UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Químico Farmacêutica

Área de Tecnologia Bioquímico Farmacêutica

Uso de soro de leite para obtenção de esporos de *Bacillus atrophaeus*
ATCC 9372 e de biossurfactantes

Larissa Salles de Freitas Lourencini

Dissertação para obtenção do
grau de MESTRE

Orientadora:
Profa. Dra. Marina Ishii

São Paulo
2014

Larissa Salles de Freitas Lourencini

Uso de soro de leite para obtenção de esporos de *Bacillus atrophaeus*
ATCC 9372 e de biossurfactantes

Comissão Julgadora
para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Marina Ishii
Orientador/Presidente

Profa. Dra. Rita de Cassia Sinigaglia Galli Coimbra
1º. examinador

Profa. Dra. Thereza Christina Vessoni Penna
2º. examinador

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

Lourencini, Larissa Salles de Freitas
L892u Uso de soro de leite para obtenção de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 e de biossurfactantes / Larissa Salles de Freitas Lourencini. -- São Paulo, 2014.
56p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica.
Orientador: Ishii, Marina

1. Microbiologia aplicada 2. Esterilização 3. Fermentação
I. T. II. Ishii, Marina, orientador.

660.6 CDD

*Dedico este trabalho a minha família
pela fé e confiança depositada.
Aos meus amigos pelo apoio
incondicional.
A minha orientadora pela paciência
demonstrada no decorrer do trabalho.
Aos meus gatos pelo carinho e
companhia inestimáveis.*

Agradecimentos

Agradeço aos Deuses, pai e mãe, que iluminaram meu caminho durante toda esta caminhada.

À minha família, especialmente a minha mãe Isabel Rosane Salles de Freitas, seu cuidado e dedicação foram o que deram, a esperança para seguir e, a Aparecida Salles de Freitas pelo apoio vital em todos os caminhos da minha vida, sem vocês não teria alcançado e perseverado durante esta longa caminhada.

À minha alma gêmea, Paulo André Pereira, pessoa com quem amo partilhar a vida. Com você tenho me sentido mais viva. Obrigado pelo carinho, a paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada dia.

Aos meus gatos, Thor Von Teschen, Zack Hanson, Veida Svetlana, Sephora, Jack e Morgana pela companhia, paz e inspiração de vida; e ao meu querido esquilo Hermes Trimegisto.

Aos meus amigos, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhora tudo o que tenho produzido na vida.

À professora Dra. Marina Ishii pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão deste trabalho.

À todos os alunos do laboratório de Microbiologia Aplicada com quem mais aprendi do que ensinei durante toda esta jornada.

Ao Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica e às pessoas com quem convivi nesses espaços ao longo desses anos. A experiência de uma produção compartilhada na comunhão com amigos nesses espaços foram a melhor experiência da minha formação científica.

Agradeço ao mundo por mudar as coisas, por nunca fazê-las serem da mesma forma, pois assim não teríamos o que pesquisar, descobrir e fazer, pois através disto conseguimos desvendar cada passo da ciência.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.

Arthur Schopenhauer

Resumo

LOURENCINI, L.S.F. **Uso de soro de leite para obtenção de esporos de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 e de biossurfactantes**. 2014. 45f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Aproximadamente 85% do leite utilizado para manufatura de queijos é descartado em forma soro, um subproduto com alto valor nutricional, que, embora seja usado na alimentação animal, como fertilizante e em suplementos alimentares, é considerado um poluente ambiental quando descartado em efluentes sem o devido tratamento. No Brasil, 40% do soro de leite produzido pelas indústrias de laticínios são descartados como efluentes sem tratamento adequado e, uma alternativa de melhor aproveitamento é a sua utilização como meio de cultivo alternativo para obtenção de micro-organismos e biomoléculas de interesse farmacêutico e industrial. Esporos de *Bacillus atrophaeus* são amplamente utilizados como bioindicadores para esterilização, e também são conhecidos por expressar biossurfactantes, que possuem potencial atividade antimicrobiana e anti-adesiva. Devido a sua importância e ampla aplicabilidade, estudos que viabilizem a obtenção deste micro-organismo e seus subprodutos devem ser melhor explorados. O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização de soro de leite como meio de cultivo para obtenção de esporos de *B. atrophaeus* e de biossurfactantes, como forma de reaproveitamento do que seria descartado. *B. atrophaeus* foi cultivado em meios contendo de 2,5g/L a 40 g/L de carboidratos expressos em soro de leite, a 37°C por 24 horas, 3 e 6 dias, em meios líquido (em água) e sólido (1% ágar). Foram determinados a biomassa celular, a concentração de biossurfactantes e a resistência térmica dos esporos obtidos. Para o cultivo de 20g/L em meio líquido, a biomassa de 0,59 ($\pm$ 0,24) g/L, expressou 30,0 ($\pm$ 1,40) mg/L de biossurfactantes, o que corresponde a população de $4,8 \times 10^8$ esporos/mL e valor D = 2,73 min. Em meio sólido, em 20g/L, a biomassa de 0,65 ($\pm$ 0,01) g/L, expressou 48,1 ($\pm$ 2,84) mg/L de biossurfactantes, o que corresponde a população de $2,0 \times 10^8$ esporos/mL e valor D = 1,50 min, valor similar ao cultivo em PCA de no qual a biomassa de 1,22 ($\pm$ 0,01) g/L, expressou 59,3 ($\pm$ 0,4) mg/L de biossurfactantes, o que corresponde a população de $4,6 \times 10^8$ esporos/mL e valor D = 1,20 min. Os resultados demonstram a viabilidade do uso de soro de leite como meio para crescimento e esporulação de *B. atrophaeus* e biossurfactantes, podendo ser reaproveitado para obtenção de produtos de interesse farmacêutico e industrial.

Palavras-Chave: Soro de leite, *Bacillus*, esterilização, biossurfactantes e fermentação

Abstract

LOURENCINI, L.S.F. **Use of whey to obtain *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 spores and biosurfactants.** 2014. 45f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Approximately 85% of the milk used to manufacture cheese is discarded as whey, a byproduct with high nutritional value, which, it is used in animal in feeding, fertilizer and in food supplements, whey is considered an environmental pollutant when discarded without proper treatment. In Brazil, 40% of the whey produced by dairy industries is discarded as effluent without the necessary treatment and, an alternative for its use is the utilization as an alternative culture media to obtain microorganisms and biomolecules of pharmaceutical and industrial interest. Spores of *Bacillus atrophaeus* are widely used as bioindicators for sterilization, and are also known for biosurfactant expression, which possess antimicrobial and anti-adhesive activity. Due to its importance and broad applicability, studies that enable the obtainment of this microorganism and its subproducts must be explored. The objective of this study was to evaluate the utilization of whey as culture media to obtain *B. atrophaeus* spores and biosurfactants, in a way to reuse what it would be discarded. *B. atrophaeus* was cultivated in medias containing 2.5 g/L to 40.0 g/L of carbohydrates expressed in whey, at 37°C for 24 hours, 3 and 6 days, in medias reconstituted in liquid (water) and in solid state (1% agar). It was determined the biomass, biosurfactants concentration and thermal resistance of the obtained spores. For cultivation of 20.0 g/L in liquid state, the biomass was 0.59 ($\pm$ 0.24) g/L, and it has expressed 30.0 ($\pm$ 1.40) mg/L of biosurfactants, which corresponds a spore population of 4.8×10^8 spores/mL and D-value= 2.73 min. In 20.0 g/L at solid state, the biomass of 0.65 ($\pm$ 0.01) g/L, expressed 48.1 ($\pm$ 2.84) mg/L of biosurfactants, which corresponds to a spore population of 2.0×10^8 spores/mL and D-value= 1.50 min, similar value when cultivated in PCA which the biomass of 1.22 ($\pm$ 0.01) g/L, expressed 59.3 ($\pm$ 0.4) mg/L of biosurfactants, which corresponds to a spore population of 4.6×10^8 spores/mL and D-value = 1.20 min. The results have shown the viability of whey as culture media for growth and sporulation of *B. atrophaeus* and biosurfactants, which can be reused to obtain products of pharmaceutical and industrial interest.

Keywords: Whey, *Bacillus*, sterilization, biosurfactants and fermentation.

Lista de Figuras

Figura 1.	Esporos de <i>Bacillus subtilis</i> .	4
Figura 2.	Estrutura molecular padrão da surfactina.	9
Figura 3.	Suspensão de esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372.	14
Figura 4.	Placa de Petri com <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 para determinação de unidades formadoras de colônia.	14
Figura 5.	<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372 em caldo TSB vedados com gaze (A) e tampa emborrachada (B).	15
Figura 6.	Meios de cultivo de soro de leite reconstituído em água destilada e TSB.	17
Figura 7.	Curva de calibração de massa seca pela densidade ótica no crescimento de <i>Bacillus. atrophaeus</i> ATCC 9372.	19
Figura 8.	Curva de calibração de surfactina em água destilada D.	20
Figura 9.	Curva de calibração de glicose em água destilada.	21
Figura 10.	Curva de calibração de albumina sérica bovina.	22
Figura 11.	Esquema de cálculo para a determinação do valor D.	22

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Principais microrganismos produtores de biossurfactantes.	9
Tabela 2.	Biomassa, pH e concentração de biossurfactantes das frações cultivadas em 50 mL de TSB vedados com tampa e gaze por 24 horas.	24
Tabela 3.	Biomassa, pH e concentração de biossurfactantes das frações cultivadas em 100 mL de TSB vedados com tampa e gaze por 24 horas.	25
Tabela 4.	Valores de pH de meios contendo soro de leite, lactose e caseína após preparo, inoculados e após 24 horas de cultivo nas concentrações de 2,5 g/L, 5,0 g/L, 10,0 g/L e 20,0 g/L e TSB.	26
Tabela 5.	Produção biomassa de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 e expressão de biossurfactantes em diferentes concentrações de caseína, lactose e carboidratos expressos em soro de leite, após 24 horas de cultivo.	27
Tabela 6.	Composição do soro de leite e TSB.	28
Tabela 7.	Valores de fator de conversão (mg biossurfactante/g biomassa) e produtividade (g/L.h) de biossurfactantes e biomassa em diferentes concentrações de caseína, lactose e carboidratos expressos em soro de leite.	30
Tabela 8.	Determinação de glicose (g/L) e proteínas totais (g/L) sem inóculo e após 24 horas de cultivo em diferentes concentrações de caseína, lactose e carboidratos expressos soro de leite.	30
Tabela 9.	Valores de pH do soro de leite recém preparado, inoculado e após 3 e 6 dias cultivo em diferentes concentrações de carboidratos.	32
Tabela 10.	Produção biomassa de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 e expressão de biossurfactantes em diferentes concentrações de carboidratos expressos em soro de leite, após 3 e 6 dias de cultivo.	32
Tabela 11.	Valores de pH de biomassa e biossurfactantes cultivados em agar bacteriológico em diferentes concentrações de carboidratos expressos em soro de leite por 3 e 6 dias de cultivo.	33
Tabela 12.	Produção biomassa de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 e expressão de biossurfactantes em diferentes concentrações de carboidratos expressos em soro de leite em ágar bacteriológico, após 3 e 6 dias de cultivo.	34

Lista de Abreviações

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
g/L	Grama por litro
GRAS	<i>Generally regarded as safe</i>
IB	Indicador Biológico
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
SAL	<i>Sterility Assurance Level</i>
TSB	<i>Tryptic Soy Broth</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
mg/L	Miligrama por litro
nm	Nanômetros

Sumário

1. Justificativa	1
2. Introdução	2
2.1 Soro de Leite	2
2.2 Micro-organismos formadores de esporos	3
2.3 Esterilização e indicadores biológicos	4
2.4 Obtenção de produtos a partir do cultivo de <i>Bacillus</i>	6
2.5 Surfactantes e biossurfactantes	8
3. Objetivos	12
4. Material e Métodos	13
4.1 Microrganismos e meios de cultivo	13
4.2 Preparo da suspensão de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372	13
4.3 Avaliação da viabilidade de esporos de <i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372	14
4.4 Obtenção de esporos de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 em caldo TSB	15
4.4.1 Preparo de inóculo	15
4.4.2 Avaliação do cultivo	15
4.5 Obtenção de esporos de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372 em ágar	16
4.6 Avaliação da resistência térmica de esporos de <i>B. atrophaeus</i>	16
4.7 Avaliação do uso de soro de leite como meio de cultivo de esporos	17
4.7.1 Preparo de inóculo	17
4.7.2 Cultivo microbiano em soro de leite, lactose e caseína	17
4.7.3 Cultivo microbiano em meio sólido contendo soro de leite	18
4.8 Determinação de pH	19
4.9 Determinação da biomassa de <i>B. atrophaeus</i> ATCC 9372	19
4.10 Determinação da tensão superficial e concentração de biossurfactantes	20
4.11 Determinação de Glicose	20
4.12 Determinação de Proteínas Totais	21
4.13 Determinação do tempo de redução decimal (Valor D)	22
5. Resultados e Discussão	24
6. Conclusão	35
7. Referências Bibliográficas	36
8. Anexos	45

1. Justificativa

A indústria de laticínios gera elevadas quantidades de resíduos, entre eles o soro de leite, um subproduto com alto valor nutricional. Aproximadamente 85% do leite utilizado para manufatura de queijos é descartado em forma soro, que, embora seja utilizado na alimentação animal, como fertilizante e em suplementos alimentares, é considerado um importante poluente ambiental quando descartado em efluentes sem o devido tratamento. No Brasil, 40% do soro de leite produzido pelas indústrias de laticínios são descartados como efluente sem tratamento adequado e, uma alternativa para amenizar este problema ambiental, é a sua utilização como meio de cultivo para diversos micro-organismos (RHOLFES, 2005; PANESAR, et al. 2007; CAGRI-MEHMETOGLU, et al. 2012).

