37°C sin control de pH, con una reducción de la tensión superficial entre 22,5 y 24,7 mN/m tras 6–24 h de cultivo respectivamente.

1. Introduction

Lactic acid bacteria (LAB) are Gram-positive cocci or rods, which are Generally Recognized as Safe by the FDA (US Food and Drug Administration) and produce lactic acid as the major or sole fermentation product (Von Wright & Axelsson, 2012). They comprise a large number of species involved in the production of fermented milk products that belong mainly to the genera *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, and *Streptococcus* (Mayo et al., 2010).

It is important to note that although lactic acid is the major metabolite produced by LAB, other biomolecules can simultaneously be produced depending on the species such as peptides called bacteriocins (Arauz, Jazala, Mazzola, & Penna, 2009). Bacteriocins produced by LAB are proteins or protein complexes with antimicrobial activity and therapeutic potential, even against the cancer (Moreno, Lerayer, Baldini, & Leitão, 2000; Panesar, Kennedy, Gandhi, & Bunko,

2007; Parada, Caron, Medeiros, & Soccol, 2007). The economic importance of bacteriocins in food preservation has increased their exploitation as food preservatives (Rosa & Franco, 2002).

Currently, the most widely studied and industrially exploited bacteriocin is nisin, which is produced by certain strains of the probiotic bacterium *Lactococcus lactis*, is classified as a lantibiotic, contains 34 amino acids and has a molecular weight of 3.5 kDa (Arauz et al., 2009; Oladunjoye, Singh, & Ijabadeniyi, 2016). Nisin is able to inhibit pathogens and contaminants and is the only bacteriocin internationally legalized for use as a natural bio-preservative of foods, since its intake does not exert toxic effects to the human body, does not alter the ecology of the gastrointestinal tract, and, then, does not present the same risks related to the use of antibiotics (Yoneyama & Katsumata, 2006).

CONTACT Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira rpsolive@usp.br Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2 E. C. SOUZA ET AL.

Several studies have reported LAB as producers not only of bacteriocins but also of biosurfactants and stressed their potential application in food processing and public health (Gudiña, Teixeira, & Rodrigues, 2011; Portilla-Rivera, Moldes, Torrado, & Domínguez, 2008; Rodrigues, Teixeira, & Oliveira, 2006b; Rodrigues, Teixeira, Oliveira, & Van Der Mei, 2006a; Rodríguez, Salgado, Costés, & Domínguez, 2010; Rodríguez-Pazo, Salgado, Cotéz-Diéguez, & Domínguez, 2013; Sabo, Conventi, Todorov, Domínguez, & Oliveira, 2015). Recent studies describe the ability of different probiotic LAB to produce biosurfactants extracellularly, intracellularly, or even adsorbed on their plasma membrane (Ceresa et al., 2015; Galabova, Sotirova, Karpenko, & Karpenko, 2014; Rodrigues, Teixeira, Van De Mei, & Oliveira, 2006c; Sharma, Saharan, Chauhan, Bansal, & Procha, 2014), among which the best known is just *L. lactis* (Machado, Mohideen, Saravanakumari, & Prabhavathi, 2013).

The commercial interest and industrial use of biosurfactants are increasing due to their advantages over chemically synthesized surfactants, including high biodegradability, low toxicity, and effectiveness even at extreme temperatures and pH (Bustos, De La Torre, Moldes, Cruz, & Domínguez, 2007; Souza, Penna, & Oliveira, 2014). Furthermore, biosurfactants also find a wider range of applications in the pharmaceutical, cosmetic, food and oil industries, as dispersant, foaming, emulsifying, micelle-forming agents, and for their anti-adhesive action against pathogens (Banat et al., 2010; Cortés-Sánchez, Hernández-Sánchez, & Jaramillo-Flores, 2013; Jha, Sanket, Joshi, & Geetha, 2016).

Since this bacterium is able to simultaneously produce bacteriocins and biosurfactants (Rodríguez et al., 2010), the need was seen in this study to investigate factors that may address to the production of one metabolite or the other depending on desired product.

Cell growth and metabolite accumulation are highly influenced by the culture medium composition and the operating conditions such as pH, temperature, dissolved oxygen concentration, and degree of aeration. Therefore, the influence of different parameters makes it difficult to optimize biotechnological processes (Chen, Juang, & Wei, 2015; Desai & Banat, 1997; Li, Bai, Cai, & Ouyang, 2002). In some cases, biosurfactant production can be mainly regulated by pH and growth temperature (Mulligan, Sharma, Mudhoo, & Makhijani, 2014).

LAB have optimum growth temperature between 20°C and 45°C and survive at pH 5 or less, hence demonstrating high acid tolerance, depending on the selected microorganism (Hofvendahl, Niel, & Hahn-Hägerdal, 1999). The importance of pH control in the simultaneous biosurfactant and bacteriocin production by *L. lactis* was studied by Rodríguez et al. (2010), who observed that at 30°C under pH control at 6.8 only biosurfactant was produced, while both metabolites were produced without pH control. However, these authors did not assess the effect of temperature, which can exert great influence on the production of these biomolecules, favoring the production of one or the other.

In this context, the objective of this study was to identify the effects of temperature (30°C, 37°C and 40°C) and pH control on the production of biosurfactant, bacteriocins, and lactic acid by *L. lactis* subsp. *lactis* CECT-4434, which has the ability to simultaneously

synthesize these metabolites, thus contributing to the profitability of the biotechnological process under investigation.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms and culture conditions

Lactococcus lactis subsp. *lactis* CECT-4434 and the indicator strain *Staphylococcus aureus* CECT-239 were obtained from the Spanish Type Culture Collection (Valencia, Spain), while the other indicator strain *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). All strains were maintained under cryopreservation at -70°C in culture media specific for each microorganism, supplemented with 20% glycerol (v/v).

For *L. lactis* inoculum, 1.0 mL of stock culture was incubated at 37°C and 100 rpm in 250 mL-Erlenmeyer flasks containing Man-Rogosa-Sharpe broth (MRS, Difco, NJ, USA) composed of (g/L): 10.0 peptone, 10.0 meat extract, 5.0 yeast extract, 20.0 dextrose, 1.0 polysorbate, 2.0 ammonium citrate, 5.0 sodium acetate, 0.1 magnesium sulfate, 0.05 manganese sulfate, and 2.0 dibasic potassium phosphate.

After reaching an optical density (O.D.) of 0.8–0.9 at 600 nm, 12 mL of this cell suspension were inoculated into 500 mL Erlenmeyer flasks containing 120 mL of MRS broth. The flasks were incubated under stirring at 100 rpm for 24 h at 30°C, 37°C or 40°C, with or without pH control at 5.0–5.3 using 1.0% CaCO₃ and samples of culture medium were collected at fixed times (6, 16, and 24 h). The experiment was performed in triplicate.

The pre-inoculum of *L. sakei* and *S. aureus* was carried out in MRS broth (Difco) and Tryptic Soy Broth (TSB, Difco), respectively, under the same conditions described above for *L. lactis*, up to the achievement of O.D. of 0.3–0.4 at 600 nm.

2.2. Bacteriocin extraction

After centrifugation (15,000 g for 15 min at 4°C) of fermented broth samples, the supernatant with the pH adjusted to 6.0–6.5, was filtered with 0.45 µm-pore diameter membrane filter (Millipore, Billerica, MA, USA), transferred to Eppendorf tubes, heating for 3 min at 80°C to inhibit proteases, and stored at 4°C for analysis.

