

Produção de Surfactina por *B. subtilis* Empregando Mix de Borra Oleosa como Substrato

Surfactin Production by *B. Subtilis* Using Oil Lee Mix as Substrate

Márcio Costa Pinto da Silva,^{a,*} Edna dos Santos Almeida,^a Erika Durão Vieira,^a Jeancarlo Pereira dos Anjos,^{a,b} Ana Verena Pimentel^c

^a Centro Universitário SENAI CIMATEC, Av. Orlando Gomes 1845, CEP 41650-010, Salvador-BA, Brasil

^b Universidade Federal da Bahia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Energia e Ambiente - INCT E&A, CEP 40170-290, Salvador-BA, Brasil

^c Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Farmácia, CEP 40170-290, Salvador-BA, Brasil

***E-mail:**

marcio.silva@doc.senaicimatec.edu.br

Recebido em: 10 de Agosto de 2022

Aceito em: 10 de Outubro de 2022

Publicado online: xxxxxxxx

Biosurfactants have similar characteristics to surfactants, being synthesized by microorganisms and have a great ability to reduce the surface tension of liquids, having low toxicity and high biodegradability. The objective of this work was to evaluate the production of the biosurfactant surfactin produced from *Bacillus subtilis* having as substrate the residual oily sludge from the manufacture of soybean and cottonseed oils. The use of this oily sludge mixture has not yet been reported in research for this purpose. For this, an experimental design was carried out, using the factorial design of the central compound using different concentrations of glucose and oily sludge as a substrate in the fermentation by *Bacillus subtilis*, keeping other variables, such as: temperature, agitation and pH at constant values. After the surfactin fermentation and purification process, analyzes were performed to determine the surfactin by high-performance liquid chromatography (HPLC), as well as the biomass and substrate conversion factors into surfactin. It is noteworthy that in the substrate containing 3% (m/v) of glucose and 6% (m/v) of oily sludge, there was a higher production of surfactin (126.80 mg.L⁻¹), in the fermented broth, on average. The results obtained can demonstrate that the oily sludge can be a suitable substrate for the production of surfactin by *Bacillus subtilis*.

Keywords: Oily sludge; substrate; surfactin; *Bacillus subtilis*; HPLC; factorial design.

1. Introdução

Os surfactantes são compostos presentes, normalmente, em detergentes. Essas moléculas têm um caráter anfipático, contendo uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica.¹ Os biosurfactantes tem características semelhantes aos surfactantes, sendo de origem biológica, sintetizadas por micro-organismos. Suas moléculas são complexas e, semelhantes aos surfactantes, possuem uma porção hidrofóbica com pequena afinidade ao meio aquoso e um grupo hidrofílico, fortemente atraído pelo meio aquoso.²

Os biosurfactantes possuem alta biodegradabilidade, em relação aos surfactantes de origem petroquímica. Com produção baseada a partir de fontes renováveis, se destacam pela grande capacidade de reduzir a tensão superficial de líquidos com baixo valor de concentração micelar crítica (CMC) e capacidade de formar e estabilizar emulsões de óleos em água.³ A capacidade de reduzir a tensão superficial e interfacial é uma função fundamental para as estruturas químicas que possuem moléculas anfifílicas, e é um requisito indispensável para formação de emulsões cineticamente estabilizadas. As moléculas de biosurfactantes adsorvem nas interfaces ar-líquido, líquido-líquido e sólido-líquido devido a sua natureza hidrofóbica-hidrofílica.⁴

Os biosurfactantes podem ser utilizados para melhorar a separação de fases na recuperação de solo contaminado. Eles são capazes de aumentar a taxa de remoção dos contaminantes por meio do aumento da biodisponibilidade e da redução da tensão superficial e da formação de micelas.⁵

Devido a vantagem de terem baixa toxicidade, quando comparados com os surfactantes de origem química, os biosurfactantes são mais apropriados para serem empregados em indústria de higiene oral, utilizando este produto associado à quitosana fúngica para promover a saúde bucal, conforme trabalho de atividade antifúngica de biosurfactante desenvolvido por Dibya *et al.*⁶ Na indústria alimentícia a viabilidade de utilização do biosurfactante como agente de bio controle, aplicados em brotos de melão.⁷

O tipo de biosurfactante mais comumente observado em diferentes cepas de *B. subtilis*, tanto das cepas produzidas em laboratório quanto das cepas selvagens, são lipopetídeos cíclicos denominados de surfactinas, inturinas e fengicinas.⁸