Bactérias do gênero *Bacillus* são microrganismos Gram-positivos, e que têm como principal característica a formação de esporos altamente resistentes a elevadas temperaturas, e por não serem patogênicos, são utilizados como indicadores biológicos em processos de esterilização. Além disso, membros do gênero *Bacillus*, são considerados microrganismos modelo na produção de biossurfactantes, entre eles, *Bacillus subtilis* (FEKETE, 2009; AL-BAHRY *et al.*, 2012). Além disso, são capazes de expressar biossurfactantes, ou surfactantes naturais, que possuem potencial atividade antimicrobiana e anti-adesiva.

Muitos resíduos do processamento de alimentos nas indústrias são descartados com elevado valor nutricional e poderiam ser destinados para estudos de otimização do cultivo de micro-organismos e a expressão de biomoléculas de interesse farmacêutico e industrial.

Mediante este quadro, devido a ampla e potencial aplicabilidade de esporos de *B. atrophaeus* e de suas biomoléculas, a utilização do soro de leite como meio de cultivo alternativo para produção de esporos resistentes de *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 e de biossurfactantes torna-se uma alternativa viável, econômica e com fins de minimizar a poluição ambiental que possa ser causada por estes tipos de resíduos.

2. Introdução

2.1 Soro de leite

A produção mundial de queijo gera cerca de 100 milhões de toneladas de soro de leite por ano, e é um poluente ambiental quando descartado em efluentes sem o devido tratamento, causando sérios problemas ambientais, afetando as estruturas físicas e químicas do solo, além de ser um risco à vida marinha por promover o decaimento do oxigênio dissolvido na água (SISO, 1996; PANESAR et al., 2007; KASSA et al.; 2008 e RHOLFES et al., 2011).

O soro de leite é o líquido do leite remanescente após a separação da coalhada, resultante da coagulação das proteínas do leite por enzimas ácidas ou proteolíticas. O tipo e a composição do soro de leite nas indústrias de laticínios dependem da técnica utilizada para remoção da caseína da parte aquosa do leite. Dois tipos de soro de leite são produzidos nas indústrias de laticínios, o doce (pH 6-7) e o ácido (pH<5), e sua diferenciação ocorre na técnica utilizada para precipitação da caseína (SISO, 1996 e PANESAR et al.; 2007).

Segundo a FAO (*Food and Agricultural Organization*), o queijo é um dos principais produtos agrícolas do mundo, e aproximadamente 85% do volume total de leite utilizado na manufatura do queijo é descartado como soro de leite. Para manufatura de 1 kg de queijo, gera-se 9 kg de soro de leite, e, dessa forma, uma indústria de laticínios que processa 100 toneladas de leite por dia produz aproximadamente a mesma quantidade de produtos orgânicos em efluentes que uma cidade de 55000 habitantes. Apesar de haver diversas possibilidades para tratamento do soro de leite, entre elas a precipitação, a coagulação e a floculação, o custo de seu tratamento tornou-se fator determinante para indústrias de laticínios (SISO, 1996; PANESAR et al.; 2007; KASSA et al.; 2008; CARVALHO et al.; 2013).

Sendo assim, o soro de leite é objeto de pesquisa em várias áreas do conhecimento há muitos anos, e é definido como o líquido remanescente da produção de leite seguido da precipitação e remoção de caseína durante produção de queijo. Este bioproduto da indústria de laticínios retém cerca de 55% dos nutrientes do leite e representa cerca de 85 a 90% do volume total de leite processado, mostrando ser um potencial substrato para processos fermentativos (SISO, 1996 e VAZQUEZ et al.; 2008).

Diversos estudos sobre a obtenção de bioprodutos foram realizados utilizando soro de leite como meio de cultivo alternativo.

GABARDO et al., 2014 estudaram a dinâmica de bioconversão de soro de leite em etanol a partir do cultivo de *Kluyveromyces marxianus*, e concluíram que o soro de leite é uma fonte viável de conversão em etanol, alcançando máxima produtividade em agitador orbital.

A produção de hidrogênio durante o processo de fermentação do soro de leite a partir do cultivo de bactérias psicrófilas foi estudada por DEBOWSKI et al., 2014. A máxima concentração de hidrogênio foi produzida por cepas de *Rahnella aquatilis*, mostrando que a produção de biogás utilizando soro de leite é uma aplicação promissora.

CLADERA-OLIVEIRA et al., 2004 estudaram a produção de bacteriocinas a partir do cultivo de *Bacillus licheniformis* em soro de leite. Os autores constataram que as variáveis de temperatura, pH e concentração do soro de leite influenciam na produção deste bioproduto. A máxima produção de bacteriocina foi observada com pH inicial de 6.5 e 7.5, temperatura entre 26 a 37°C e concentração de soro de leite de 70,0 g/L. Observou-se que o aumento da concentração do soro leite resultou no aumento da produção do bioproduto, no entanto, não foi possível estabelecer um paralelo entre produção de bacteriocina e crescimento bacteriano.

2.2 Micro-organismos formadores de esporos

Bactérias do gênero *Bacillus* e *Clostridium* são capazes de desencadear mudanças físicas e bioquímicas durante períodos de *stress* e/ou indisponibilidade de nutrientes para formar esporos robustos e dormentes para sua sobrevivência. O conhecimento do ciclo de vida do *Bacillus* e a estrutura de seu esporo é fundamental para entender a resistência do esporo a agentes físicos e químicos (TOBIAS et al, 2006 e SELLA et al., 2014).

Diferentes espécies de *Bacillus*, entre eles, *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus sporothermodurans* são capazes de formar esporos resistentes a temperaturas acima de 120°C (BERENDSEN et al., 2014). Esporos de *Bacillus atrophaeus* são amplamente utilizados como indicadores biológicos para esterilização, em estudos de biodefesa e astrobiologia, métodos e desinfecção, extração de DNA, avaliação no tratamento de resíduos e potencial adjuvante ou veículo para vacinas e outras biopartículas (NICHOLSON et al., 2012; BERENDSEN et al.; 2014; SELLA et al., 2014).

O ciclo de vida de *Bacillus* formadores de esporos consiste em três diferentes processos fisiológicos: (1) crescimento vegetativo, (2) esporulação e (3) germinação. A transição de um processo ao outro depende da disponibilidade de nutrientes. O crescimento binário de células

em estado vegetativo ocorre quando nutrientes estão disponíveis no meio, o processo de esporulação é desencadeado por múltiplos sinais do ambiente em que o *Bacillus* se encontra, tais como: privação de nutrientes, alta composição mineral, pH neutro, temperatura e alta densidade celular; os esporos pode permanecer dormentes por longos períodos de tempo e possuem reconhecida resistência a ambientes desfavoráveis ao crescimento, tais como, calor, radiação, agentes químicos e pH extremos (figura 1); sob condições favoráveis, os esporos quebram a dormência e recomeça sei processo de crescimento, este processo é chamada do germinação (SELLA et al.; 2014 e BERENDSEN et al.; 2014)

Figura 1. Esporos de *Bacillus subtilis* (LOPEZ et al., 2009)

2.3 Esterilização e Indicadores Biológicos

O processo de esterilização tem por finalidade remover, ou destruir todas as formas de vida, animal ou vegetal, macroscópica ou microscópica, do produto considerado, sem garantir a inativação de toxinas e enzimas celulares (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Visa a conservação, de modo a manter as características do produto durante a sua vida útil de armazenamento (vida de prateleira) a temperatura ambiente (VESSONI PENNA e MACHOSHVILI, 1997).

Os principais métodos de esterilização envolvem processos térmicos, como esterilização por calor úmido e seco, micro-ondas, laser, plasma, infravermelho e incineração; bem como agentes químicos, entre eles, ozônio, óxido de etileno, peróxido de hidrogênio, dióxido de carbono supercrítico (ELLIS et al.; 2010); e agentes radioativos com raio gama, ultravioleta, feixe de elétrons e cobalto 60 (OLIVEIRA et al.; 2010).

As Farmacopeias Brasileira, Britânica e Americana, recomendam cinco principais processos de esterilização, entre eles: esterilização por calor úmido e seco, gás, radiação

ionizante e filtração. A escolha do agente esterilizante a ser utilizado deve considerar a susceptibilidade de submeter o produto e a embalagem a altas temperaturas, afim de não haver perda ou degradação dos mesmos.

Os métodos de esterilização permitem assegurar níveis de esterilidade compatíveis às características exigidas em produtos farmacêuticos, médico-hospitalares e alimentícios. O método escolhido depende da natureza e da carga microbiana inicialmente presente na matéria-prima considerada. (VESSONI PENNA et al., 1997).

Indicador biológico (IB) é definido como uma preparação caracterizada de microrganismo específico, sendo utilizado para atestar a eficácia e monitorar processos de esterilização, além de avaliar a capacidade de descontaminação em ambientes assépticos (FARMACOPEIA AMERICANA, 2010; FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2010). Um indicador biológico consiste de um microrganismo específico, viável, de população conhecida, e resistência ao agente esterilizante determinado. A escolha do indicador biológico ideal para o processo de esterilização depende do artigo a ser esterilizado, visto que alguns produtos e/ou embalagens podem apresentar incompatibilidade com o processo de esterilização. Os IBs devem ainda ser facilmente cultiváveis, não patogênicos e apresentar resistência específica para o agente de esterilização comparada a resistência de microrganismos patogênicos ou potencialmente contaminantes (FARMACOPEIA AMERICANA, 2010; FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2010).

Esporos bacterianos são geralmente selecionados para serem utilizados como IBs, pois apresentam-se mais resistentes do que a biocarga comumente presente no artigo a ser esterilizado. A formação de esporos ocorre na fase estacionária do crescimento do microrganismo, e sua esporulação está intimamente ligada com as condições de cultivo, como o meio utilizado e os minerais presentes nele e tempo de incubação, e é durante a maturação do microrganismo que os esporos tornam-se resistentes a altas temperaturas (OOMES et al., 2009; SAWAI, et al., 2009; VESSONI-PENNA et al., 2000). Durante o processo de esterilização ocorre a perda córtex e a desnaturação da membrana. (REINEKE, et al.; 2011).

Esporos de *Geobacillus stearothermophilus*, são indicados para testar a eficácia de processos térmicos por calor úmido em temperaturas a partir de 121°C (DLUGOKENSKI, et al., 2011) Esporos de *Bacillus atrophaeus*, reclassificação de *Bacillus subtilis* var. *níger*, podem ser utilizados em processos térmicos por calor úmido, calor seco e também em processos de inativação química, utilizando-se por exemplo, óxido de etileno (LEE, et al., 2008), peróxido de hidrogênio (MALIK, et al., 2013) e *Bacillus pumilus* é aplicado para

inativação por radiação (FARMACOPEIA AMERICANA, 2010; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; OLIVEIRA, et al., 2010).

A esterilidade é definida com a ausência de microrganismos viáveis, e é assegurada a partir da validação de processos de fabricação de produtos estéreis. Falhas no processo de esterilização, ou validação incorreta, determinam o risco de um produto não estéril ou deteriorado. No entanto, há uma probabilidade estatística de que microrganismos possam sobreviver ao processo de esterilização. Por isso, define-se um nível de segurança de esterilidade, também denominado como SAL (*Sterility Assurance Level*). Em geral, o SAL empregado é de 10^{-6} , porém este nível depende da biocarga inicial, que advém da origem, natureza, preparação do produto e do processo de esterilização utilizado (BOCA et al, 2002; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010; FARMACOPEIA BRITÂNICA, 2010; LAMBERT et al., 2011).

2.4 Obtenção de produtos a partir de *Bacillus*

Além de sua aplicação como indicadores biológicos, microrganismos do gênero *Bacillus* são amplamente utilizados como ferramentas para obtenção de enzimas e proteínas de interesse industrial e biotecnológico com alto valor agregado. Estas cepas têm capacidade de secretar para o meio extracelular quantidades significativas de enzimas e outros produtos do metabolismo (SCHALLMEY et al., 2004).

MASSADEH e SABRA, 2011, avaliaram a produção de lipase a partir de *Geobacillus stearothermophilus*, variando-se os fatores de temperatura, pH, fonte de carbono, tempo de incubação e volume de meio. Observou-se que o crescimento foi favorecido em meio contendo óleo de oliva como fonte de carbono e incubado a 45°C, pH 8,0 por 24 horas.

KAPOOR et al., 2008, avaliaram a obtenção de xilanase a partir de *Bacillus pumilus* por fermentação submersa variando-se as fontes de nitrogênio. Observou-se que a melhor produção de xilanase ocorreu utilizando-se uma mistura de extrato de levedura e peptona, aminoácidos e vitaminas em pH 9,0 e sob agitação a 200 rpm por um período de 8 horas de incubação.