The antimicrobial activity of produced bacteriocin was analyzed by the diffusion technique in wells. 150 µL of each indicator strain, *L. sakei* ATCC 15521 or *S. aureus* CECT-239, were inoculated in MRS and TSB, respectively, both containing 1% agar. Wells of 7 mm in diameter were cut in the gelled medium with the aid of a sterile metal cylinder and filled with 50 µL of each extract obtained as previously described. After the plates had been incubated for 24 h at 37°C, the inhibition zones evidenced by bright areas around the wells (halos) were measured with the aid of a caliper.

2.3. Extraction and analysis of biosurfactant

After centrifugation at 4470 g for 10 min at 10°C, the supernatant was recovered for measurement of extracellular biosurfactant. To extract intracellular biosurfactant and/or the adhered one, cells were washed with deionized water, resuspended in phosphate saline buffer PBS (10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ and 150 mM NaCl, pH 7.0) at a ratio of 1.0 mL of PBS

per 6.0 mL of the initial sample, and subjected to stirring for 2 h at 25°C. After that time, samples were centrifuged at 4470 g for 10 min and 25°C, and the supernatants surface tension (ST) was measured.

ST either of cell-free culture medium or extract in PBS was measured by the ring method, using a tensiometer, model Krüss K9 (Krüss, Hamburg, Germany), equipped with platinum de Noüy ring with 1.9 cm diameter. ST values represent the average of three independent measurements at 25°C.

2.4. Determinations of glucose and lactic acid

After filtration of samples through membrane filters (Millipore) with 0.45 µm-pore diameter, glucose and lactic acid concentrations were determined at 30°C by a high performance liquid chromatography (HPLC), model LC-20A Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with a separation column, model Supelcogel C-610H (Supelco, Bellefonte, PA, USA) (H 30 cm × 7.8 mm, 9 µm particle), using as eluent an aqueous solution of 1% H₃PO₄ at a flow rate of 0.5 mL/min. Glucose was quantified using standard curves obtained beforehand with high purity standard solutions for use in HPLC.

3. Results and discussion

Various external parameters can interfere with the production and effective throughput of both biosurfactants and bacteriocins, including culture medium composition, temperature, pH, and incubation time (Cortés-Sánchez et al., 2013).

In this context, a series of batch fermentations was performed in MRS broth in order to identify the effects of

temperature (30°C, 37°C, and 40°C) and pH control on the productions of biosurfactant, bacteriocin, and lactic acid by *L. lactis* CECT-4434, to determine the best conditions for producing each of these metabolites.

3.1. Lactic acid production

Table 1 shows the pH values obtained as a function of time in runs carried out with or without pH control in the range 5.0–5.3 at different temperatures. It can be seen that, in the absence of control, the pH values at 30°C were close to those obtained at 37°C, while at 40°C there was a smaller reduction in pH over time, probably due to the scarce of lactic acid production (under 15 g/L in all cases), as it can be seen in Figure 1, resulting from a metabolism slowdown at this relatively high temperature. On the other hand, the pH control favored the uptake of glucose as carbon source, allowing an increase of lactic acid concentration of 38.8%

Table 1. pH changes as a function of time during *L. lactis* cultures carried out at 30°C, 37°C, and 40°C, with or without pH control.

Tabla 1. Variación del pH a lo largo del tiempo durante el cultivo de *L. lactis* llevado a cabo a 30, 37 y 40°C, con y sin control de pH.

	Time (h)	30°C	37°C	40°C
Without pH control	0	5.30	5.30	5.30
	6	4.74	4.71	4.99
	16	4.23	4.25	4.77
	24	4.16	4.20	4.64
With pH control	0	5.30	5.30	5.30
	6	5.11	5.05	5.12
	16	5.10	5.01	5.15
	24	5.21	5.12	5.14

Figure 1. Glucose consumption (—), surface tension reduction (□), lactic acid production (♦). Runs without pH control at: (a) 30°C, (b) 37°C, and (c) 40°C. Runs with pH control at: (d) 30°C, (e) 37°C, and (f) 40°C.

Figura 1. Consumo de glucosa (—), reducción de tensión superficial (□), producción de ácido láctico (♦). Ensayos sin control del pH: (a) 30°C, (b) 37°C and (c) 40°C. Ensayos con control del pH: (d) 30°C, (e) 37°C y (f) 40°C.

4 E. C. SOUZA ET AL.

at 30°C, 40.3% at 37°C, and 47.4% at 40°C compared with runs performed without control, with a maximum value (23.4 g/L) after 16 h of cultivation at 40°C. As expected by the homofermentative metabolism of *L. lactis*, lactic acid production was proportional to glucose consumption.

The same effect was observed by Rodríguez et al. (2010) for the same strain, which produced, in bioreactor under pH control (6.8), 23 g/L of lactic acid in 6 h at 30°C, with complete glucose consumption, while the absence of control reduced the consumption and delayed lactic acid production (7.8 g/L in 30 h).

3.2. Bacteriocin production

Penna, Jozala, Gentile, Pessoa, and Cholewa (2006) observed a strong influence of pH of the culture medium on nisin release by *L. lactis* ATCC 11454, that is, at pH < 6, more than 80% of it was released extracellularly, while at pH > 6, it was mainly linked to cell membrane or intracellularly trapped. According to these results, nisin production by *L. lactis* subsp. *lactis* IT-4 achieved a maximum at pH 5 and decreased at higher pH (Sadiq et al., 2014), which confirms the validity of investigating, in the present study, the effect of pH control in the range 5.0–5.3.

Table 2 shows that there was no statistically significant difference between the values of extracellular activity of bacteriocin produced by *L. lactis* CECT-4434 in cultured performed at 30°C and 37°C, with or without pH control, expressed as inhibition diameter of growth of *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 (9.0–10.6 mm) and *Staphylococcus aureus*

CECT-239 (12.5–14.0 mm). The lowest activity was observed at 40°C, especially without pH control, resulting in inhibition halos of only 7.5 mm against *L. sakei* and 11.0 mm against *S. aureus* after 24 h of cultivation. It is also noteworthy that the largest inhibition diameters were obtained with broth samples mainly taken after 6 h, that is, during the exponential growth phase (Table 3), while the narrowest one with stationary phase samples, suggesting possible bacteriocin degradation by the microorganism under conditions of substrate starvation.

These results agree qualitatively with those of Sadiq et al. (2014), who observed at 25–30°C maximum antimicrobial activity of *L. lactis* PI-2 (8.0–10.0 mm) nisin against *L. lactis* IT-4 and a decrease to approximately 6.0 mm at 33–37°C. Comparison with such a thermal profile suggests a certain thermostability of bacteriocin produced in this study.

3.3. Biosurfactant production

In addition to bacteriocins, LAB may produce biosurfactants extracellularly, intracellularly, or adsorbed on their plasma membrane. Although there are many studies describing the ability of different LAB to produce biosurfactants, one of the most important biosurfactant producer is *L. lactis* (Rodrigues et al., 2006a).

In particular, Rodrigues et al. (2006a) reported the production of extracellular biosurfactant by *L. lactis* 53, while Rodríguez et al. (2010) reported no extracellular biosurfactant production by *L. lactis* CECT-4434, even though observed the

Table 2. Inhibition zones (mm) of *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 and *Staphylococcus aureus* CECT-239 growth induced by *Lactococcus lactis* CECT-4434 bacteriocin produced at different temperatures, with and without pH control.

Tabla 2. Zonas de inhibición de crecimiento (mm) de las cepas *Lactobacillus sakei* ATCC 15521 y *Staphylococcus aureus* CECT-239 por la bacteriocina producida por *Lactococcus lactis* CECT-4434 a diferentes temperaturas, con y sin control de pH.