A surfactina é um biossurfactante produzido por cepas do *Bacillus subtilis* e tem a capacidade de reduzir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN m⁻¹, em baixas concentrações.^{9,10}

A estrutura geral da surfactina é um peptídeo cíclico de sete aminoácidos ligados a uma cadeia de ácido graxo b-hidróxi, sendo que esta cadeia pode variar de 13 a 15 átomos de carbono, permitindo a existência de diferentes compostos homólogos. Sua molécula possui isoformas A, B, C e seus homólogos, conforme a sequência de aminoácidos e o número de átomos de carbono do ácido graxo.¹¹

A surfactina é um dos tipos de biossurfactante mais eficientes devido a sua alta capacidade emulsificante, sendo utilizada em vários tipos de aplicações, tais como: indústrias de cosméticos e farmacêuticas;³ biorremediação; recuperação terciária do petróleo; remoção de resíduos de óleo em tanques de estocagem; formulações de herbicidas e pesticidas.³ Diversos estudos relacionados a aplicabilidade da surfactina foram relatados na literatura científica. Yang *et al.*¹² propuseram a produção de surfactina para ser utilizada como bio emulsificante para separação eficiente por meio de emulsificação de petróleo bruto residual. Bastrzyk *et al.*¹³ pesquisaram a utilização de surfactina como inibidor da formação de carbonato de cálcio em soluções aquosa.

A produção de biossurfactantes ainda é limitada devido ao seu alto custo, agregada a uma baixa produtividade e uso de substratos (meios de cultivo) com altos valores comerciais. O custo de produção de biossurfactante depende da disponibilidade da matéria prima que pode chegar a representar 50% do custo do processo de fermentação.¹⁴

Contudo os metabólitos produzidos a partir de substratos mais baratos, renováveis e através de processos economicamente viáveis têm potencial de diminuir os custos de produção, sendo vantajoso a produção de biossurfactantes por resíduos agroindustriais, possibilitando a diminuição de custos associados. O uso de tais resíduos gera menos carga ambiental, visto que elimina problemas relacionados ao armazenamento, tratamento e disposição final,¹⁵ principalmente quando este resíduo possui cadeias longas de carbono, tornando seu descarte difícil e de oneroso tratamento. Além disso, por possuir longas cadeias de carbono é um excelente metabólito para o crescimento de microrganismos.¹⁶

Os resíduos agroindustriais com alto teor de lipídios e carboidratos atendem aos requisitos como substratos para produção de biossurfactante, adicionados a estes, macro e micronutrientes¹⁵. A literatura apresenta o uso de vários substratos de origem agroindustrial, dentre eles Nitschke¹⁷ pesquisou isolados de *Bacillus* cultivados em diferentes resíduos da indústria de alimentos, tais como o melão, manipueira, soro de leite e meio sintético, apresentaram capacidade de produzir biossurfactantes, sendo a manipueira o substrato com maior potencial de produção. Banat *et al.*¹⁸ citam estudos de produção de biossurfactante utilizando como substrato: cascas de batata e soja; palha de trigo.

Também é relevante os estudos com uso do licor de maceração de milho, água residual do processamento de cereais¹⁹, casca e farelo de arroz²⁰, soro de leite e vinhaça²¹, água residual da produção de café e bagaço de cana de açúcar.²²

Sena *et al.*²³ compararam outras fontes de carbono para produzir biossurfactantes: carboidratos, hidrocarbonetos, óleo de fritura residual e óleos vegetais. Porém estudos com uso de óleo de soja obtiveram os melhores resultados.

Lotfabad²⁴ demonstrou o potencial do uso dos resíduos de óleo de soja como um substrato para produção de biossurfactantes.

A produção de biossurfactantes empregando o resíduo da borra oleosa, oriunda do processo de refino de óleo vegetal, apresenta uma grande oportunidade de redução de custos da produção visto que o valor deste substrato é irrelevante.

Silva *et al.*²⁵ fizeram uma ampla revisão de autores que pesquisou sobre produção de surfactina através de *Bacillus subtilis*. Foram encontrados oito artigos com aderência ao tema proposto: produção de biossurfactantes utilizando como substrato resíduos gerados no processo de refino de óleos vegetais, sendo que estes oito artigos citam resíduos de óleo de soja e ácidos graxos residuais, porém em nenhum deles há combinação de borra de óleo de soja e algodão.