A otimização na produção de queratinases por *Bacillus pumilus* utilizando penas de galinhas, foi descrita por FAKHFAKH-ZOUARI et al., 2010. A otimização do meio e do cultivo foi realizada a partir variação na concentração de sais, a qual resultou um aumento significativo na produção de queratinase.

A produção de protease alcalina por *Bacillus subtilis* em meio sólido utilizando casca de batatas, e grama do tipo *Imperata cylindrica* foi descrito por MUKHERJEE et al., 2008. Entre os componentes utilizados, observou-se que extratos de carne e levedura demonstraram ser as melhores fontes de nitrogênio, e a caseína o melhor substrato enzimático na produção de protease alcalina.

RAHMAN e ANO, 2009 descreveram a produção de lipopeptídeos com atividade antimicrobiana a partir *Bacillus subtilis*. Os autores observaram que a ótima produção de iturina A ocorreu a 25°C por um período de incubação de até 4 dias, enquanto a surfactina teve sua melhor produção a 37°C por 24 horas de incubação.

ZOHORA et al., 2009 estudaram de iturina A em diferentes meio de cultivo contendo peptona a partir de *Bacillus subtilis*. Os autores observaram que a adição de potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), cisteína e celulose não favoreceu a produção de iturina A. No entanto, a adição de manganês (Mn^{2+}) no meio otimizou a produção de iturina A.

Na agroindústria, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus* e *Bacillus subtilis* podem ser aplicados como biofungicidas, sendo que o *Bacillus thuringiensis* esta presente em cerca de 70% no mercado de biopesticidas (PÉREZ-GARCÍA et al., 2011).

Vessoni-Penna, et al., 2000 estudaram a variação de componentes em um meio de cultivo para melhor esporulação de *Geobacillus stearothermophilus*, avaliando a formação de esporos, tempo de incubação e viabilidade. O meio contendo extrato de levedura e fosfato de potássio em um período de incubação de 6 dias mostrou-se ótimo, bem como, o meio contendo glicose para um período de incubação de 3 dias, ambos obtendo uma viabilidade desejável para um indicador biológico.

Além da obtenção de outros bioprodutos, *Bacillus subtilis*, reclassificado como *Bacillus atrophaeus* (BURKE et al., 2004) pode ser utilizado em combinação com outras moléculas de forma a melhorar a bioatividade. OLIVEIRA-NASCIMENTO et al., 2012 descreveram sobre esporos inativos de *Bacillus atrophaeus* como adjuvante para vacinas veterinárias contra a raiva conjugados ou não com saponinas como alternativa para aumentar a resposta do vírus da raiva inativo. Observou-se que os esporos inativos de *Bacillus atrophaeus* combinados com saponina aumentam a potencialidade da vacina, além de ter uma boa estabilidade quando armazenado 4 a 8°C por até 21 meses, tornando-se assim uma alternativa comercial viável.

2.5 Surfactantes e Biossurfactantes

Surfactantes são compostos anfifílicos, contendo em sua molécula uma parte hidrofóbica e uma parte hidrofílica, que tendem à separação de fases fluídas, com diferentes graus de polaridade e pontes de hidrogênio, tais como, interfaces de óleo/água ou ar/água. Esta característica confere aos surfactantes seu uso como excelente detergente, emulsificante e agente dispersante, o que o torna um dos mais versáteis produtos químicos. (KAHN et al.; 2011 e VAZ et al.; 2012).

Biossurfactantes são compostos de origem microbiana capazes de reduzir a tensão superficial em soluções aquosas, e podem ser produzidos a partir de diferentes reinos de microrganismos, tais como bactérias, fungos e leveduras (BARROS, et al., 2007; PORNSUNTHORNTAWEE et al., 2008, XIA et al., 2011).

O interesse por biossurfactantes tem sido alvo de importantes estudos em diversas áreas do conhecimento, visto sua diversidade, possibilidade de produção por fermentação, potencial de aplicação na proteção ambiental, no uso de pesticidas, recuperação de petróleo bruto, cuidados a saúde na área farmacêutica e hospitalar, na manipulação de cosméticos, na agroindústria e em processos alimentícios, além de ser uma tecnologia mais sustentável e ecologicamente correta comparado aos surfactantes sintéticos. (RAHMAN, et al., 2007, KAHN et al.; 2011, AMANI, et al., 2010).

Os biossurfactantes são classificados em quatro diferentes grupos: de lipopeptídeos e lipoproteínas, glicolípídios, fosfolípídios e surfactantes poliméricos, e possuem atividades antibacteriana, antitumoral, antiadesiva e antifúngica, destacando-se neste grupo, os lipopeptídeos, tais como, a viscosamina, a surfactina (Figura 2), a iturina A e a fengicina (NITSCHKE e PASTORE, 2006; RAHMAN, et al.; 2007; ESMERALDO, 2010).

Tabela 1. Principais microrganismos produtores de biossurfactantes (BARROS, 2007)

Tipo de Biossurfactantes	Microrganismos
Lipopolisacarídeos	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Candida lipolytica</i>
Glicolípidos	<i>Alcanovorax borkumensis</i> <i>Arthrobacter sp.</i> <i>Corynebacterium sp.</i> <i>Serratia marcescens</i>
Fosfolípidos	<i>Acinetobacter sp.</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumilus</i>

Entre as diversas classes de biossurfactantes e de seus microrganismos produtores, os lipopeptídeos são os mais largamente estudados, visto sua elevada atividade superficial e potencial terapêutico. A surfactina, é o lipopeptídeo mais conhecido produzido por *Bacillus subtilis*, e é considerada o biossurfactante mais eficiente, podendo apresentar tensão superficial de 27,9 mN/m (ABDEL-MAWGOUD et al., 2008, VAZ et al.; 2012).

Figura 2. Estrutura molecular padrão da surfactina (BANAT et al., 2010)

Biossurfactantes oriundos dos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* são os mais comumente avaliados e utilizados como agentes de biocontrole, com compostos de ação antibacteriana, antifúngica e antiviral e na indústria cosmética (PORNSENTHORNTAWEE, et al., 2008).

Além de propriedade terapêutica (SARAVANAKUNAMI e MANI, 2010), é utilizado também em produtos limpeza por sua característica detergente eficaz na remoção de óleos em solos, água e em tecidos de algodão, este último evidenciado com biossurfactantes produzidos a partir de *Klebsiella* sp. (JAIN et al, 2012; LEE et al., 2008).

RAHMAN e ANO, 2009 descreveram a produção de lipopeptídeos com atividade antimicrobiana a partir *Bacillus subtilis*. Os autores observaram que a ótima produção de iturina A ocorreu a 25°C por um período de incubação de até 4 dias, enquanto a surfactina teve sua melhor produção a 37°C por 24 horas de incubação.

ZOHORA et al., 2009 estudaram de iturina A em diferentes meio de cultivo contendo peptona a partir de *Bacillus subtilis*. Os autores observaram que a adição de potássio (K^+), cálcio (Ca^{2+}), cisteína e celulose não favoreceu a produção de iturina A. No entanto, a adição de manganês (Mn^{2+}) no meio otimizou a produção de iturina A.

Além da obtenção de outros bioprodutos, *Bacillus atrophaeus*, pode ser utilizado em combinação com outras moléculas de forma a melhorar a bioatividade. OLIVEIRA-NASCIMENTO et al., 2012 descreveram sobre esporos inativos de *Bacillus atrophaeus* como adjuvante para vacinas veterinárias contra a raiva conjugados ou não com saponinas como alternativa para aumentar a resposta do vírus da raiva inativo. Observou-se que os esporos inativos de *Bacillus atrophaeus* combinados com saponina aumentam a potenciabilidade da vacina, além de ter uma boa estabilidade quando armazenado 4 a 8°C por até 21 meses, tornando-se assim uma alternativa comercial viável.

OLIVEIRA et al., 2013 estudaram a produção de biossurfactantes em um meio de baixo custo utilizando sucos de caju e maçã a partir de *Bacillus subtilis* LAM1005. Os autores observaram que a produção de biossurfactante foi otimizada com a suplementação de sulfato de amônia ($(NH_4)_2SO_2$) no meio de cultivo utilizado, em um período de incubação de 24 a 48 horas.

NALISHA et al., 2006 avaliaram a produção compostos antifúngicos a partir de *Bacillus subtilis* incubado em caldo de dextrose de batata em diferentes faixas de pH e temperatura. Os autores observaram que a melhor atividade antifúngica frente a *Sclerotium rolfsii* ocorreu quando adicionou-se ao meio de cultivo de óleo de palma como fonte de carbono em pH 11 com estabilidade térmica em até 80°C.

RIVERA, et al., 2007 utilizaram bagaço de uva na produção simultânea de ácido láctico e biossurfactante a partir de *Lactobacillus pentosus*. Observou-se que apenas a produção do ácido láctico foi satisfatória nas condições descritas pelos autores, a produção de biossurfactante não foi considerada relevante.

A produção de biosurfactante utilizando meio sólido utilizando farinha de soja e palha de arroz como substratos a partir de *Bacillus amyloliquefaciens* foi estudada por ZHU, et al., 2012. Os autores observaram que a melhor produção de lipopeptídeos ocorreu em 48 horas de incubação a 30°C. Observou-se que o lipopeptídeo produzido demonstrou atividade antimicrobiana frente as cepas *Ralstonia solanacearum* e *Rhizoctonia solani*.

3. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo principal avaliar o uso de soro de leite, um resíduo agroindustrial, como meio de cultivo alternativo para obtenção de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 e de biossurfactantes, alvos de interesse farmacêutico e industrial.

Para tanto, foram desenvolvidos os seguintes objetivos específicos:

- produção e avaliação da viabilidade de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 em meio líquido (TSB) e sólido (PCA);
- produção e avaliação da viabilidade de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 em meio líquido e sólido contendo soro de leite;
- determinação e comparação da biomassa e da quantidade de biossurfactantes produzidos nas diferentes condições de cultivo;
- determinação da resistência térmica dos esporos obtidos por meio do tempo de redução decimal, valor D.

4. Material e Métodos

4.1 Microrganismos e meios de cultivo

Utilizou-se a cepa de *B. atrophaeus* ATCC 9372 para a produção de esporos e biossurfactantes. Os meios de cultivo *Plate Count Agar* (Oxoid, Basingstone, Hants, Inglaterra) e *Tryptic Soy Broth* (Bacto™, Franklin Lakes, NJ, Estados Unidos) foram preparados e esterilizados de acordo com as instruções de cada fabricante.

4.2 Preparo da suspensão de *B. atrophaeus* ATCC 9372

Preparou-se uma suspensão estoque de *B. atrophaeus* ATCC 9372, a partir de suspensão matriz do mesmo microrganismo refrigerada a 4°C como descrito a seguir. A suspensão matriz foi submetida a agitação com auxílio de barra e agitador magnético (modelo 752, Fisatom, São Paulo, Brasil) por 45 minutos, a fim de homogeneizar a suspensão. Em um tubo de ensaio, 10 mL da suspensão de células foram submetidos a 80 °C em banho de óleo de silicone por 10 minutos seguido choque térmico em banho de gelo e água, para ativação dos esporos.

Em uma garrafa do tipo *Roux* foram preparados 200 mL de PCA e esterilizados a 121°C por 30 minutos, e incubada em estufa (modelo 347, Fanem, São Paulo, Brasil), a 37° C por 24 horas, a fim de se assegurar a esterilidade do meio. O inóculo que recebeu o choque térmico foi transferido para a garrafa *Roux* e incubada em estufa a 37°C por 6 dias.

Após este período, o cultivo foi ressuspenso com auxílio de pérolas de vidro e solução de acetato de cálcio 0,02M, ajustando-se o pH para 9,7, com hidróxido de cálcio saturado. A suspensão foi vertida a um frasco contendo pérolas de vidro e barra magnética (Figura 3).

Figura 3. Suspensão de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372

4.3 Avaliação da viabilidade de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372

Para verificar a viabilidade dos esporos obtidos, submeteu-se alíquota de 5 mL da suspensão a 80°C em banho de óleo de silicone por 10 minutos, para ativação dos esporos, seguido de choque térmico em banho água e gelo. Alíquota de 1 mL da suspensão foi transferida a frasco contendo 99 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v), até obter-se a concentração de (10^{-4}). Diluições seriadas foram realizadas em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% (p/v), com auxílio de agitador tipo *vortex* (modelo AP56, Phoenix Luferco, Araraquara, SP, Brasil), e 1 mL de cada diluição, foi transferido para uma placa de Petri, acrescentando-se 20 mL de PCA. As placas foram incubadas por 48 horas e após este período, procedeu com a leitura das unidades formadoras de colônias (UFC), figura 4.

Figura 4. Placa de Petri com *B. atrophaeus* ATCC 9372 para determinação de unidades formadoras de colônia (UFC)

4.4 Obtenção de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 em caldo TSB

4.4.1 Preparo de inóculo

A partir da suspensão estoque de *B. atrophaeus* ATCC 9372, suspensões 10^2 , 10^4 e 10^6 esporos/mL foram preparadas, diluindo-se em frascos de 99 mL de solução de acetato de cálcio 0,02M e hidróxido de cálcio saturado ajustado para pH 9,7.