Time (h)		<i>L. sakei</i> ATCC 15521*			<i>S. aureus</i> CECT-239*		
		30°C	37°C	40°C	30°C	37°C	40°C
Without pH control	6	10.0 ± 0.0 ^{ab}	9.0 ± 0.0 ^{bc}	7.8 ± 0.8 ^{cd}	14.0 ± 0.0 ^d	13.4 ± 0.4 ^{de}	12.9 ± 0.4 ^{de}
	16	9.8 ± 0.3 ^{cd}	9.6 ± 0.2 ^{de}	7.7 ± 0.9 ^{cd}	13.0 ± 0.0 ^{de}	12.5 ± 0.1 ^{de}	12.0 ± 0.0 ^{de}
	24	9.8 ± 0.3 ^{cd}	9.4 ± 0.1 ^{de}	7.5 ± 0.6 ^{cd}	13.8 ± 0.2 ^{de}	12.8 ± 0.3 ^{de}	11.0 ± 0.0 ^{de}
With pH control	6	10.5 ± 0.0 ^{ab}	10.0 ± 0.0 ^{bc}	9.6 ± 0.2 ^{cd}	14.0 ± 0.0 ^d	13.1 ± 0.2 ^{de}	12.7 ± 0.0 ^{de}
	16	10.6 ± 0.1 ^{ab}	10.4 ± 0.0 ^{bc}	10.0 ± 0.1 ^{cd}	13.6 ± 0.6 ^{de}	13.0 ± 0.0 ^{de}	12.4 ± 0.7 ^{de}
	24	10.4 ± 0.5 ^{ab}	10.2 ± 0.0 ^{bc}	10.0 ± 0.0 ^{cd}	14.0 ± 0.0 ^d	12.8 ± 0.7 ^{de}	13.2 ± 0.1 ^{de}

*Mean values (n = 3) ± standard deviation. Different letters show statistically significant difference among the values in the table (P < 0.05).

*Valores medios (n = 3) ± desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la tabla (P < 0.05).

Table 3. *Lactococcus lactis* CECT-4434 biomass concentration (g/L) and reduction of surface tension (STred) as a result of biosurfactant production at different temperatures, with and without pH control.

Tabla 3. Concentración de biomasa de *Lactococcus lactis* CECT-4434 (g/L) y reducción de la tensión superficial (STred) como resultado de la producción de biosurfactante a diferentes temperaturas, con y sin control del pH.

Time (h)		30°C		37°C		40°C	
		Biomass (g/L)	STred	Biomass (g/L)	STred	Biomass (g/L)	STred
Without pH control	0	0.1 ± 0.0 ^a	—	0.1 ± 0.0 ^a	—	0.1 ± 0.0 ^a	—
	6	4.6 ± 0.1 ^f	16.4 ± 0.5 ^a	4.8 ± 0.0 ^f	22.5 ± 0.5 ^{ab}	2.3 ± 0.1 ^b	18.1 ± 0.5 ^{ab}
	16	5.3 ± 0.1 ^f	21.9 ± 0.2 ^{ab}	5.4 ± 0.2 ^{gh}	24.4 ± 2.5 ^{ab}	3.3 ± 0.0 ^f	19.7 ± 1.7 ^{bc}
	24	5.7 ± 0.2 ^h	22.8 ± 1.0 ^{ab}	5.4 ± 0.0 ^g	24.7 ± 2.0 ^{ab}	3.6 ± 0.1 ^f	22.1 ± 0.7 ^{bc}
With pH control	0	0.1 ± 0.0 ^a	—	0.1 ± 0.0 ^a	—	0.1 ± 0.0 ^a	—
	6	5.4 ± 0.0 ^f	21.1 ± 1.2 ^{ab}	6.0 ± 0.1 ^f	20.0 ± 0.5 ^{bc}	4.6 ± 0.1 ^f	23.3 ± 1.0 ^{ab}
	16	6.8 ± 0.0 ^g	21.4 ± 3.5 ^{ab}	7.1 ± 0.1 ^f	23.7 ± 1.4 ^{ab}	4.0 ± 0.1 ^f	22.8 ± 0.9 ^{ab}
	24	6.5 ± 0.1 ^f	24.2 ± 1.3 ^{ab}	6.4 ± 0.1 ^f	26.4 ± 1.6 ^a	3.9 ± 0.1 ^f	25.7 ± 1.2 ^{ab}

*Mean values (n = 3) ± standard deviation. Different letters show statistically significant difference among the values in the table (P < 0.05).

Intracellular biosurfactant and/or biosurfactant adsorbed onto cell membrane was extracted with PBS (pH 7.0).

*Valores medios (n = 3) ± desviación estándar. Diferentes letras muestran diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la tabla (P < 0.05). El biosurfactante intracelular y/o adsorbido sobre la membrana celular se extrajo con PBS (pH 7.0).

production of biosurfactant adsorbed onto the cells after extraction with PBS (pH 7).

Based on these results, we investigated in this study the biosurfactant production by the latter strain measuring the capacity of reducing the culture medium surface tension (STred), either with or without pH control, but the ST variations (not shown) were not statistically significant, thus confirming the observations of Rodríguez et al. (2010).

On the other hand, runs performed either with or without pH control showed interesting results in terms of production of intracellular biosurfactant and/or biosurfactant adsorbed onto the cell membrane after extraction with PBS (pH 7.0) (Table 3).

Biosurfactant production was associated to cell growth in the present study. Despite the slow growth of *L. lactis* CECT-4434 at 40°C (0.1–4.6 g/L), biosurfactant production was satisfactory in the culture performed with pH control (Table 3), being STred after 6 h of cultivation (23.3 mN/m) appreciably higher than without control (19.1 mN/m). Indeed, it is worth remembering that a substance can be considered a biosurfactant if is able to reduce the ST by no less than 8 mN/m (Van Der Vegt, Van Der Mei, Noordmans, & Busscher, 1991).

The pH control allowed for better cell growth at all tested temperatures (21.5% higher as an average), and the highest cell concentration (7.1 ± 0.1 g/L) was obtained at 37°C after 16 h. Possibly, without any pH control, the acidity of the medium may have inhibited the growth of microorganism (Parada et al., 2007).

The culture at 30°C with pH control showed higher STred after only 6 h (21.1 mN/m) compared with the one without pH control, which took more than twice as long to achieve the same reduction at the same temperature. On the other hand, cultivations at 37°C showed the opposite trend. In particular, with pH control STred after 6 h of culture (20.0 mN/m) was 11% lower and cell growth (6.0 g/L) 20% higher than without pH control.

In agreement with these results, Rodríguez et al. (2006a) observed that biosurfactant production by *L. lactis* 53 was associated with growth. However, Rodríguez et al. (2010) reported that, although ST decreased since the beginning of fermentation as a result of metabolism and growth, it achieved its maximum value (31.1 mN/m) at pH 6.8 in the early stationary phase, but then decreased to only 17.5 mN/m due to possible consumption of biosurfactant as a carbon source under conditions of substrate starvation. No similar decrease was observed in this study during the stationary phase of growth.

4. Conclusions

In this work, we studied the behavior of *L. lactis* in cultures performed at different temperatures with or without pH control. Under both conditions, the temperature range 30–37°C allowed for the largest bacteriocin production, as evidenced by the formation of inhibition zones against *Lactobacillus sakei* and *Staphylococcus aureus* 5–22% and 4–14% higher, respectively, compared with 40°C. At temperature of 37°C, without pH control, would be the best choice for mainly favoring biosurfactant production, as evidenced by a reduction in ST between 22.5 and 24.7 mN/m after 6–24 h of culture. In addition, this temperature would allow producing bacteriocin with satisfactory antimicrobial activity (mean inhibition zone of 9.3 and 12.9 mm against *L. sakei* and *S. aureus*, respectively) and lactic acid at concentration of 14.28 g/L, thus contributing to the economy of the process.