Cabe destacar que o Brasil tem uma alta disponibilidade de borra oleosa. Segundo o boletim estatístico da ABIOVE,²⁶ o Brasil produziu, em de 2020, cerca de 9,6 MM do toneladas de óleo de soja, que representa 80% do total da produção de óleo vegetal do Brasil, seguido o de algodão, com representatividade de 10% do total²⁷. A indústria de refino de óleos vegetais gera, aproximadamente, 8% em massa de borra oleosa, em relação ao óleo bruto produzido. Neste caso, em 2020 foi gerada cerca de 864 mil toneladas desta borra oleosa.²⁶

As triglicérides contidas na borra oleosa é um natural indutor para o *Bacillus* na produção da surfactina.²³ Porém, o *Bacillus subtilis* requer uma fonte de energia de mais fácil absorção para promover sua multiplicação inicial, a exemplo a glicose. Este microrganismo cataboliza a glicose através da via glicolítica, que é a via metabólica que ocorre no citosol, responsável por quebrar as moléculas de glicose, podendo ocorrer aeróbica ou anaerobicamente.⁹ A fonte de carbono contido nos ácidos graxos da borra oleosa é consumida em seguida à glicose.

A borra oleosa e a glicose são variáveis que vão intervir na produção da surfactina. Desta forma, é importante avaliar, experimentalmente, a otimização desta produção, através destas variáveis. Uma das formas de realizar esta otimização é através de planejamento fatorial, a exemplo do planejamento composto central, para realizar a triagem e a otimização multivariada das variáveis que são estatisticamente independentes, mas que podem apresentar alguma interação entre si.²⁸

O planejamento composto central (CCD) pode determinar uma função estabelecida entre a resposta analítica e as variáveis que são estatisticamente independentes.

Porém estas variáveis podem apresentar interação entre si, significativas do processo, possibilitando obter os valores que irão produzir a melhor resposta desejada. Na regressão múltipla, (linear ou não linear), a análise prévia da correlação entre as variáveis permite identificar eventuais variáveis que não irão contribuir para que a análise de regressão apresente bons resultados.²⁸ Uma forma de resumir um modelo de regressão linear é usar a análise de variância, (ANOVA), através da soma dos quadrados para cada fonte de variação no modelo.²⁸

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a melhor performance de produção de surfactina pelo *Bacillus subtilis*, variando as concentrações, em massa, dos substratos borra oleosa e glicose, empregando o Planejamento Composto Central (CCD) na otimização destas concentrações.

2. Metodologia

A metodologia foi dividida nas seguintes etapas: caracterização da borra oleosa; fermentação de 11 amostras (variando proporção em massa da borra oleosa e glicose); extração e purificação da surfactina e análise, via cromatografia líquida de alto desempenho.

2.1. Obtenção e caracterização da borra oleosa

Neste trabalho foi utilizado como substrato uma borra oleosa originada no resíduo do refino de uma mistura, na proporção em massa de 1:1 de óleo de soja e de algodão. O refino, realizado em uma indústria de óleos vegetais, consiste no aquecimento do óleo bruto a partir da temperatura ambiente (27 °C), até 50 °C, em trocador de calor. Após o aquecimento é feita uma mistura com a soda cáustica diluída, em concentração previamente preparada, que varia entre 10 a 20% (m/v), dependendo da acidez do óleo. O óleo bruto aquecido e a soda cáustica são misturados em um misturador de linha e seguem para a torre de contato onde ocorre a reação de neutralização dos ácidos graxos livres. Após esta torre de contato, o óleo neutralizado e os resíduos são aquecidos a 75 °C e seguem para 1ª centrífuga. Nesta centrífuga a borra oleosa sai pela parte superior a uma temperatura de 70 °C, variando de uma cor castanho claro a castanho escuro, dependendo da acidez inicial do óleo bruto, que varia entre 1,0% a 3,0% (m/m). Na temperatura ambiente apresenta a forma pastosa, com odor ativo e cor escura.

A borra oleosa, gentilmente cedida por uma indústria de produção e refino de óleos vegetais, contém triglicerídeos, material saponificável, sais de ácidos graxos, fosfatídeos não hidratáveis, água e sais de sódio.¹⁷ A caracterização da borra foi realizada através das análises físico químicas: óleo neutro (% m), pH, umidade, e teor de resíduos saponificáveis, conforme métodos descritos na American Oil Chemists' Society.²⁹ A análise de ácidos graxos também foi realizada conforme descrito no próximo tópico.