4.4.2 Avaliação do cultivo

Suspensões de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372, nas concentrações de 10^6 , 10^4 e 10^2 , foram inoculadas em Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL e 100 mL de caldo TSB com vedação com gaze (Figura 5, A) e tampa emborrachada (Figura 5, B), e incubadas em agitador rotativo (modelo T-420, Tecnal, Piracicaba, Brasil) a 37°C/ 150 rpm/ 24 horas. Após este período, os cultivos foram centrifugados a 5000 rpm, a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi armazenado em frasco e o *pellet* foi ressuspenso em solução de acetato de cálcio 0,02M e hidróxido de cálcio saturado ajustando-se para pH 9,7. As frações foram armazenadas sob refrigeração a 4° C até o momento de análise.

Figura 5. *B. atrophaeus* ATCC 9372 em caldo TSB vedados com gaze (A) e tampa emborrachada (B).

O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se 50 mL de TSB em erlenmeyers de 250 mL vedados com gaze e inoculados com *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 na concentração celular de 10^2 esporos/mL por um período de incubação de até seis dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.5 Obtenção de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 em ágar

Seis garrafas do tipo *Roux* foram preparadas com 200 mL de PCA cada, esterilizadas a 121° C por 30 minutos e, incubadas em estufa (modelo 347, Fanem, São Paulo, Brasil) a 37°C por 24 horas, a fim de se assegurar a esterilidade do meio.

Seis tubos de ensaio contendo 10 mL da suspensão estoque de *B. atrophaeus*, foram submetidos a tratamento térmico a 80°C em banho de óleo de silicone por 10 minutos, seguido de choque térmico em banho de gelo e água e cada suspensão transferida para as garrafas, as quais foram incubadas a 37°C em estufa.

Retirou-se uma garrafa por dia até 6 dias e a cultura celular foi ressuspensa com auxílio de pérolas de vidro e 80 mL de solução Tris-HCl 10mM, pH 7,5. A suspensão foi centrifugada (modelo 5810 R, Eppendorf, HB, Alemanha) a 4°C / 5000 rpm / 30 minutos, separando-se o sobrenadante do *pellet*. O sobrenadante foi armazenado em frasco e o *pellet* ressuspensa em solução de acetato de cálcio 0,02M e hidróxido de cálcio saturado ajustado-se para pH 9,7. As frações foram armazenadas sob refrigeração a 4° C para posterior análise.

4.6 Avaliação da resistência térmica de esporos de *B. atrophaeus*

Cada cultivo obtido foi homogeneizado por 15 minutos em agitador magnético e 1 mL de cada suspensão foi transferido para 99 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% homogeneizando por mais 15 minutos.

Alíquotas de 5 mL foram distribuídas em frascos tipo ampola e lacrados com invólucro de alumínio. Procedeu-se ao tratamento térmico a 102°C, em banho de óleo de silicone, por períodos de tempo pré-determinados. Após tratamento, os frascos foram resfriados em banho de água e gelo. Cada amostra tratada foi submetida a plaqueamento, por semeadura em profundidade, incubando-se a 37°C por 48 horas, para quantificar os esporos sobreviventes.

4.7 Avaliação do uso de soro de leite como meio de cultivo de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372

4.7.1 Preparo de inóculo

Para o cultivo de *B. atrophaeus* ATCC 9372, padronizou-se a utilização de inóculo contendo 0,1 g/L de biomassa microbiana. A suspensão de esporos obtida (item 4.3) foi homogeneizada em agitador magnético por 20 minutos e, 1 mL desta suspensão foi incubada em 100 mL de TSB a 37°C / 150 rpm / 24 horas.

Após este período, 10 mL do cultivo foi submetido a a 4° C / 5000 rpm / 15 minutos. A biomassa foi ressuspensa em 10 mL de água destilada estéril e leu-se a densidade ótica em espectrofotômetro (modelo UV – 1650PC, Shimadzu, Kyoto, Japão) sob o comprimento de onda de 600 nm. Determinou-se a concentração de biomassa em gramas por litro (g/L) através da equação de calibração entre biomassa de *B. atrophaeus* ATCC 9372 e densidade ótica (600 nm), descrita a seguir no item 4.9.

4.7.2 Cultivo microbiano em soro de leite, lactose e caseína

Para os cultivos utilizando-se soro de leite (Alibra Ingredientes Ltda, São Paulo, Brasil), foram preparados meios contendo as concentrações de 2,5 g/L; 5,0 g/L; 10 g/L, 20 g/L e 40 g/L de carboidratos (baseado na composição do soro) dissolvidos em água deionizada e esterilizados a 121 °C por 30 minutos (Figura 6).

Figura 6. Meios de cultivo de soro de leite reconstituído em água destilada e TSB.

Frações de cada meio foram transferidas para Erlenmeyers de 250 mL, de forma que, após a adição de inóculo de 0,1g/L de biomassa de *B. atrophaeus* ATCC 9372, o volume

final fosse de 100 mL. Estes sistemas foram vedados com gaze e incubados em agitador orbital (modelo TE-420, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 37°C / 150 rpm / 24 horas, 3 dias e 6 dias. Ao fim dos períodos de incubação, alíquotas de 10 mL de cada cultivo foram centrifugadas a 4°C / 5000 rpm / 30 minutos. O sobrenadante foi reservado para posterior determinação de biossurfactantes, e a biomassa foi ressuspensa em 10 mL de água destilada estéril e vigorosamente agitada em *vórtex* para homogeneização do *pellet* e determinação da biomassa celular obtida.

Para efeito de comparação, meio contendo TSB foi realizado como padrão e os cultivos com lactose e caseína hidrolisada (Merck, Darmstadt, Alemanha) nas concentrações de 2,5 g/L, 5,0 g/L, 10,0 g/L e 20,0 g/L, seguiram a mesma metodologia.

4.7.3 Cultivo microbiano em meio sólido contendo soro de leite.

Preparou-se seis garrafas do tipo *Roux* contendo 200 mL de soro de leite diluído em água deionizada nas concentrações de 10,0 g/L; 20,0 g/L e 40,0g/L de carboidratos, adicionados de 1% de ágar bacteriológico (Laboratórios Difco Ltda., Diadema, São Paulo, Brasil). As garrafas contendo os meios foram autoclavadas a 121°C por 30 minutos e após a solidificação do meio, as garrafas foram incubadas em estufa a 37° C por 24 horas, a fim de se assegurar a esterilidade do meio. Duas garrafas contendo 200mL de PCA foram preparadas como cultivo padrão.

Após este período, oito tubos de ensaios, contendo 10 mL da suspensão estoque de *B. atrophaeus* ATCC 9372 cada, foram submetidos ao choque térmico a 80°C em banho de óleo de silicone por 10 minutos seguido de banho de gelo e água. A suspensão foi homogeneizada em agitador tipo *vórtex*, e cada garrafa foi inoculada com 10 mL da suspensão termicamente tratada e incubada a 37°C.

Após 3 dias de cultivo, retirou-se uma garrafa incubada nas concentrações de 10,0 g/L; 20,0 g/L e 40,0g/L de carboidratos expressos em soro de leite e uma de PCA. A cultura microbiana presente nas garrafas, foi ressuspensa com auxílio de pérolas de vidro e 50 mL de solução Tris-HCl 10mM, pH 7,5 e centrifugada a 5000 rpm por 30 minutos a 4°C. O mesmo procedimento foi repetido nas garrafas incubadas por até 6 dias.

O sobrenadante foi armazenado em frasco e o *pellet* ressuspensa em solução de acetato de cálcio 0,02M e hidróxido de cálcio saturado ajustado-se para pH 9,7. As frações foram armazenadas sob refrigeração a 4° C para posterior análise.

4.8 Determinação de pH

Determinou-se o pH dos meios preparados, dos meios inoculados antes da incubação e dos pellets ressuspensos e sobrenadante após o cultivo, utilizando frascos tipo ampola (3 mL) em temperatura ambiente a partir de pHmetro digital (modelo AR20 Accumet, Fisher Scientific, Swanee, GA, Estados Unidos).

4.9 Determinação da biomassa de *B. atrophaeus* ATCC 9372

Para obter a concentração de biomassa em gramas por litro (g/L), fez-se uma curva de calibração de massa seca (g/L) pela densidade ótica no crescimento de *B. atrophaeus* ATCC 9372.

A biomassa obtida em todos os cultivos foi ressuspensa em água destilada e submetida a agitação em *vórtex* para homogeneização da biomassa. A densidade ótica das amostras foi obtida em espectrofotômetro, sob comprimento de onda (λ) = 600 nm (Figura 7).

Figura 7. Curva de calibração de massa seca pela densidade ótica no crescimento de *B. atrophaeus* ATCC 9372

4.10 Determinação da tensão superficial e concentração de biossurfactantes

A concentração de biossurfactantes em miligramas por litro (mg/L), foi determinada através da leitura de tensão superficial das amostras em tensiômetro (Modelo K9, Krüss GmbH, HB, Alemanha), com auxílio de um anel de platina, descrito por Nuoy, 1925.

Para cada análise, utilizou-se 20 mL de amostra em um recipiente de vidro no qual o anel de platina foi submerso. A tensão superficial foi obtida quando houve o desprendimento do anel da superfície da amostra. A água destilada foi utilizada como padrão e todas as amostras foram lidas em triplicata.

Para se determinar a quantidade de biossurfactante produzido, utilizou-se curva de calibração de surfactina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) diluída em água destilada (Figura 8).

Figura 8. Curva de calibração de surfactina em água destilada

4.11 Determinação de Glicose

Determinou-se as concentrações de glicose das amostras cultivadas em diferentes concentrações de carboidratos expressos em soro de leite, lactose e caseína, antes e após incubação, utilizando-se o método enzimático GOD/POD.

Adicionou-se 10µL de amostra e 1mL de mistura reativa do kit enzimático (Wiener, Rosario, SF, Argentina). A solução foi homogeneizada e em seguida, permaneceu em

banho de água por 37°C por 10 minutos. Determinou-se as absorvâncias das amostras em espectrofotômetro ao comprimento de onda $\lambda=505$ nm. Estabeleceu-se a mistura reativa como branco para iniciar as leituras no espectrofotômetro.

Para se determinar a concentração em gramas por litro (g/L) de glicose das amostras, utilizou-se uma curva de calibração de glicose (Merck, Darmstadt, Alemanha) diluída em água destilada (figura 9).

Figura 9. Curva de calibração de glicose em água destilada.

4.12 Determinação de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais foi obtida através do método colorimétrico descrito por LOWRY et al., 1951.

Preparou-se uma mistura reativa na proporção 98:1:1 de solução alcalina (carbonato de sódio 2% e hidróxido de sódio 0,4%), solução de sulfato cúprico 1% e solução de tartarato de sódio e potássio 1%, respectivamente e, o reativo *de Folin Ciocalteau* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) diluído em água destilada na proporção 1:3.

Adicionou-se 5 mL da mistura reativa e 0,5 mL da amostra, homogeneizou-se, e em seguida, manteve-se em repouso, à temperatura ambiente, por 10 minutos. Após este período, adicionou-se 0,5 mL de *Folin Ciocalteau* diluído, e após homogeneização das amostras, o sistema foi mantido em repouso por 30 minutos e leu-se as absorvâncias das amostras em espectrofotômetro em $\lambda=505$ nm.

Para determinação da concentração de proteínas totais em gramas por litro (g/L), estabeleceu-se uma curva de calibração de albumina sérica bovina (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, Estados Unidos) diluída em água destilada (Figura 10).

Figura 10. Curva de calibração de albumina sérica bovina.

4.13 Determinação do tempo de redução decimal (Valor D)

O tempo de redução decimal, valor D é o intervalo de tempo requerido para a redução de um ciclo logarítmico decimal da população inicial de esporos presentes ao tratamento térmico a temperatura de referência (T_R) constante.

Figura 11. Esquema de cálculo para a determinação do valor D.

O valor D_{TR} foi calculado pelo inverso negativo do coeficiente angular da reta resultante da regressão linear aplicado à região linear da curva de decaimento, podendo ser representado pela equação:

$$\log_{10} C_f = \log_{10} C_o - (1/D_{TR}) * t$$

onde: C_o = Concentração de esporos no tempo inicial;

C_f = Concentração de esporos no tempo final;

t = tempo de exposição à temperatura de tratamento (min).

A partir dos cultivos em meio sólido e meio líquido, selecionou-se os cultivos de 3 e 6 dias, de cada cultivo para proceder à avaliação térmica dos esporos cultivados.

5. Resultados e Discussão

Para obtenção de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 e de biossurfactantes foram realizados ensaios em meio sólido e líquido, como descrito em material e métodos.

A tabela 2 apresenta os valores de biomassa e biossurfactante, e respectivos valores de pH, produzidos por diferentes concentrações de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372.

Tabela 2. Biomassa, pH e concentração de biossurfactantes das frações cultivadas em 50 mL de TSB vedados com tampa e gaze por 24 horas.