Acknowledgments

The authors would like to thank FAPESP (São Paulo Research Foundation) for the financial support by the grant number 2013/15065-0 and to CAPES (Coordination of High-Level Personnel Training, Brazil) for Prof. J. M. Domínguez fellowship as special visiting researcher (Science without Borders Program, project number 88881.062223/2014-01).

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

The authors would like to thank FAPESP (São Paulo Research Foundation) for the financial support by the grant number 2013/15065-0 and to CAPES (Coordination of High-Level Personnel Training, Brazil) for Prof. J. M. Domínguez fellowship as special visiting researcher (Science without Borders Program, project number 88881.062223/2014-01).

References

- Arauz, L.J., Jozala, A.F., Mazzola, P.G., & Penna, T.C.V. (2009). Nisin biotechnological production and application: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 20, 146–154. doi:10.1016/j.tifs.2009.01.056
- Banat, I., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M., Fracchia, L., ... Marchant, R. (2010). Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 427–444. doi:10.1007/s00253-010-2589-0
- Bustos, G., De La Torre, N., Moldes, A.B., Cruz, J.M., & Domínguez, J.M. (2007). Revalorization of hemicellulosic trimming vine shoots hydrolyzates through continuous production of lactic acid and biosurfactants by *L. pentosus*. *Journal of Food Engineering*, 78, 405–412. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.10.008
- Ceresa, C., Tessarolo, F., Caola, I., Nollo, G., Cavallo, M., Rinaldi, M., & Fracchia, L. (2015). Inhibition of *Candida albicans* adhesion on medical-grade silicone by a *Lactobacillus*-derived biosurfactant. *Journal of Applied Microbiology*, 118, 1116–1125. doi:10.1111/jam.12760
- Chen, W.C., Juang, R.S., & Wei, Y.H. (2015). Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 103, 158–169. doi:10.1016/j.bej.2015.07.009
- Cortés-Sánchez, A., Hernández-Sánchez, H., & Jaramillo-Flores, M.E. (2013). Biological activity of glycolipids produced by microorganisms: New trends and possible therapeutic alternatives. *Microbiological Research*, 168, 22–32. doi:10.1016/j.micres.2012.07.002
- Desai, J.D., & Banat, I.M. (1997). Microbial production of surfactant and their commercial potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61, 47–64.
- Galabova, D., Sotirova, A., Karpenko, E., & Karpenko, O. (2014). Role of microbial surface-active compounds in environmental protection. In M. Fanun (ed.), *The role of colloidal systems in environmental protection* (pp. 41–83). Amsterdam: Elsevier.
- Gudiña, E.J., Teixeira, J.A., & Rodrigues, L.R. (2011). Biosurfactant-producing lactobacilli: Screening, production profiles, and effect of medium composition. *Applied and Environmental Soil Science*, 1, 1–9. doi:10.1155/2011/201254
- Hofvendahl, K., Niel, E.W.J., & Hahn-Hägerdal, B. (1999). Effect of temperature and pH on growth and product formation of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ATCC 19435 growing on maltose. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51, 669–672. doi:10.1007/s002530051449
- Jha, S.S., Sanket, J., Joshi, S.J., & Geetha, S.J. (2016). Lipopeptide production by *Bacillus subtilis* R1 and its possible applications. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 955–964. doi:10.1016/j.bjm.2016.07.006
- Li, C., Bai, J., Cai, Z., & Ouyang, F. (2002). Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using a response surface methodology. *Journal of Biotechnology*, 93, 27–34. doi:10.1016/S0168-1656(01)00377-7
- Machado, T.R., Mohideen, R.A.H., Saravanakumari, M., & Prabhavathi, P. (2013). Anti adhesive, antimicrobial and biodegradability assay of a lipopeptide biosurfactant from *Lactococcus lactis*. *International Journal of Science Innovations and Discoveries*, 3, 478–483.

- Mayo, B., Aleksandrac-Plekacz, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martin, P., & Bardowski, J. (2010). Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. In F. Mozi, R.R. Raya, & G.M. Vignolo (Eds.), *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel applications* (pp. 3–33). Iowa, USA: Wiley-Blackwell.
- Moreno, L., Lerayer, A.S.L., Baldini, V.L.S., & Leitão, M.F.F. (2000). Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 184–192. doi:10.1590/S1517-83822000000300007
- Mulligan, C.N., Sharma, S.K., Mudhoo, A., & Makhijani, K. (2014). Green chemistry and biosurfactant research. In C.N. Mulligan, S.K. Sharma, & A. Mudhoo (Eds.), *Biosurfactants: Research trends and applications* (pp. 1–30). Boca Raton: CRC Press.
- Oludunjoye, A.O., Singh, S., & Ijabadeniyi, O.A. (2016). Inactivation of *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 on fresh-cut tomato using nisin in combinations with organic salts. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 757–763. doi:10.1016/j.bjm.2016.04.027
- Panesar, P.S., Kennedy, J.F., Gandhi, D.N., & Bunko, K. (2007). Bioutilization of whey for lactic acid production. *Food Chemistry*, 105, 1–14. doi:10.1016/j.foodchem.2007.03.035
- Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P., & Soccol, C.R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 50, 521–542. doi:10.1590/S1516-89132007000300018
- Penna, T.C.V., Jozala, A.F., Gentile, T.R., Pessoa, J.A., & Cholewa, O. (2006). Detection of nisin expression by *Lactococcus lactis* using two susceptible bacteria to associate the effects of nisin with EDTA. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 121, 334–346. doi:10.1007/978-1-59745-269-7_27
- Portilla-Rivera, A.O.M., Moldes, A.B., Torrado, A.M., & Domínguez, J.M. (2008). Stability and emulsifying capacity of biosurfactants obtained from lignocellulosic sources using *Lactobacillus pentosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 8074–8080. doi:10.1021/jf801428x
- Rodrigues, L., Teixeira, J., Oliveira, R., & Van Der Mei, H.C. (2006a). Response surface optimization of the medium components for the production of biosurfactants by probiotic bacteria. *Process Biochemistry*, 41, 1–10. doi:10.1016/j.procbio.2005.01.030
- Rodrigues, L., Teixeira, J.A., & Oliveira, R. (2006b). Low-cost fermentative medium for biosurfactant production by probiotic bacteria. *Biochemical Engineering Journal*, 32, 135–142. doi:10.1016/j.bej.2006.09.012
- Rodrigues, L.R., Teixeira, J.A., Van De Mei, H.C., & Oliveira, R. (2006c). Physicochemical and functional characterization of a biosurfactant produced by *Lactococcus lactis* 53. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 49, 78–85. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.03.003
- Rodríguez, N., Salgado, J.M., Costés, S., & Domínguez, J.M. (2010). Alternatives for biosurfactants and bacteriocins extraction from *Lactococcus lactis* cultures producer under different pH conditions. *Letters in Applied Microbiology*, 51, 226–233. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02882.x
- Rodríguez-Pazo, N., Salgado, J.M., Coté-Diéguez, S., & Domínguez, J.M. (2013). Biotechnological production of phenyllactic acid and biosurfactants from trimming vine shoot hydrolyzates by microbial coculture fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169, 2175–2188. doi:10.1007/s12010-013-0126-1
- Rosa, C.M., & Franco, B.D.G.M. (2002). Bacteriocinas de bacterias lácticas. *Conscientiae Saúde*, 1, 9–15. doi:10.5585/conssaude.v1i0.156
- Sabo, S.S., Conventi, A., Todorov, S.D., Domínguez, J.M., & Oliveira, R.P.S. (2015). Effect of inulin on growth and bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* in stationary and shaken cultures. *International Journal of Food Science and Technology*, 50, 864–870. doi:10.1111/ijfs.12711
- Sadiq, S., Imran, M., Hassan, M.N., Iqbal, M., Zafar, Y., & Hafeez, F.Y. (2014). Potential of bacteriocinogenic *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* inhabiting low pH vegetables to produce nisin variants. *LWT - Food Sciences and Technology*, 59, 204–210. doi:10.1016/j.lwt.2014.05.018
- Sharma, D., Saharan, B.S., Chauhan, N., Bansal, A., & Procha, S. (2014). Production and structural characterization of *Lactobacillus helveticus* derived biosurfactant. *The Scientific World Journal*, 1, 1–9. doi:10.1155/2014/493548
- Souza, E.C., Penna, T.C.V., & Oliveira, R.P.S. (2014). Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89, 88–94. doi:10.1016/j.ibiod.2014.01.007
- Van Der Veit, W., Van Der Mei, H.C., Noordmans, J., & Busscher, H.J. (1991). Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 766–770. doi:10.1007/BF00169892
- Von Wright, A., & Axelsson, L. (2012). Lactic acid bacteria: An introduction. In S. Lahtinen, A.C. Ouwehand, S. Salminen, & A. Von Wright (Eds.), *Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects* (pp. 1–16). Boca Raton, FL, USA: CRC Press.
- Yoneyama, H., & Katsumata, R. (2006). Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 1060–1075. doi:10.1271/bbb.70.1060

Artigo Submetido – Central Composite Design (ccd) 24 for otimization of biosurfactant and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. Para o periódico: *Waste Management*

Elsevier Editorial System(tm) for Waste
Management
Manuscript Draft

Manuscript Number: WM-17-1406

Title: CENTRAL COMPOSITE DESIGN (CCD) 24 FOR OTIMIZATION OF BIOSURFACTANT
and BACTERIOCIN PRODUCTION BY *Lactococcus lactis* CECT-4434 FROM
AGROINDUSTRIAL WASTE

Article Type: Full Length Article

Keywords: *Lactococcus lactis*; biosurfactant; bacteriocin; low-cost
substrates; whey; central composite design.

Corresponding Author: Professor Ricardo Pinheiro Oliveira, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: University of São Paulo

First Author: Ellen Souza Vera, PhD

Order of Authors: Ellen Souza Vera, PhD; José Manuel Domínguez, PhD;
Ricardo Pinheiro Oliveira, Ph.D.

Abstract: Low-cost substrates and wastes as fermentative media is a basic strategy for overcoming excessive production costs of biosurfactants and to make the process more profitable. This work aimed to optimize the production of biosurfactant by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from whey and vinasse coming from the winery industry. For this, a 24 central composite design (CCD) was proposed to maximize biosurfactant production. Besides, the ability of *Lc. lactis* to synthetize bacteriocin was also evaluated, therefore contributing to the profitability of the biotechnological process. Results showed that whey at 15% positively influenced biosurfactant production (on average 8.9 mg/L), reducing surface tension by about 18.1 mN/m, meanwhile sucrose (1%) was the variable that most interfered for bacteriocins synthesis with an increase of the inhibition zone in 14.2%.

De: "Waste Management" <eesserver@eesmail.elsevier.com>

Para: rsolive@usp.br

Envia: Sexta-feira, 16 de Junho de 2017 7:39:02

Assunto: WM-17-1406 Submitted Manuscript

Ms. Ref. No.: WM-17-1406

Title: CENTRAL COMPOSITE DESIGN (CCD) 24 FOR OTIMIZATION OF BIOSURFACTANT and BACTERIOCIN PRODUCTION BY *Lactococcus lactis* CECT-4434 FROM AGROINDUSTRIAL WASTE
Waste Management

Dear Pinheiro,

Thank you for submitting your manuscript to Waste Management. Your submission has been assigned manuscript number WM-17-1406. Please note this number and include it in the subject line on any future correspondence.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <https://ees.elsevier.com/wm/>
 2. Enter your login details
 3. Click [Author Login]
- This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

As with most peer-reviewed journals, the review process may take some time to complete. We understand the importance of publishing papers in a timely manner and we will make every effort to move your manuscript forward as quickly as possible. We kindly ask for your patience during this time.

Thank you for your interest in Waste Management.

Kind regards,

Managing Editor
Waste Management

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:

http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

Participação – FARINHA, L.R.L.; SABO, S.S.; PORTO, M.C.; SOUZA, E.C.; OLIVEIRA, M.N.; OLIVEIRA, R.P.S. Influence of Prebiotic Ingredients on the Growth Kinetics and Bacteriocin Production of *Lactococcus lactis*. *Chemical Engineering Transactions*, v.43, p.313-318, 2015

CHEMICAL ENGINEERING TRANSACTIONS

VOL. 43, 2015

Chief Editors: Sauro Pierucci, Jiří J. Klemeš
Copyright © 2015, AIDIC Servizi S.r.l.,
ISBN 978-88-95608-34-1; ISSN 2283-9216

A publication of

The Italian Association
of Chemical Engineering
Online at www.aidic.it/cei

Influence of Prebiotic Ingredients on the Growth Kinetics and Bacteriocin Production of *Lactococcus lactis*

Luiz R. L. Farinha, Sabrina S. Sabo, Maria C. Porto, Ellen C. Souza, Maricê N. Oliveira, Ricardo P. S. Oliveira

Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, Brazil
rpsolive@usp.br

Prebiotic ingredients are increasingly added to food preparations containing probiotics in order to enhance probiotic survival and growth. Bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* (nisin) have great advantages as a food additive, such as heat stability, nontoxicity and sensitivity to digestive proteases. In this context, the aim of this study was to evaluate the influence of prebiotic ingredients on the fermentation kinetics and antimicrobial activity by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 against *Lactobacillus sakei*. *Lc. lactis* was cultivated in MRS medium (Man, Rogosa and Sharpe) supplemented with or without (control) fructooligosaccharides (MRS+FOS), polydextrose (MRS+PD) and inulin (MRS+IN). All cultivations were carried out in shaken flasks at 30 °C with agitation speed of 100 rpm. Samples were collected for analyses (biomass, specific growth rate, generation time and antimicrobial activity) every two hours during the 48 h of cultivation. The exponential growth phase of *Lc. lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 occurred at intervals of 2-8 h for all runs (MRS, MRS+FOS, MRS+PD e MRS+IN). The use of all prebiotic ingredients increased cell biomass, specific growth rate and consequently decreased generation time when compared with control (only MRS). Antimicrobial activity of nisin produced by *Lc. lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 was detected against *Lactobacillus sakei* strain.