	Inóculo (esporos/mL)	<i>Pellet</i>		Sobrenadante	
		Biomassa (g/L)	pH	Biossurfactante (mg/L)	pH
50 mL tampa	$1,54 \times 10^6$	2,72 ($\pm 0,3$)	7,8 ($\pm 0,7$)	34,5 ($\pm 2,2$)	8,5 ($\pm 0,2$)
	$1,65 \times 10^4$	2,72 ($\pm 0,2$)	7,2 ($\pm 0,2$)	22,5 ($\pm 5,4$)	7,6 ($\pm 0,1$)
	$2,36 \times 10^2$	2,41 ($\pm 0,1$)	7,3 ($\pm 2,3$)	24,2 ($\pm 2,7$)	7,9 ($\pm 0,2$)
50 mL gaze	$1,54 \times 10^6$	1,34 ($\pm 0,1$)	7,0 ($\pm 0,1$)	65,4 ($\pm 5,6$)	7,6 ($\pm 0,1$)
	$1,65 \times 10^4$	1,93 ($\pm 0,3$)	6,9 ($\pm 0,2$)	60,8 ($\pm 4,0$)	7,4 ($\pm 0,1$)
	$2,36 \times 10^2$	2,12 ($\pm 0,1$)	6,8 ($\pm 0,2$)	67,0 ($\pm 1,6$)	7,2 ($\pm 0,1$)

Observou-se variação de 89,5% na produção de biossurfactantes entre os cultivos vedados com tampa e gaze para uma população inicial de 10^6 esporos/mL, indicando que a vedação com gaze favoreceu a produção de biossurfactantes. Já para a produção de biomassa, o cultivo com tampa proporcionou um aumento de 102,9% em comparação ao cultivo realizado com gaze.

No cultivo de 50 mL vedado com tampa, a maior produção de biossurfactante foi observada na população celular de 10^6 esporos/mL, 34,5 mg/L (tabela 2). A produção média de biossurfactantes pelas populações de 10^2 e 10^4 esporos/mL foi de 23,35 ($\pm 1,20$) mg/L. A produção de biossurfactantes em termos percentuais, variou entre 42,6% (10^2 esporos/mL) e 53,3% (10^4 esporos/mL) em relação à quantidade de biossurfactantes produzida por 10^6 esporos/mL indicando que uma maior população favorece a produção de biossurfactantes em cultivos vedados com tampa.

Nos cultivos vedados com gaze, pode-se observar que a produção de biossurfactantes foi independente da população celular inicial, sendo a média de 65,4 ($\pm 3,2$) mg/L. Para uma população de 10^2 esporos/mL, alcançou-se uma maior biomassa, provavelmente por haver

maior disponibilidade de substrato e aeração. O pH dos *pellets* de células mantiveram-se próximos ao pH ótimo de estabilidade para os biossurfactantes, pH 7,5 (AL WAHIBI et al, 2013). Não houve variação na produção de biossurfactantes nos cultivos vedados com tampa e gaze, para quaisquer das populações microbianas estudadas.

Tabela 3. Biomassa, pH e concentração de biossurfactantes das frações cultivadas em 100 mL de TSB vedados com tampa e gaze por 24 horas.

	Inóculo (esporos/mL)	<i>Pellet</i>		Sobrenadante	
		Biomassa (g/L)	pH	Biossurfactante (mg/L)	pH
100 mL tampa	$1,54 \times 10^6$	2,56 ($\pm 0,2$)	6,8 ($\pm 0,2$)	5,2 ($\pm 2,1$)	6,8 ($\pm 0,2$)
	$1,65 \times 10^4$	2,73 ($\pm 0,1$)	6,7 ($\pm 0,2$)	9,0 ($\pm 0,6$)	6,7 ($\pm 0,2$)
	$2,36 \times 10^2$	2,71 ($\pm 0,1$)	6,8 ($\pm 0,6$)	4,4 ($\pm 2,2$)	6,8 ($\pm 0,6$)
100 mL gaze	$1,54 \times 10^6$	3,25 ($\pm 0,4$)	6,7 ($\pm 0,2$)	6,0 ($\pm 1,3$)	6,6 ($\pm 0,2$)
	$1,65 \times 10^4$	2,74 ($\pm 0,3$)	5,7 ($\pm 0,4$)	8,8 ($\pm 3,3$)	6,6 ($\pm 0,3$)
	$2,36 \times 10^2$	2,58 ($\pm 0,2$)	6,1 ($\pm 0,7$)	7,9 ($\pm 1,9$)	6,8 ($\pm 0,2$)

Os cultivos realizados com 100 mL de TSB apresentaram-pH médio foi de 6,5 ($\pm 0,4$) enquanto que nos cultivos em 50 mL o pH médio foi de 7,2 ($\pm 0,3$) (Tabelas 2 e 3). Comparando-se a biomassa celular, o crescimento de *Bacillus* nos experimentos de 50 mL e 100 mL com tampa foi igual e independente da quantidade de células presente no meio. Já para o cultivo utilizando-se gaze, observou-se que em 100 mL, a biomassa obtida com população de 10^6 esporos/mL foi 2,5 vezes maior do que o cultivo com 50 mL, indicando que, a produção de biomassa foi favorecida em cultivos de 100 mL com gaze.

Em relação à produção de biossurfactantes, os *Bacillus*, quando cultivados em 50 mL, expressaram três vezes mais biossurfactantes quando cultivados com gaze, em comparação ao uso da tampa. Cultivos de 100 mL não favoreceram a expressão de biossurfactantes, tanto com o uso de gaze quanto de tampa, sendo 10 vezes menor, se comparado aos cultivos de 50 mL com gaze, o que pode ocorrer pelo excesso de nutrientes no meio, para o tempo de incubação de 24 horas.

Após 24 horas de incubação, houve formação de esporos, porém estes não apresentaram resistência térmica. Desta forma, a fim de avaliar, a obtenção de esporos, realizou-se ensaios por até 6 dias em meio sólido e líquido.

Com o objetivo de avaliar o uso de soro de leite como meio alternativo para obtenção de esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 e de biossurfactantes, realizou-se cultivos com concentração entre 2,5g/L e 20g/L de caseína, lactose e carboidratos (Tabela 4)

Tabela 4. Valores de pH de meios contendo soro de leite, lactose e caseína após preparo, inoculados e após 24 horas de cultivo nas concentrações de 2,5 g/L, 5,0 g/L, 10,0 g/L e 20,0 g/L e TSB.

Concentração (g/L)	Caseína			Lactose			Carboidratos (Soro de Leite)		
	Inicial	Inoculado	Após 24h	Inicial	Inoculado	Após 24h	Inicial	Inoculado	Após 24h
2,5	5,41	7,15	9,03	6,23	7,35	8,57	6,41	7,11	8,63
5,0	5,39	7,05	8,85	6,05	7,31	8,50	6,37	7,00	8,58
10,0	5,35	6,71	8,61	4,92	7,20	8,64	6,34	6,92	8,55
20,0	5,32	6,30	8,48	4,39	7,22	8,52	6,19	6,64	8,32
TSB	7,35	7,22	7,10	7,26	7,35	7,31	7,28	7,28	7,28

Observou-se que a caseína, a lactose e o soro de leite recém-preparados possuem caráter ácido sendo a média de 5,37 ($\pm 0,03$); 5,40 ($\pm 0,77$) e 6,33 ($\pm 0,08$), respectivamente, independente da concentração inicial dos componentes nos meios.

Após 24 horas de cultivo, o pH de todos os meios mostraram-se básicos, em torno de pH 8,5, independente da concentração inicial dos componentes nos meios de cultivo, influenciando a taxa de crescimento de espécies de *Bacillus ssp.* LINDSAY et al. 2000, estudaram a fisiologia de quatro espécies de *Bacillus* isolados de uma indústria de laticínios na França, sob um amplo espectro de pH, e constataram que nos pHs 4,5 e 9,5 houve a maior taxa de crescimento para *Bacillus subtilis* 115, enquanto que nos pHs entre 5,9 a 7,4 houve decaimento no crescimento deste micro-organismo, quando cultivado a 25°C.

Para verificar o crescimento do micro-organismo e seu metabolismo, determinou-se a produção de biomassa de *B. atrophaeus* ATCC 9372 e a expressão de biossurfactantes (tabela 5).

Tabela 5. Produção biomassa de *B. atrophaeus* ATCC 9372 e expressão de biossurfactantes em diferentes concentrações de caseína, lactose e carboidratos expressos em soro de leite, após 24 horas de cultivo.

Conc. (g/L)	Caseína		Lactose		Carboidratos (Soro de Leite)	
	Biomassa (g/L)	Biossurfactantes (mg/L)	Biomassa (g/L)	Biossurfactantes (mg/L)	Biomassa (g/L)	Biossurfactantes (mg/L)
2,5	0,40 ($\pm 0,02$)	12,9 ($\pm 2,18$)	0,43 ($\pm 0,01$)	0,00	0,85 ($\pm 0,05$)	0,00
5,0	0,74 ($\pm 0,02$)	13,1 ($\pm 5,46$)	0,43 ($\pm 0,01$)	0,00	0,87 ($\pm 0,03$)	0,00
10,0	0,76 ($\pm 0,04$)	24,4 ($\pm 8,66$)	0,44 ($\pm 0,01$)	0,00	1,17 ($\pm 0,05$)	3,41 ($\pm 0,53$)
20,0	0,38 ($\pm 0,02$)	26,4 ($\pm 3,25$)	0,35 ($\pm 0,00$)	3,99 ($\pm 2,31$)	3,01 ($\pm 0,24$)	8,06 ($\pm 0,78$)
TSB	1,40 ($\pm 0,02$)	17,9 ($\pm 4,71$)	1,83 ($\pm 0,03$)	6,80 ($\pm 2,10$)	1,74 ($\pm 0,15$)	10,59 ($\pm 1,99$)

A maior produção de biossurfactantes foi observada no cultivo com caseína, onde obteve-se 26,4 mg/L em meio com 20,0 g/L de caseína, valor 1,5 vezes maior que em TSB que produziu 17,9 mg/L.

Nas concentrações de 2,5 g/L e 5,0 g/L de caseína, a produção de biossurfactantes foi em média de 13,0 ($\pm 0,10$) mg/L de biossurfactantes. Quando aumentou-se a concentração de 5,0 g/L para 10,0 g/L de caseína, dobrou-se a produção de biossurfactantes, mantendo-se em 20,0 g/L de caseína.

A expressão de biossurfactantes no cultivo em caseína foi superior se comparado aos outros cultivos realizados, provavelmente porque a caseína é fonte de nitrogênio, e que segundo, DAVIS et al. 1999 é uma fonte essencial para produção de surfactina por *Bacillus subtilis*. NEVES et al. 2007, constataram que a caseína por ser fonte de nitrogênio e carbono, favorece a produção de biomassa, e consequentemente a excreção de biossurfactantes.

Apesar da produção média de biomassa ter sido de 0,57 ($\pm 0,20$) g/L, o *B. atrophaeus* ATCC 9372 foi capaz de excretar mais biossurfactantes em caseína hidrolisada do que nos cultivos com lactose e soro de leite, provavelmente por não haver nitrogênio no meio de lactose, e porque as proteínas do soro de leite (Tabela 6), tais como a β -lactoglobulina e a α -lactoglobulina, que representam 60% e 20% da composição total de proteínas presentes no soro de leite, respectivamente, precisam ser hidrolisadas pelo *Bacillus subtilis* através da enzima β -galactosidase (CAGRI-MEHMETOGLU et. al. 2012; NICOLAI, et al. 2011), para posterior sintetizar biossurfactantes.

Tabela 6. Composição do soro de leite e TSB.

TSB (/L)	Soro (/100g)
17,0 g Digestivo Pancreático de Caseína	74,0 g Carboidratos
3,0 g Digestivo Papaínico de Soja	11,0 g Proteínas
2,5 g Dextrose	1,0 g Gorduras Totais
5,0 g Cloreto de Sódio	0,5 g Gorduras saturadas
2,5 g Fosfato Dipotássio	0,6 g Colesterol
	0,796 g Cálcio
	0,090 g Ferro
	0,620 g de Sódio

No cultivo com lactose, a produção de biossurfactantes foi detectada apenas na concentração de 20,0 g/L, onde obteve-se aproximadamente 4,0 mg/L deste bioproduto, valor inferior ao produzido em TSB de 6,80 ($\pm$ 2,10) mg/L de biossurfactantes. A produção de biomassa manteve-se praticamente a mesma nas concentrações de 2,5 g/L a 20,0 g/L de lactose, sendo um crescimento 5 vezes menor se comparado ao cultivo com o TSB.

Estes resultados sugerem que a lactose como fonte exclusiva de carbono em concentrações abaixo de 20,0 g/L, não viabiliza a produção de biossurfactantes. Este fato também foi constatado por ABDEL-MAWGOUD et al, 2008 e PEREIRA et al., 2013, onde observou-se baixa produção de biossurfactantes utilizando a lactose como fonte de carbono.

Em soro de leite, a produção de biossurfactantes a partir de 10,0 g/L de carboidratos expressos em soro de leite, produziu 3,41 mg/L de biossurfactantes. Quando dobrou-se a concentração de carboidratos para 20,0 g/L, houve um aumento de 2,5 vezes na produção do biossurfactantes. Nos cultivos em 10,0 g/L e 20,0 g/L de carboidratos em soro de leite a expressão de biossurfactantes foi de 30% e de 75% do valor obtido com cultivo em TSB.

Apesar do *B. atrophaeus* ter produzido menor quantidade de biossurfactantes em soro de leite comparado ao cultivo em caseína, houve maior produção de biomassa, chegando a 3,01 g/L em 20,0 g/L de carboidratos em soro de leite, cerca de 2,5 vezes maior que nos cultivos com caseína e lactose.