1. Introduction

Recently, the influence of prebiotic ingredients over the cellular growth of lactic acid bacteria (LAB) has sparked an increased interest due to their properties as a functional food and their beneficial effects to the health and well-being of those ingesting them. Functional dairy products contain probiotic microorganisms belonging to the *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* and *Saccharomyces* genera. These products have been historically defined as food containing live microorganisms that improve the host's health through the improvement of the microbiotic balance in the human intestinal tract (Tamine, Saarela, Sondergaard, Mistry & Shad, 2005). By definition, probiotics, including some species of *Lactococcus*, are known as living microorganisms which, when used in adequate quantities, provide benefits to the host's health due to being capable of surviving the trip through the upper digestive tract, adhering to intestinal cells and contributing to intestinal balance (FAO/WHO, 2002; Martinez et al., 2013). Prebiotics are non-digestible hydrocarbons that, through an absorption process, resist hydrolysis in the upper gastrointestinal tract of humans (Mattila-Sandholm et al., 2002; Apolinário et al., 2014). When consumed in adequate amounts, these ingredients reach the colon still intact and improve the modulation and composition of the intestinal microbiota, providing benefits to the host's health and, therefore, of the users (Saad et al., 2013; Roberfroid, 2007; Roberfroid et al., 2010). Rastall (2010) studied the applications and the industrialization of prebiotics and reported that, although several hydrocarbons are marketed as prebiotics throughout the world, the most prominent ones are the

314

inulin, the fructooligosaccharides (FOS) and the galactooligosaccharides (GOS). Those are, therefore, the most widely studied hydrocarbons in human clinical tests.

Previous studies have assessed the influence of several prebiotics in the growth and acidification of pure probiotic cultures and co-cultures in skimmed fermented milk. These studies reported that the addition of inulin significantly reduces the fermentation time and increases the viability of probiotic bacteria (Oliveira et al., 2011).

In order to achieve a better understanding of the functional activity of prebiotics over probiotic bacteria, it is necessary to develop better symbiotic preparations. The success in the establishment of the necessary symbiotic condition is closely related to the compatibility between the chosen components, that is to say, between the prebiotic ingredients and the probiotic bacteria (Mei et al., 2011; Pranckute et al., 2014; Muñoz et al., 2012). The authors suggest that strains of *Lactobacillus* sp. and *Lactococcus* sp. may be useful as probiotic bacteria when used together with prebiotics (palatinose, inulin and α -cyclodextrin) so as to create a symbiotic development, which could control not only the growth of beneficial bacteria in the gastrointestinal tract, but also their antibacterial activity.

Under the light of this information, this study aims at assessing the influence of several prebiotic ingredients FOS, polydextrose and inulin over the cellular growth of the *Lactococcus lactis* CECT 4434 bacterial strain and evaluate the growth kinetics parameters (μ_{max} e t_g) when cultivated in MRS medium (Man, Rogosa and Sharpe) supplemented or not (control) with fructooligosaccharides (MRS+FOS), polydextrose (MRS+PD) and inulin (MRS+IN). The antimicrobial capacity of the bacteriocin produced by *Lc. lactis* was also evaluated in contrast to the bioindicator strain *Lactobacillus sakei*.

2. Material and methodology

2.1 Microbial culture and growth medium

The strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434, obtained from the Spanish Cultivation Collection (CECT), was cultivated in MRS medium (Man, Rogosa and Sharpe) supplemented or not (control) with fructooligosaccharides (MRS+FOS), polydextrose (MRS+PD) and inulin (MRS+IN). The MRS growth medium contains 20 g/L of polydextrose. For the formulation of the MRS+FOS, MRS+PD and MRS+IN, the dextrose polysaccharide was substituted respectively by 20 g/L of fructooligosaccharides, polydextrose and inulin.

2.2 Inoculum preparation and cultivation conditions

The inoculum was prepared with the addition of 100 μ L of the stock culture in a 250 mL Erlenmeyer flask containing 100 mL of MRS supplemented with one of the hydrocarbons. The flasks were then incubated in a shaker at 100 rpm and 30°C until a cellular concentration of 0.8 – 0.9 D.O. units at 600 nm.

The cultivation of *Lc. lactis* CECT 4434 was conducted with the addition of 10% (v/v) of the inoculum in 250 mL Erlenmeyer flasks containing 100 mL of MRS supplemented individually with the prebiotic ingredient under analysis. The flasks were then incubated at a shaker at 100 rpm and 30°C for 48 hours. Samples were collected every 2 hours for a period of 12 hours and then at intervals of 12 hours, with a total cultivation time of 48 hours.

2.3 Analysis Procedures

In the monitoring process of the cellular growth, the relationship between D.O. (600 nm) and dry mass (mL) was observed after filtration of the growth medium through a 0.22 μ m membrane (Millipore). Through this relationship, a calibration curve was obtained, represented by the following equation (1)

$$= 2.0076 + 0.00182 \quad (1)$$

2.4 Growth Kinetics

The growth kinetics for *Lc. lactis* CECT 4434 was investigated during the fermentation, both in the absence of prebiotics (control) and in their presence. The maximum specific speed for the growth (μ_{max}) was calculated during the exponential growth phase through the following equation (2).

$$= \frac{1}{(t_2 - t_1)} \ln \frac{X_2}{X_1} \quad (2)$$

with X_2 and X_1 representing respectively the dry mass values, in (g/L), at t_1 and t_2 .

The generation time was determined through equation (3).

$$t_g = \ln 2 / \mu_{max} \quad (3)$$

2.5 Determination of antimicrobial activity

For detection of bacteriocin activity, samples were centrifuged at 16,000 *g* at 4 °C for 10 minutes. The pH of the supernatant was neutralized to 6.0 – 6.5 using 1 M NaOH in order to eliminate the action of organic acids. In addition, the supernatant was submitted to 80 °C for 10 minutes to eliminate possible proteases. After treatment of the supernatant, it was tested against the strains *L. sakei* ATCC 15521 to evaluate its antimicrobial activity. This test was performed by the agar diffusion assay, in which 10 µL of the indicator strain were transferred to a Petri dish containing 15 mL of MRS agar (Difco, Detroit, MI, USA). Once solidified, 10 µL of supernatant were pipetted on the agar surface. The plates were incubated at 30 °C for 18 to 24 hours and after this period it was possible to observe zones of inhibition.

3. Results and discussion

In the monitoring process of the cellular growth, the relationship between D.O. (600 nm) and dry mass (mL) was observed after filtration of the growth medium through a 0.22 µm membrane (Millipore).

The results shown at Figure 1 enable a comparison between the cellular growth curves of *Lc. lactis* CECT 4434, cultivated in MRS medium supplemented or not (control) with fructooligosaccharides (MRS+FOS), polydextrose (MRS+PD) and inulin (MRS+IN).

Upon analyzing the growth curves regarding the cellular concentration, a behavior similar may be observed in terms of *Lc. lactis* CECT 4434 biomass formation for MRS (control), (MRS+FOS) and (MRS+PD) growth media, with values obtained at the tenth hour respectively of 0.94, 0.88 and 0.86 (g/L). On the other hand, under a prebiotic supplement, such as with (MRS+FOS) and (MRS+PD), there was an increase on the formation of biomass starting at 10 hours in contrast with MRS medium with no supplement.

It is evident that the cultivation of *Lc. lactis* CECT 4434 supplemented with inulin (MRS+IN) presented influence over the increase in the biomass production during the 48 hour cultivation. The cellular concentration values of *Lc. lactis* CECT 4434 with inulin as a supplement (MRS+IN) and with no supplement (control) were 1.48 and 0.98 (g/L) respectively.

These results highlight that the biomass production for *Lc. lactis* CECT 4434 is higher when supplemented with inulin, corresponding to the studies conducted by Oliveira *et al.* (2011), Oliveira *et al.* (2012) and Likotraftiti *et al.* (2014), which reported similar results regarding the capacity to increase the cellular count of probiotic microorganisms in cultivations supplemented with inulin.