Carboidratos são fontes de carbono presentes no soro de leite, sendo que o principal componente é a lactose, que integra de 70% a 72% de sua composição (PANESAR et al, 2007). Sendo a lactose composta por uma molécula de glicose e outra de galactose, esta forneceria energia necessária para crescimento de *B. atrophaeus* no meio e, por conseguinte, excreção de biossurfactantes. JOSHI et al., 2008 reportou a produção de biossurfactantes em soro de leite e melão a partir do cultivo de três diferentes espécies do gênero *Bacillus* a 45°C por 72 horas. Os autores observaram uma redução na tensão superficial de 34 a 37 mN/m nas

concentrações de 2,6 a 4,3% de lactose expressos em soro de leite quando cultivado com *Bacillus subtilis*.

Avaliou-se a produtividade de biomassa e biossurfactantes de cada cultivo realizado, bem como os fatores de conversão (tabela 7). A cinética fermentativa demonstrou que a produtividade de biossurfactantes independente da produtividade de biomassa.

Nos cultivos realizados com lactose a produtividade da biomassa foi praticamente a mesma, de 0,015 g/L.h. a 0,018g/L.h. nas concentrações estudadas, valor 5 vezes menor se comparado ao cultivo em TSB. Nos cultivos em caseína a máxima produtividade de biomassa foi de 0,032 g/L.h. em 10,0 g/L.; enquanto que em soro de leite, a produtividade foi 0,049 g/L.h. na mesma concentração. A produtividade foi máxima em 20,0 g/L de carboidratos em soro de leite, onde obteve-se 0,125 g/L.h.; valor 1,7 vezes maior que em TSB.

A produtividade de biossurfactantes em lactose, de 0,166 g/L.h. só foi detectada na concentração de 20,0 g/L, cerca da metade produzida em TSB. Em soro de leite a produtividade máxima de biossurfactantes foi de 0,336 g/L.h. em 20,0 g/L, 75% da produtividade obtida em TSB. Em caseína, detectou-se produtividade de biossurfactantes em todas as concentrações estudadas, a máxima produtividade foi de 1,100 g/L.h. obtida em 20,0 g/L de caseína, valor 1,5 vezes superior a produtividade de biossurfactantes em TSB.

AL-WAHAIBI et al., 2013 descreveram a produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis* B30 em cinco diferentes fontes de carbono por até 72 horas, e identificaram a

Tabela 7. Produtividade (g/L.h) de biossurfactantes e de biomassa e fator de conversão (mg biossurfactantes/g biomassa) em diferentes concentrações de caseína, lactose e carboidratos expressos em soro de leite e em TSB.

Concentração (g/L)	Caseína			Lactose			Carboidratos (Soro de Leite)		
	Biomassa (g/L)	Biossurfactantes (mg/L)	Fator de Conversão	Biomassa (g/L)	Biossurfactantes (mg/L)	Fator de Conversão	Biomassa (g/L)	Biossurfactantes (mg/L)	Fator de Conversão
2,5	0,017	0,538	32,25	0,018	0,000	0,00	0,035	0,000	0,00
5,0	0,031	0,546	17,70	0,018	0,000	0,00	0,036	0,000	0,00
10,0	0,032	1,017	32,10	0,018	0,000	0,00	0,049	0,142	2,81
20,0	0,016	1,100	69,47	0,015	0,166	11,4	0,125	0,336	2,67
TSB	0,058	0,746	12,78	0,076	0,283	3,71	0,073	0,441	6,08

Tabela 8. Determinação de glicose (g/L) e proteínas totais (g/L) sem inóculo e após 24 horas de cultivo em diferentes concentrações de caseína, lactose e carboidratos expressos soro de leite.

Concentração (g/L)	Caseína				Lactose				Carboidratos (Soro de Leite)			
	Glicose		Proteínas Totais		Glicose		Proteínas Totais		Glicose		Proteínas Totais	
	Sem Inóculo	Após 24 h.	Sem Inóculo	Após 24 h.	Sem Inóculo	Após 24 h.	Sem Inóculo	Após 24 h.	Sem Inóculo	Após 24 h.	Sem Inóculo	Após 24 h.
2,5	0,22 (±0,01)	0,28 (±0,00)	0,25 (±0,01)	0,74 (±0,02)	0,37 (±0,01)	0,34 (±0,00)	0,02 (±0,01)	0,49 (±0,03)	0,25 (±0,00)	0,22 (±0,01)	0,51 (±0,01)	0,67 (±0,03)
5,0	0,23 (±0,01)	0,24 (±0,01)	0,42 (±0,03)	0,68 (±0,04)	0,37 (±0,00)	0,36 (±0,00)	0,04 (±0,02)	0,52 (±0,02)	0,28 (±0,02)	0,23 (±0,01)	0,97 (±0,18)	0,96 (±0,03)
10,0	0,24 (±0,01)	0,24 (±0,01)	0,92 (±0,01)	0,96 (±0,02)	0,39 (±0,01)	0,36 (±0,00)	0,11 (±0,01)	0,54 (±0,01)	0,36 (±0,02)	0,24 (±0,01)	1,18 (±0,02)	1,19 (±0,03)
20,0	0,27 (±0,01)	0,24 (±0,01)	1,20 (±0,02)	1,29 (±0,01)	0,29 (±0,01)	0,34 (±0,01)	0,23 (±0,02)	0,64 (±0,02)	0,52 (±0,07)	0,27 (±0,01)	1,83 (±0,14)	1,54 (±0,03)
TSB	1,68 (±0,07)	0,23 (±0,00)	1,32 (±0,01)	2,24 (±0,02)	2,08 (±0,19)	0,25 (±0,01)	2,46 (±0,01)	2,35 (±0,03)	1,68 (±0,07)	0,23 (±0,00)	2,29 (±0,01)	2,08 (±0,03)

glicose e o melão de tamarindo como as fontes de carbono mais promissoras para a produção de biossurfactantes.

Determinaram-se as concentrações de glicose e proteínas totais em diferentes concentrações de caseína, lactose e carboidratos expressos em soro de leite em duas condições distintas: sem inóculo e após 24 horas de cultivo (Tabela 8), a fim de estabelecer um paralelo entre o consumo de glicose para o crescimento de biomassa e aumento na concentração de proteínas totais, incluindo-se nestas, os biossurfactantes.

Nos cultivos com caseína e lactose não foi possível estabelecer relação entre o consumo de glicose e produção de biomassa, apesar de ter sido observado crescimento do micro-organismo em ambos meios de cultivo. Observou-se aumento na concentração de proteínas totais em 2,5 g/L e 5,0 g/L de caseína, porém não foi possível afirmar que este aumento se derive da produção de biossurfactantes, visto que nas concentrações de 10,0 g/L e 20,0 g/L onde expressou-se a maior concentração de biossurfactantes, a concentração de proteínas totais foi igual.

A mesma tendência em relação à concentração de proteínas totais foi observada em lactose nas concentrações de 2,5 g/L a 10,0 g/L, onde notou-se o aumento da concentração de proteínas totais com baixa variação entre elas, uma média de 0,51 ($\pm 0,02$) g/L, e nestas concentrações de lactose, não foi possível detectar a expressão de biossurfactante, sugerindo que o *B. atrophaeus* ATCC 9372 produz outras proteínas. Em 20,0 g/L de lactose, a expressão de biossurfactantes foi aproximadamente 4,00 mg/L (tabela 2), onde constatou-se aumento na concentração de proteínas totais para 0,64 ($\pm 0,02$) g/L.

Uma melhor relação entre produção de biomassa e consumo de glicose, só foi constatada nos cultivos realizados em soro de leite, onde observou-se que a concentração de glicose aumentou conforme a concentração de carboidratos expressos em soro de leite, e que após 24 horas de cultivo chega a uma média de concentração basal de consumo de glicose de 0,24 ($\pm 0,02$) g/L. Esta mesma tendência foi observada nos cultivos em TSB, onde o micro-organismo consumiu a glicose disponível até uma concentração basal média de 0,23 ($\pm 0,01$) g/L.

Cultivou-se esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 em soro de leite por 3 e 6 dias para avaliar sua capacidade de produção de biomassa, excreção de biossurfactantes e resistência dos esporos formados após o cultivo. Inicialmente mediu-se o pH do meio de soro de leite recém preparado, inoculado e após cultivo (Tabela 9).

Tabela 9. Valores de pH do soro de leite recém preparado, inoculado e após 3 e 6 dias cultivo em diferentes concentrações de carboidratos.

Concentração (g/L)	pH			
	Sem Inóculo	Inoculado	Após Cultivo	
			3 Dias	6 Dias
10,0	5,83	6,31	8,16	7,77
20,0	5,76	6,08	8,23	8,05
40,0	5,66	5,72	8,18	7,99
TSB	7,06	7,10	8,26	8,34

Observou-se que os meios contendo soro de leite apresentaram caráter ácido, uma média de 5,74 ($\pm 0,07$), e que conforme aumentou a concentração de carboidratos no meio, o pH diminuiu levemente. Quando inoculou-se o meio, ocorreu aumento de pH, porém mantendo-se ácido. O TSB manteve o pH próximo a 7,0.

Após cultivo de 3 e 6 dias, o pH apresentou caráter básico, uma média de 8,19 ($\pm 0,03$) e 7,97($\pm 0,19$), respectivamente, comportamento similar após 24 horas de cultivo (tabela 4) e determinou-se a produção de biomassa de *B. atrophaeus* ATCC 9372 e a expressão de biossurfactantes após 3 e 6 dias de cultivo (tabela 10).

Tabela 10. Produção de biomassa de *B. atrophaeus* ATCC 9372 e expressão de biossurfactantes em diferentes concentrações de carboidratos expressos em soro de leite, após 3 e 6 dias de cultivo.

Concentração (g/L)	Biomassa (g/L)		Biossurfactantes (mg/L)	
	3 Dias	6 Dias	3 Dias	6 Dias
10,0	0,53 ($\pm 0,01$)	0,41 ($\pm 0,01$)	15,6 ($\pm 1,72$)	23,9 ($\pm 2,19$)
20,0	1,59 ($\pm 0,05$)	0,59 ($\pm 0,24$)	35,2 ($\pm 0,88$)	30,0 ($\pm 1,40$)
40,0	3,16 ($\pm 0,11$)	0,60 ($\pm 0,42$)	28,7 ($\pm 0,62$)	28,6 ($\pm 1,90$)
TSB	2,71 ($\pm 0,07$)	1,51 ($\pm 0,08$)	6,20 ($\pm 1,39$)	----

A média de produção de biomassa foi de 1,76 g/L ($\pm 1,32$) e 0,53 g/L ($\pm 0,11$) nos cultivos de 3 e 6 dias, respectivamente. A maior produção de biomassa foi de 3,16 ($\pm 0,11$) g/L em 40,0 g/L em 3 dias de cultivo, cerca de 5 vezes maior que a biomassa produzida em 6 dias de cultivo, onde obteve-se 0,60 ($\pm 0,42$) g/L de biomassa. Em todas as concentrações, após 6 dias de cultivo, a produção de biomassa foi menor e em TSB, produziu-se 2,71 ($\pm 0,07$) g/L e 1,51 ($\pm 0,08$) g/L em 3 e 6 dias de cultivo, respectivamente.

A maior produção de biossurfactantes foi observada em 20,0 g/L onde obteve-se 35,2 ($\pm 0,88$) mg/L deste bioproduto em 3 dias de cultivo, e 30,0 ($\pm 1,40$) mg/L de biossurfactantes

em 6 dias de cultivo. Observou-se que em 40,0 g/L de carboidratos expressos em soro de leite, a produção de biossurfactantes foi praticamente a mesma nos dois períodos de cultivo, apesar de apresentarem da biomassa ser 5 vezes menor no cultivo de 6 dias.

Realizou-se ensaios utilizando diferentes concentrações de carboidratos em soro de leite em ágar bacteriológico por 3 e 6 dias de cultivo. Determinou-se o pH da biomassa ressuspensa em acetato de cálcio e hidróxido de cálcio pH 9,7 e biossurfactantes produzidos em Tris HCl 10mM pH 7,5.

Tabela 11. Valores de pH de biomassa e de biossurfactantes cultivados em ágar bacteriológico em diferentes concentrações de carboidratos expressos em soro de leite por 3 e 6 dias de cultivo.

Concentração (g/L)	<i>Pellet</i>		Sobrenadante	
	3 dias	6 dias	3 dias	6 dias
10,0	7,26	6,97	6,72	6,88
20,0	6,75	7,13	6,80	6,75
40,0	6,77	7,08	6,79	6,81
PCA	6,67	6,93	7,47	7,18

Em soro de leite, observou-se que após ressuspensão da biomassa de *B. atrophaeus* em solução de acetato de cálcio e hidróxido de cálcio pH 7,5 o pH dos meios variou de pH 7,26 a pH 6,75, nas soluções contendo biossurfactantes, variou de pH 6,88 a 6,72, enquanto que em PCA, o pH foi de 6,80 ($\pm 0,18$) e de 7,33 ($\pm 0,21$) - nos cultivos de 3 e 6 dias para a biomassa e o sobrenadante, respectivamente (Tabela 11).

Determinou-se a produção de biomassa de *B. atrophaeus* ATCC 9372 e a expressão de biossurfactantes em ágar bacteriológico com soro de leite após 3 e 6 dias de cultivo (tabela 12).