In addition, in recent study, Kondepudi *et al.* (2012) demonstrated that prebiotic oligosaccharides, such as FOS and GOS may be used as a promising culture medium to optimize the production of probiotic *Bifidobacterium* species. We also observed an increase in the concentration of the *B. breve*, *B. lactis* and *B. longum* biomass, as well as of some BAL, for instance, the *Lactococcus lactis*. The latter showed antimicrobial activity against *Clostridium difficile*.

The effect of the FOS metabolism, extracted from corn silage and molasses, by *Lactobacillus* strains, in the production of bacteriocin, was investigated by Muñoz *et al.* (2012). In this study, it was confirmed that the different lactic acid bacteria LAB, for instance, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Leuconostoc* were able to use the FOS determined by the count of viable cells (CFU) successfully. An increase in viable cells count of BAL in the MRS growing medium, supplemented with FOS, was verified, unlike MRS culture medium without supplementation (control), which had a lower score.

Makelainen *et al.* (2010) evaluated the ability of different prebiotics, such as FOS and xylooligosaccharides (XOS), as potential candidates for carbon source to probiotic bacteria of the genres *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, as well as their spectrum of action to possible intestinal microbe pathogens, such as *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Staphylococcus* in pure cultures. These authors could identify bifidobacteria that had preference for oligosaccharides, thus showing that the culture medium containing FOS and XOS, which have different degrees of polymerisation (DP) showed satisfactory fermentation, especially in strains of *B. lactis* and *B. adolescentis*, the *Lactobacillus*, in their turn, did not metabolize XOS efficiently. The same authors showed, in research published in 2010, that the FOS and GOS were fermented by a wide range of tested microorganisms, especially the *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*, denoting the non-selectivity of FOS in pure culture studies. The researchers emphasized that the FOS are not selective only to the genera considered beneficial, but also to other intestinal microorganisms, such as *Bacteroides spp.*, *Clostridium spp.*, and *Eubacterium spp.*

Mei *et al.* (2011) attributed the growth of probiotic bacteria to the influence of the FOS, which is directly related to the composition of FOS, like the $\beta(2 \rightarrow 1)$ fructans of short chains, once these greatly support the growth of probiotic microorganisms, when compared to the longer-chained $\beta(2 \rightarrow 1)$ fructans. Therefore, the authors could confirm that all $\beta(2 \rightarrow 1)$ fructans with glycosidic links are bifidogenic.

316

Figure 1. Comparison between the cellular growth curves for *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434 in MRS medium (control: ■) supplemented with (20g/L) of polydextrose (MRS+PD: ●), (20g/L) of fructooligosaccharides (MRS+FOS: ▲) and (20g/L) inulin (MRS+IN: ◆).

Upon observing the cellular concentration of *Lc. lactis* CECT 4434 cultivated in (MRS+IN) as a function of time, it is possible to observe a potential growth during the first 8 hours, reaching the peak biomass production at the eighth hour, with a dry mass value of 1.48 (g/L). Between 8 and 10 hours, the strain of *Lc. lactis* CECT 4434 presented a decrease in cellular production, reaching a dry mass value of 1.04 (g/L), and then presenting stability in cellular growth until 48 hours. These results are in accordance with a recent study conducted by Kassim *et al.* (2014) regarding the effect of chicory leaves, which contain inulin, as a growth medium for cultivating microorganisms from the *Lactococcus* and *Bifidobacterium* genera. The authors have identified a direct relation between the microorganisms' growth, especially those of the *Lactococcus* genus, in a growth medium containing inulin. Similar results have been reported by Oliveira *et al.* (2012), with inulin being among the best functional prebiotic ingredients for preparation of probiotic fermented milk, both for pure cultures and for binary co-cultures. In this study, the authors reported that the addition of inulin significantly reduced the time needed for fermentation, presenting higher biomass growth and an increase in the levels of diacetyl, acetone, lactic acid and acetic acid in both cultures (pure and/or co-culture). Mei *et al.* (2011) have based themselves on different linear chain compositions of FOS and inulin so as to assess how those are used by different probiotic strains. Therefore, the authors used chicory and oat as a source for FOS and inulin, observing that the twelve probiotic strains tested, from the *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and *Pediococcus* genera, were capable of metabolizing FOS and inulin so as to optimize the biomass production of these strains.

3.1. Effect of the addition of different prebiotics in the cellular growth kinetics of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 4434.

The data for maximum specific speed for growth () and the generation times for *Lc. lactis* CECT 4434 in MRS medium supplemented or not with prebiotics.

Table 1. Values for maximum specific velocity for growth () for *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and generation time (t_g) using MRS medium in the presence of polydextrose, fructooligosaccharides and inulin.

Growth media*	Maximum specific speed for growth () h^{-1}	$t_g(\text{h})$
MRS	0.13 ± 0.02^a	2.66 ± 0.08^a
MRS + FOS	0.48 ± 0.02^b	1.42 ± 0.04^c
MRS + PD	0.94 ± 0.03^c	0.75 ± 0.05^b
MRS + IN	1.01 ± 0.03^d	0.68 ± 0.06^c

Values followed by the same letter in the same column are not different from each other, with probability of 5% by Tukey's test. *MRS (Man, Rogosa and Sharpe); PD (polydextrose); FOS (fructooligosaccharides) and IN (inulin)

317

It is possible to observe that the maximum specific speed for growth (μ_{max}) in MRS medium and no supplement (control) was 0.13 h^{-1} , i.e. the lowest value among the tests, while the growth media supplemented with 20g/L of fructooligosaccharides (MRS+FOS), polydextrose (MRS+PD) and inulin (MRS+IN) presented values of 0.48, 0.94 and 1.01 h^{-1} , respectively. These results showed that the addition of prebiotic ingredients to the MRS medium in combination with the probiotic strain *Lc. lactis* CECT 4434, positively influenced the metabolism, not only increasing the biomass concentration, but also favoring higher values for growth specific speed, especially in the case of inulin. A similar result was observed by Oliveira *et al.* (2012), Sims *et al.* (2014) and Saad *et al.* (2013), who studied the symbiotic interaction of inulin as an stimulating factor for the growth of probiotic microorganisms.

Upon analyzing the generation time (t_g) for *Lc. lactis* CECT 4434 in a MRS medium supplemented or not (control) with polydextrose (MRS+PD), fructooligosaccharides (MRS+FOS) and inulin (MRS+IN), it is possible to highlight that t_g is inversely proportional to μ_{max} , that is to say, the lower the growth specific speed, the higher is the generation time for the microorganism in question. The strain of *Lc. lactis* CECT 4434 cultivated in MRS (control) multiplied every 2.65 h. On the other hand, in a MRS medium supplemented with inulin (MRS+IN), the strain multiplied every 0.68 h. These results indicate that the addition of prebiotics, specially polydextrose and inulin, reduced the generation time for the probiotic strain in contrast to the control.

3.2. Bacteriocin antimicrobial activity

Upon testing the antimicrobial activity of the supernatant obtained by treating the growth medium for *Lc. lactis* CECT 4434 in comparison with *L. sakei* ATCC 15521, a formation of inhibition zones which varied as a function of time was observed. The production of bacteriocin begins within 6 hours of cultivation, generating halos of 12.55 mm in diameter (average value obtained in MRS medium). This phase of the cultivation includes the exponential phase for the strain *Lc. lactis* CECT 4434. After 10 hours, the inhibition zones diameter increase to 15.55 mm, but decrease to 14.85 mm at 16 hours, probably due to a peptidic instability caused by the organic acids produced by the strain in question. The values obtained with the addition of prebiotics to MRS medium were on average 12% lower compared to the control (without supplementation). Gomes *et al.* (2012) observed a reduction of bacteriocin activity by approximately 50% and 62% when the inulin and oligofructose were added to MRS medium. On the other hand, Chen *et al.* (2007) reported that the addition of FOS and trehalose increased the bacteriocin production by *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* C101910.

4. Conclusion

The different prebiotic ingredients used as a growth medium for *Lc. lactis* CECT 4434 presented a positive influence over the growth of microbial biomass. With the fermentation process, it was possible to observe that the prebiotic ingredients foster cellular growth of *Lc. lactis* CECT 4434.

On the different tests conducted, it is possible to observe that the prebiotic ingredients, especially inulin, provided an increase in the maximum specific speed for growth (μ_{max}) and generation time (t_g). Furthermore, the antimicrobial activity of *Lc. lactis* CECT 4434 in supplemented cultivations with prebiotic fibers, in contrast with the strain *L. sakei* ATCC 15521, shows promise as food products may be created based on this symbiosis, which may be of commercial interest due to not having chemical preservatives, with the bacteriocin playing that role.

Acknowledgments

We are grateful to São Paulo Research Foundation (FAPESP, grant 2013/12713-1), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) for financial support.

References

- Apolinário, A. C., Damasceno, B. P. G. L., Beltrão, N. E. M., Pessoa Jr, A., Converti, A., Silva, J. A., 2014, Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology, Carbohydrate Polymers, 101, 368-378.
- Chen, Y.-S., Sriornual, S., Onda, T., Yanagida, F., 2007, Effects of prebiotic oligosaccharides and trehalose on growth and production of bacteriocins by lactic acid bacteria, Letters in Applied Microbiology, 45, 190–193.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization), 2002, Guidelines for the evaluation of probiotics in food, Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf> accessed 04.11.2014.

318

- Gomes, B. C., Rodrigues, M. R., Winkelströter, L. K., Nomizo, A., Martinis, E. C. P., 2012. *In vitro* evaluation of the probiotic potential of bacteriocin producer *Lactobacillus sakei* 1, *Journal of Food Protection*, 75, 1083-1089.
- Kassim, M. A., Baijnath, H., Odhav, B., 2014, Effect of traditional leafy vegetables on the growth of lactobacilli and bifidobacteria, *International Journal of Food Science Nutrition*, 1-4.
- Kondepudi, K. K., Ambalam, P., Nilsson, I., Wadstrom, W., Ljungh, A., 2012, Prebiotic-non-digestible oligosaccharides preference of probiotic bifidobacteria and antimicrobial activity against *Clostridium difficile*, *Anaerobe*, 18, 489-497.
- Likotrafiti, E., Tuohy, K. M., Gibson, G. R., Rastall, R. A., 2014, An *in vitro* study of the effect of probiotics, prebiotics and synbiotics on the elderly fecal microbiota, *Anaerobe*, 27, 50-55.
- Martinez, F. A. C., Balciunas, E. M., Salgado, J. M., Domínguez, J. M., Converti, A., Oliveira, R. P. S., 2013, Lactic acid properties, applications and production: A review, *Trends in Food Science & Technology*, 30, 70-83.
- Makelainen, H., Saarinen, M., Stowell, J., Rautonen, N., Ouwehand, A. C., 2010, Xylo-oligosaccharides and lactitol promote the growth of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus* species in pure cultures, *Beneficial Microbes*, 1, 139-148.
- Mattila-Sandholm, T., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M., 2002, Technological challenges for future probiotic foods, *International Dairy Journal*, 12, 173-182.
- Mei, G. Y., Carey, C. M., Tosh, S., Kostrzynska, M., 2011, Utilization of different types of dietary fibres by potential probiotics, *Canadian Journal Microbiology*, 57, 857-865.
- Muñoz, M., Mosquera, A., Alméida-Díaz, C. J., Melendez, A. P., Sánchez, O. F., 2012, Fructooligosaccharides metabolism and effect on bacteriocin production in *Lactobacillus* strains isolated from ensiled corn and molasses, *Anaerobe*, 18, 321-330.
- Oliveira, R. P. S., Perego, P., Oliveira, M. N., Converti, A., 2011, Growth and survival of mixed probiotics in nonfat fermented milk: the effect of inulin. *Chemical Engineering Transactions*, 24, 457-462.
- Oliveira, R. P. S., Perego, P., Oliveira, M. N., Converti, A., 2012, Growth, organic acids profile and sugar metabolism of *Bifidobacterium lactis* in co-culture with *Streptococcus thermophilus*: The inulin effect, *Food Research International*, 48, 21-27.
- Pranckute, R., Kaunietis, A., Kuisiene, N., Citavicius, D., 2014, Development of synbiotics with inulin, palatinose, α -cyclodextrin and probiotics bacteria, *Polish Journal of Microbiology*, 63, 33-41.
- Rastall, R. A., 2010, Functional Oligosaccharides: Application and Manufacture, *Food Science Technology*, 1, 305-339.
- Roberfroid, M., 2007, Prebiotics: the concept revisited, *Journal of Nutrition*, 137, 830-837.
- Roberfroid, M., Gibson, G. R., Hoyle, L., McCarney, A. L., Rastall, R., Rowland, I., 2010, Prebiotic effects: metabolic and health benefits, *British Journal of Nutrition*, 104 (Suppl. 2), S1-63.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M., Bressolier, P., 2013, An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field, *LWT – Food Science and Technology*, 50, 1-16.
- Sims, I. M., Ryan, J. L. J., Kim, S. H., 2014, *In vitro* fermentation of prebiotic oligosaccharides by *Bifidobacterium lactis* HN019 and *Lactobacillus* spp, *Anaerobe*, 25, 11-17.
- Tamime, A. Y., Saarela, M., Sondergaard, A. K., Mistry, V. V., & Shah, N. P., 2005, Production and maintenance of viability of probiotic micro-organisms in dairy products, Ed. Tamime, A. Y., *Probiotic dairy products*, 39-72, Oxford, England.

Pró-Reitoria de Pesquisa

22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP

Declaro, para os devidos fins que **Ellen Cristina Souza, participou como Avaliador(a)**, da 1ª Etapa do 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP - SIICUSP, no ano de 2014.

Prof. Dr. José Eduardo Krieger

Pró-Reitor de Pesquisa

Documento emitido às **14:36:34** horas do dia **07/01/2015** (hora e data de Brasília).

Código de controle: **RS2L-DLEU-P19Q-VQV1**

Documento válido até: **07/01/2018**

A autenticidade deste documento pode ser verificada na página da Universidade de São Paulo

<https://uspdigital.usp.br/webdoc/>

ANEXOS

DECLARAÇÃO DE DISPENSA DE AUTORIZAÇÃO DE COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica

DECLARAÇÃO DE DISPENSA DE AUTORIZAÇÃO DE COMITÊ DE ÉTICA

São Paulo, 30 de agosto de 2016

Eu, Ellen Cristina Souza N° USP 7757629, aluna de doutorado do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica na área de Tecnologia de Fermentações, sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de Souza Oliveira, venho por meio desta afirmar que o projeto de pesquisa intitulado “**Produção biotecnológica de biossurfactantes por *Lactococcus lactis* CECT-4434 a partir de resíduos agroindustriais e avaliação de suas propriedades**”, dispensa a autorização pelo Comitê de Ética visto que não serão envolvidos animais ou seres humanos para a realização dos experimentos.

Ellen Cristina Souza

Prof. Dr. Ricardo Pinheiro de S. Oliveira