Tabela 12. Produção biomassa de *B. atrophaeus* ATCC 9372 e expressão de biossurfactantes em diferentes concentrações de carboidratos expressos em soro de leite em ágar bacteriológico, após 3 e 6 dias de cultivo.

Concentração (g/L)	Biomassa (g/L)		Biossurfactantes (mg/L)	
	3 Dias	6 Dias	3 Dias	6 Dias
10,0	0,63 ($\pm 0,00$)	0,90 ($\pm 0,04$)	40,63 ($\pm 1,79$)	41,71 ($\pm 3,08$)
20,0	0,99 ($\pm 0,02$)	0,65 ($\pm 0,01$)	36,90 ($\pm 2,84$)	48,14 ($\pm 2,84$)
40,0	1,19 ($\pm 0,02$)	0,65 ($\pm 0,03$)	31,16 ($\pm 0,80$)	58,01 ($\pm 1,38$)
PCA	1,59 ($\pm 0,04$)	1,22 ($\pm 0,01$)	30,43 ($\pm 0,25$)	59,27 ($\pm 0,43$)

Em meio sólido, a maior produção de biomassa 1,19 ($\pm 0,02$) g/L e a menor produção de biossurfactantes 31,16 ($\pm 0,80$) mg/L ocorreu em 40,0 g/L após 3 dias de cultivo, enquanto que em 10,0 g/L obteve-se a menor biomassa de *B. atrophaeus* 0,63 ($\pm 0,00$) g/L e a maior produção de 40,63 ($\pm 1,79$) mg/L de biossurfactantes em até 3 dias de cultivo.

Em 6 dias de cultivo, o crescimento microbiano até 50% menor se comparado ao cultivo de 3 dias. A produção de biossurfactantes foi de 58,01 ($\pm 1,38$) mg/L deste bioproduto em 40,0 g/L, o dobro do obtido na mesma concentração em cultivo de 3 dias e valor 40 % maior em relação à produção em 10g/L por 6 dias.

O cultivo em meio PCA (padrão) forneceu a mesma concentração de biossurfactantes do que o cultivo em 40 mg/L de carboidratos em expressos em soro de leite, com a mesma concentração celular após 3 dias de cultivo e com o dobro de células após 6 dias de cultivo.

Foram avaliadas a viabilidade e a resistência térmica dos esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 obtidos nos meios contendo soro de leite, cultivados em 3 e 6 dias, através da determinação do tempo de redução decimal, valor D, em populações de obtidas de $2,0 \times 10^8$ esporos/mL a $4,8 \times 10^8$ esporos/mL.

Os esporos cultivados por 24 horas e por 3 dias não apresentaram resistência térmica. Para os esporos cultivados em 6 dias, em meio sólido, o aumento da concentração de carboidratos em termos de soro de leite, presentes nos meios de cultivo, reduziu a resistência térmica dos esporos, sendo os valores $D_{102\text{ }^{\circ}\text{C}} = 1,08$ min, $D_{102\text{ }^{\circ}\text{C}} = 1,50$ min, $D_{102\text{ }^{\circ}\text{C}} = 0,43$ min e $D_{102\text{ }^{\circ}\text{C}} = 1,20$ min, em cultivos de 10 g/L, 20g/L, 40g/L e PCA, respectivamente, atestando a produção de esporos resistentes ao tratamento térmico.

6. Conclusão

Os cultivos realizados com 100 mL de TSB utilizando-se gaze promoveram obtenção de biomassa 2,5 vezes maior do que o cultivo com 50 mL, embora não tenham favorecido a expressão de biossurfactantes, sendo 10 vezes menor em comparação com os cultivos de 50 mL, para o tempo de incubação de 24 horas.

Em meio sólido, a maior produção de biomassa 1,19 ($\pm 0,02$) g/L e a menor produção de biossurfactantes 31,16 ($\pm 0,80$) mg/L ocorreu em 40,0 g/L após 3 dias de cultivo, enquanto que em 10,0 g/L obteve-se a menor biomassa de *B. atrophaeus* 0,63 ($\pm 0,00$) g/L e a maior produção de 40,63 ($\pm 1,79$) mg/L de biossurfactantes em até 3 dias de cultivo.

Foram avaliadas a viabilidade e a resistência térmica dos esporos de *B. atrophaeus* ATCC 9372 obtidos nos meios contendo soro de leite, cultivados em 3 e 6 dias, através da determinação do tempo de redução decimal, valor D, em populações de obtidas de $2,0 \times 10^8$ esporos/mL a $4,8 \times 10^8$ esporos/mL.

Os resultados demonstraram a viabilidade do uso de soro de leite como meio para crescimento e esporulação de *B. atrophaeus* e biossurfactantes, podendo ser reaproveitado para obtenção de produtos de interesse farmacêutico e industrial.

6. Referências Bibliográficas

- ABDEL-MAWGOUD, A.M.; ABOULWAFI, M.M.; HASSOUNA, N. Optimization of surfactin production by *Bacillus subtilis* isolate BS5, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 150, p.305-25, 2008.
- AL-BAHRY, S.; AL-WAHAIBI, Y.M; ELSHAFIE, A.E; AL-BEMANI A.S.; JOSHI S.J.; AL-MAKHMARI, H.S. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B20 using date molasses and its possible application in enhanced oil recovery. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 1-6, 2012.
- AL-WAHAIBI, Y.; JOSHI, S.; AL-BAHRY, S.; ELSHAFIE, A.; AL-BEANI, A.; SHIBULAL. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* B30 and its application in enhancing oil recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 324-33, 2013 .
- AMANI, H.; SARRAFZADEH, M.H.; HAGHIGHI, M.; MEHRNIA, M.R. Comparative study of biosurfactant producing bacteria in MEOR applications, **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 75, p. 209-14, 2010.
- BADOUAL, M.; DERBEZ, P.; AUBERT, M.; GRAMMATICOS, B. Simulating the migration and growth patterns of *Bacillus subtilis*, **Physica A**, v. 388, p. 549-59, 2009.
- BANAT, I.M.; FRANZETTI, A.; GANDOLFI, I.; BESTETTI G.; MARTINOTTI, M.G.; FRACCHIA, L.; SMYTH, T.J.; MARCHANT, R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, p.427-44.
- BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; JÚNIOR, M.R.M.; PASTORE, G.M. Surfactina: Propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, Campinas, v.30, p. 409-14, 2007.
- BERENDSEN, E.M.; ZWIETERING, M.H.; KUIPERS, O.P. Two distinct groups within the *Bacillus subtilis* group display significantly different spore heat resistance properties. **Food Microbiology**, 2014
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.009>.

- BHARALI, P.; DAS, S.; KONWAR, B.K.; THAKUR, A.J. Crude biosurfactant from thermophilic *Alcaligenes faecalis*: Feasibility in petro-spill bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.65, p. 682-90, 2011.
- BOCA, B.M.; PRETORIUS, E.; GOCHIN, R.; CHAPOULLIE, R.; APOSTOLIDES, Z. An overview of the validation approach for moist heat sterilization, part I, **Pharmaceutical Technology**, September 2002, p. 67-70, 2002.
- BURKE, S.A.; WRIGHT, J.D.; ROBINSON, M.K.; BRONK, B.V.; WARREN, R.L. Detection of molecular diversity in *Bacillus atrophaeus* by amplified fragment length polymorphism analyses, **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 5, p. 2786-2790, 2004.
- CAGRI-MEHMETOGLU, A.; KUSAKLI, S.; VAN DE VENTER, M. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. **Journal of Dairy Science**, v.95, p. 3643-49, 2012.
- CARDOSO, C.F.; FARIA, J.A.F.; WALTER, E.H.M. Modelind of sporicidal effect of hydrogen peroxide in the sterilization of low density polyethylene film inoculated with *Bacillus subtilis* spores, **Food Control**, Campinas, v. 22, p. 1559-64, 2011.
- CARVALHO, F.; PRAZERES, A.R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: characterization and treatment. **Science of Total Environment**, v. 445-6, p. 385-96, 2013.
- CLADERA-OLIVEIRA, F.; CARON, G.R.; BRANDELLI, A. Bacteriocin production by *Bacillus licheniformis* strain P40 in cheese whey using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 53-8, 2004.
- CHEN, H.; CHEN, Y.; JUANG, R. Recovery of surfactin from fermentation broths by a hybrid salting-out and membrane filtration process. **Separation and Purification Technology**, v. 59, p. 244-52, 2007.
- CHEN, Y.; CHIANG, T.; LIANG, T.; WANG, I.; WANG, S. Reclamation of squid pen by *Bacillus licheniformis* TKU004 for the production of thermally stable and antimicrobial biosurfactant. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.1, p. 62-9, 2012.
- CHENIKHER, S.; GUEZ, J.S.; COUTTE, F.; PEKPE, M.; JACQUES, P.; CASSAR, J.P. Control of the specific growth rate of *Bacillus subtilis* for the production of biosurfactant lipopeptides in bioreactors with foam overflow. **Process Biochemistry**, v. 45, p. 1800-7, 2010.

- DARVISHI, P.; SHAHAB, A.; MOWLA, D.; NIAZ, A. Biosurfactant production under extreme environmental conditions by an efficient microbial consortium, ERCPPPI-2. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 84, p. 292-300, 2011.
- DAVILA-VAZQUEZ, G.; ALATRISTE-,MONDRAGÓN, F.; LEÓN-RODRÍGUEZ, A.; RAZO-FLORES, E. Fermentative hydrogen production in batch experiments using lactose, cheese whey and glucose: Influence of initial substrate concentration and pH. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 33, p. 4989-97, 2008.
- DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 322-9, 1999.
- DĘBOWSKI, M.; KORZENIEWSKA, E.; FILIPKOWSKA, Z.; ZIELIŃSKI, M.; KWIATTKOWSKI, R. Possibility of hydrogen production during cheese whey fermentation process by different strains of psychophilic bacteria. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 39, p. 1972-78, 2014.
- DLUGOKENSKI, R.E.F.; SELLA, S.R.B.R.; GUIZELINI, B.P.; VANDENBERGHE, L.P.S.; WOICIECHOWSKI, A.L.; SOCCOL, C.R.; MINOZZO, J.C. Use of soybean vinasses as a germinant medium for *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953 sterilization biological indicator, **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 90, p. 713-19, 2011.
- DU-NOÛY, P. L. An interfacial tensiometer for universal use, **The Journal of General Physiology**, v. 5, p. 625-633, 1925.
- ESMERALDO, F.S. Influência da temperatura na produção de surfactina por *Bacillus subtilis* LAMI005. Universidade Federal do Ceará, 2010.
- FAKHFAKH-ZOUARI, N.; HADDAR, A.; HMIDET, N.; FRIKHA, F.; NASRI, M. Application of statistical experimental design for optimization of keratinases production by *Bacillus pumilus* A1 grown on chicken feather and some biochemical properties, **Process Biochemistry**, v. 45, p. 617-26, 2010.
- FARMACOPEIA Americana. 34th ed. The National Formulary, 2010.
- FARMACOPEIA Brasileira. 5 ed. Brasília: Fiocruz, 2010. pt. 1, p. 321-30.
- FARMACOPEIA Britânica, 2010.

- FEKETE, T. *Bacillus* species (not *anthracis*), **Clinical Microbiology Newsletter**, v.31, n.12, p. 87-92, 2009.
- GABARDO, S.; RECH, R.; ROSA, C.A.; AYUB, M.A.Z. Dynamics of ethanol production from whey and whey permeate by immobilized strains *Kluyveromyces marxianus* in batch and continuous bioreactors. **Renewable Energy**, v. 69, p. 89-96, 2014.
- HARROLD, Z.R.; HERTEL, M.R.; GORMAN-LEWIS, D. Optimizing *Bacillus subtilis* spore isolation and quantifying spore harvest purity, **Journal of Microbiological Methods**, v. 87, p. 325-4, 2011.
- HONG, H.A.; TO, E.; FAKHRY, S.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Defining the natural habitat of *Bacillus* spores-formers, **Research in Microbiology**, v. 160, p. 375-79, 2009.
- HUANG, L.; LIU, B.; BUCHENAUER, H.; KANG, Z. Isolation and partial characterization of an antifungal protein from the endophytic *Bacillus subtilis* strain EDR4, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 98, p. 305-11, 2010.
- HWANG, Kuo-Jen; WANG, Chung-Yi. Microfiltration characteristics of *Bacillus subtilis* fermentation broths, **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, Taiwan, v. 43, p. 347-53, 2012.
- JAIN, R.M.; MODY, K.; MISHRA, A.; JHA, B. Physicochemical characterization of biosurfactant and its potential to remove oil from soil and cotton cloth, **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 1110-16, 2012.
- 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, p. 195-99, 2008.
- KAPOOR, M.; NAIR, L.M.; KUHAD, R.C. Cost-effective xylanase production from free and immobilized *Bacillus pumilus* strain MK001 and its application in saccharification of *Prosopis juliflora*, *Biochemical Engineering Journal*, v. 38, p. 88-97, 2008.
- KASSA, A.; GOULI, S.; GUO, M.; LEE, F.; HATA, T. Whey for mass production of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. **Mycological Research**, v. 112, p. 583-91, 2008.
- KHAN, A.; RAHMAN, M.S.; ZOHORA, U.S.; OKANAMI, M.; ANO, T. Production of surfactin using pentose carbohydrate by *Bacillus subtilis*, **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 23, suppl. 63-65, 2011.

- KIRAN, G. S.; HEMA, T.A.; GANDHIMATHI, R.; SELVIN, J.; THOMAS, T.A.; RAVJI, R.; NATARAJASEENIVASAN, K. Optimization and production of a biosurfactant from the sponge-associated marine fungus *Aspergillus ustus* MSF3, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, p. 250-6, 2009.
- LAMBERT, B.J.; MENDELSON, T.A.; CRAVEN, M.D. Radiation and ethylene oxide terminal sterilization experiences with drug eluting stent products, **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, p. 1116-26, 2011.
- LEE, M.H.; KIM, H.L.; KIM, C.H.; LEE, S.H.; KIM, J.K.; LEE, S.J.; PARK, J.C. Effects of low temperature hydrogen peroxide gas on sterilization and cytocompatibility of porous poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) scaffolds, **Surface and Coatings Technology**, v. 202, p. 5762-67, 2008.
- LEE, S.C.; LEE, S.J.; KIM, S.H.; PARK, I.H.; LEE, Y.S.; CHUNG, S.Y; CHOI, Y.L. Characterization of new biosurfactant produced by *Klebsiella* sp. Y6-1 isolated from waste soybean oil, **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2288-92, 2008.
- LINDSAY, D.; BRÖZEL, V.S.; MOSTERT, J.F.; HOLY, V.A. Physiology of dairy-associated *Bacillus* ssp. over a wide range of pH. **International Journal of Food Microbiology**, v. 54, p.49-62, 2000.
- LIU, E.; ZHENG, H.; HAO, P. KONNO, T.; KUME, H.; YE, I.; ODA, M.; SUZUKI, K.; JI, Z. Acquisition of amino-acids by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 2038 when grown in presence of casein. **International Dairy Journal**, v. 35, p. 145-152, 2014.
- LOPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*, **Federation of European Microbiological Societies**, v. 33, p. 152-63, 2009.
- LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, p. 265-75, 1951.
- MALIK, D.J.; SHAW, C.M.; RIELLY, C.D.; SHAMA, G. The inactivation of *Bacillus subtilis* spores at low concentrations of hydrogen peroxyde vapour. **Journal of Food Engineering**, v. 114, p. 391-96, 2013.
- MASSADEH, N.I.; SABRA, F.M. Production and characterization of lipase from *Bacillus stearothermophilus*, **African Journal of Biotechnology**, v. 10(61), p. 13139-146, 2011.

- MUKHERJEE, A. K.; ADHIKARI, H.; RAI, S.K. Production of alkaline protease by a thermophilic *Bacillus subtilis* under solid state fermentation (SSF) condition using *Imperata cylindrica* grass and potato peel as low-cost medium: Characterization and application of enzyme in detergent formulation, **Biochemical Engineering Journal**, v.39, p. 353-61, 2008.
- NAJAFIA, A.R.; RAHIMPOURA M.R.; JAHANMIRIA, A.H.; ROOSTAAZADB, R.; ARABIANB, D.; SOLEIMANIB, M.; JAMSHIDNEJADA, Z. Interactive optimization of biosurfactant production by *Paenibacillus alvei* ARN63 isolated from an Iranian oil well, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, p. 33-9, 2011.
- NALISHA, I.; MUSKHAZLI, M.; NOR-FARIZAN, T. Production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* against *Sclerotium rolfsii*. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 2, p. 19-23, 2006.
- NAWAWI, W.M.F.W.; JAMAL, P.; ALAM, M. Z. Utilization of sludge palm oil as a novel substrate for biosurfactant production, **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9241-47, 2010.
- NEVES, L.C.M.; OLIVEIRA, K.S.; KOBAYASHI, M.J.; VESSONI-PENNA, T. C.; CONVERTI, A. Biosurfactant production by cultivation of *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372 in semidefined glucose/casein-based media, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136-140, p. 539-54, 2007.
- NICHOLSON, W.L.; MCCOY, L.E.; KERNEY, K.R.; MING, D.W.; GOLDEN, D.C.; SCHUERGER, A.C. Aqueous extracts of a Mars analogue regolith that mimics the Phoenix landing site do not inhibit spore germination or growth of model spacecraft contaminants *Bacillus subtilis* 168 and *Bacillus pumilus* SAFR-032. **Icarus**, v. 220, p. 904-10, 2012.
- NICOLAI, T.; BRITTEN, M.; SCHMITT, C. β -globulin and WPI aggregate: Formation, structure and applications. **Food Hydrocolloids**, v.25, p. 1945-62, 2011.
- NITSCHKE, M. e PASTORE, G.M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-41, 2006.
- OLIVEIRA, E.A.; NOGUEIRA, N.G.P.; INNOCENTINI, M.D.M.; PISANI, R. JR. Microwave inactivation of *Bacillus atrophaeus* spores in healthcare waste, **Waste Management**, v. 30, p. 2327-35, 2010.

- OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; CARICATI, A.T.P.; ABDULACK-LOPES, F.; NEVES, L.C.M.; CARICATI, C.P. *Bacillus atrophaeus* inactivated spores as a potential adjuvant for veterinary vaccines. **Vaccine**, v. 30, p. 3351-54, 2012.
- OOMES, S.J.C.M.; JONKER, M.J.; WITTINK, F.R.A.; HEHENKAMP, J.O.; BREIT, T.M.; BRUL, S. The effect of calcium on the transcriptome of sporulation *B. subtilis* cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, p. 234-42, 2009.
- PACCEZ, J.D. Aplicação de linhagens geneticamente modificadas de *Bacillus subtilis* no desenvolvimento de vacinas de mucosas contra patógenos entéricos. Tese de doutorado Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilization of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1-14, 2007.
- PEREIRA, F.B.J.; GUDIÑA, E.J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J.A.; COUTINHO, J.A.P.; RODRIGUES, L.R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery. **Fuel**, v. 111, p. 256-68, 2013.
- PÉREZ-GARCÍA, A.; ROMERO, D.; VICENTE, A. Plant protection and growth stimulation by microorganisms: biotechnological applications of Bacilli in agriculture. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, p. 187-93, 2011.
- PORNSUNTHORNTAWEE, O.; ARTTAWEEPORN, N.; PAISANJIT, S.; SOMBOONTHANATE, P.; MASAHICO, A.; RUJIRAVANIT, R.; CHAVADEJ, S. Isolation and comparison of biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* PT2 and *Pseudomonas aeruginosa* SP4 for microbial surfactant-enhanced oil recover. **Biochemical Engineering Journal**, v.42, p. 172-79, 2008.
- RAHMAN, S.R.; ANO, T.; SHODA, M. Biofilm fermentation of iturin A by recombinant strain of *Bacillus subtilis* 168. **Journal of Biotechnology**, v. 127, p. 503-7, 2007.
- RAHMAN, S.R. e ANO, T. Production characteristics of lipopeptide antibiotics in biofilm fermentation of *Bacillus subtilis*, **Journal of Environmental Sciences Supplement**, s.36-9, 2009.
- REINEKE, K.; DOEHNER, I.; BAIER, D.; MATHYS, A.; KNORR, D. The different pathways of spore germination and inactivation of *Bacillus subtilis* under high pressure and elevated temperatures, **Procedia Food Science**, v.1, p.792-99, 2011.

- RHOLFES, A.L.P.; BACCAR, N. M.; OLIVEIRA, M.S.R.; MARQUARDT, L.; RICHARDS, N.S.P.S. Indústrias lácteas: alternativas de aproveitamento do soro de leite como forma de gestão ambiental, **Tecno-Lógica**, v.15, n. 2, p.79-83, 2011.
- RIVERA, O.M.P.; MOLDES, A.B.; TORRADO, A.M.; DOMÍNGUEZ, J.M. Lactic acid and biosurfactation production from hydrolyzed distilled grape marc, **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1010-20, 2007.
- ROLDÁN-CARRILO, T.; MARTÍNEZ-GARCÍA, X.; ZAPATA-PEÑASCO, I.; CASTORENA-CORTÉS, G.; REYES-AVILA, M.; OLGUÍN-LORA, P. Evaluation of the effect of nutrient ratios on biosurfactant production by *Serratia marcescens* using a Box-Behnken design, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, p. 384-9, 2011.
- SARAVANAKUMARI, P. e MANI, K. Structural characterization of a novel xylolipid biosurfactant from *Lactococcus lactis* and analysis of antibacterial activity against multi-drug resistant pathogen. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 8851-4, 2010.
- SAWAI, J.; MATSUMOTO, K.; SAITO, T.; ISOMURA, Y.; WADA, R. Heat activation and germination-promotion of *Bacillus subtilis* spores by infrared irradiation, **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 196-200, 2009.
- SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production, **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004.
- SELLA, S.R.B.R.; VANDENBERGHE, L.P.S.; SOCCOL, C.R. Life cycle and spore resistance of spore-forming *Bacillus atrophaeus*. **Microbial Research**, 2014.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2014.05.001>.
- SISO, M.I.G. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. **Bioresource Technology**, v. 57, p.1-11, 1996.
- TOBIAS, J.H.; PITESKY, M.E.; FERGENSON, D.P.; STEELE, P.T.; HORN, J.; FRANK, M.; GARD, E.E. Following the biochemical and morphological changes of *Bacillus atrophaeus* cells during the sporulation process using Bioaerosol Mass Spectrometry. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 56-63, 2006.
- OLIVEIRA-NASCIMENTO, L.; CARICATI, A.T.P.; ABDULACK-LOPES, F.; NEVES, L.C.M.; CARICATI, C.P. *Bacillus atrophaeus* inactivated spores as a potential adjuvant for veterinary vaccines. **Vaccine**, v. 30, p. 3351-54, 2012.
- OOMES, S.J.C.M.; JONKER, M.J.; WITTINK, F.R.A.; HEHENKAMP, J.O.; BREIT, T.M.; BRUL, S. The effect of calcium on the transcriptome of sporulation *B.*

- subtilis* cells. **International Journal of Food Microbiology**, v. 133, p. 234-42, 2009.
- VAZ, D.A.; GUDIÑA, E.J.; ALAMEDA, E.J.; TEIXEIRA, J.A.; RODRIGUES, L.R. Performance of biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p. 167-74, 2012.
- VESSONI-PENNA, T.C. e MACHOSHVILI, I.A. Esterilização térmica. Conceitos básicos da cinética de morte microbiana, **Revista Farmácia Bioquímica Universidade de São Paulo**, suppl. 1, p. 1-5, 1997.
- VESSONI-PENNA, T.C.; MACHOSHVILI, I.A.; TAQUEDA, M.E.S.; ISHII, M. The effect of media composition on the thermal resistance of *Bacillus stearothermophilus*, **PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology**, v. 54, p. 398-412, 2000.
- VESSONI-PENNA, T. C. **Conceitos básicos de esterilização e desinfecção**, ed. 2, São Paulo: Atheneu, 2006, p. 133-65.
- 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: Phycochemical and Engineering Aspects**, v. 392, p. 124-30, 2011.
- ZHU, Z.; ZHANG, G.; LUO, Y.; RAN, W.; SHEN, Q. Production of lipopeptides by *Bacillus amyloliquefaciens* XZ-173 in solid state fermentation using soy bean flour and rice straw as the substrate. **Bioresource Technology**, v. 112, p. 254-60, 2012.
- ZOHORA, U.S.; RAHMAN, M.S., ANO, T. Biofilm formation and lipopeptide antibiotic iturin A production in different peptone media, **Journal of Environmental Sciences Supplement**, s. 24-7, 2009.

7. Anexos

7.1 Soluções utilizadas

Soluções de Acetato de Cálcio 0,02M; soluções de Hidróxido de Cálcio 0,14% (p/v); Tris-HCl 10mM, pH 7,5 foram preparadas para serem utilizadas nos experimentos de obtenção e manutenção de esporos e biossurfactantes.

- Acetato de Cálcio 0,02M

Pesou-se 3,51 gramas de acetato de cálcio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e dissolveu-se em 1 L de água Mili-Q. A solução foi vertida para um frasco e autoclavada a 121°C por 30 minutos. Determinou-se o pH em pHmetro digital (Modelo AR20 Accumet, Fisher Scientific, Swanee, GA, Estados Unidos). A solução foi estocada sob refrigeração a 4°C em geladeira até a sua utilização.

- Hidróxido de Cálcio 0,14% (p/v)

Pesou-se 1,4 gramas de hidróxido de cálcio (Synth, Diadema, SP, Brasil) e dissolveu-se em 1 L de água Mili-Q previamente esterilizada a 121°C por 30 minutos. A solução foi vertida para um frasco de 1 litro e seu pH foi determinado em pHmetro digital. A solução foi estocada sob refrigeração a 4°C em geladeira até a sua utilização.

- Tris-HCl 10 mM pH 7,5

Dissolveu-se Trizma (Molecular Sigma Biology, St. Louis, MO, Estados Unidos) em 1 L de água Mili-Q, e ajustando-se o pH, para 7,5 com solução de HCl 10mM. A solução foi filtrada em membrana de 0,22µm (Milipore, Billerica, MA, Estados Unidos) e armazenada em frasco estéril.