2.2. Análise de ácidos graxos em borra de óleos vegetais

A análise dos ácidos graxos foi adaptada da metodologia descrita em Volkmann.³⁰ Os ésteres de ácidos graxos foram analisados em um cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa, modelo GCMS – QP2010SE GC-2010 Plus, fabricante: Shimadzu, utilizando uma coluna capilar HP–05 MS (NST) CB (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). O fluxo do gás de arraste (Hélio) utilizado foi de 1,2 mLmin⁻¹. A rampa de aquecimento da coluna foi programada para iniciar a 60 °C durante 1 minuto. Em seguida, a temperatura foi elevada para 210 °C a uma taxa de 10 °C por minuto, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto. Por fim, a temperatura foi elevada até 300 °C a uma taxa de 5 °C por minuto, permanecendo nesta temperatura por 1 minuto e 40 segundos. As temperaturas do injetor e detector foram de 260 e 280 °C, respectivamente. Foram injetados 1 µL das amostras esterificadas.

A quantificação foi realizada por normalização das áreas dos picos, e a identificação dos picos por comparação dos tempos de retenção das amostras com o padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos FAME CRM 18.918, da marca Supelco Analytical Products – Sigma Aldrich, EUA.

Foram analisados os ácidos graxos presentes na borra, sendo os destacados com maiores percentuais: ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico e o linolênico.

2.3. Preparo do meio crescimento e fermentação

O meio de crescimento foi distribuído, equitativamente, 80 mL em cada um dos 11 erlenmeyers, previamente esterilizados, contendo quantidades diferentes de borra e glicose, somados à solução basal contendo: fosfato de potássio; sulfato de amônio, sulfato de magnésio heptahidratado e solução estoque contendo: EDTA; sulfato de manganês hidratado; sulfato de ferro heptahidratado; cloreto de cálcio; cloreto de cobalto hexahidratado e sulfato de zinco heptahidratado, conforme Hu.³¹ Em seguida, os erlenmeyers foram levados para a incubadora, para o processo de fermentação. As condições para a fermentação das 11 amostras foram: período de incubação de 24 horas, temperatura de 37,4 °C, pH 6,8 e rotação de 200 rpm. Estas condições foram mantidas inalteradas por serem condições ideais para fermentação do *Bacillus subtilis*, conforme Shaligram e Singhal.³² Vale ressaltar que as condições de pH, temperatura e agitação afetam a produção de biossurfactantes devido seu efeito sobre a fermentação.³³

Foram testadas a combinação das fontes de carbono utilizando diferentes proporções, em massa, de glicose (0,2, 1, 3, 5 e 5,8%) e a borra oleosa na proporção em massa de 1:1 de óleo de soja e de algodão (0,4, 2, 6, 10 e 11,6%), (Tabela 1), utilizando o planejamento composto central. Pela análise de regressão múltipla entende-se a correlação de dependência destas variáveis com a concentração da surfactina.

O planejamento composto central baliza oito pontos de experimento, um ponto central, com duas repetições do

Tabela 1. Relação dos parâmetros codificados CCD de glicose e borra (% massa)

X	(-√2)	(-1)	(0)	(1)	(+√2)	Equação
Glicose(f1)	0,20	1	3	5	5,80	(f1)=2*X+3
Borra (f2)	0,40	2	6	10	11,60	(f2)=4*X+6

Fonte: Autoria própria (2022)

Tabela 2. Matriz do planejamento composto central das variáveis borra e glicose com valor (g)

Ensaio	Glicose (g)	Borra (g)
1	-1 (0,77)	-1 (1,54)
2	1 (3,85)	-1 (1,54)
3	-1 (0,77)	1 (7,70)
4	1 (3,85)	1 (7,70)
5	0 (2,31)	0 (4,62)
6	0 (2,31)	0 (4,62)
7	0 (2,31)	0 (4,62)
8	-√2 (0,15)	0 (4,62)
9	0 (2,31)	-√2 (0,30)
10	+√2 (4,49)	0 (4,62)
11	0 (2,31)	+√2 (8,93)

Fonte: Autoria própria (2022)

ponto central, conforme a Tabela 2. O ponto de controle em branco, ou seja, sem a presença de borra e apenas com % de glicose foi escolhido, independente dos pontos do CCD, para obter o resultado de produção da surfactina na ausência da borra.

Os 11 resultados obtidos de concentração de surfactina, através da fermentação do substrato contendo os 11 diferentes pares de percentuais de borra e glicose, foram analisados via modelo estatístico de regressão, apresentado no tópico de resultados e discussão.

As variáveis independentes, borra oleosa e glicose, foram estudadas em diferentes concentrações no processo fermentativo, para obter a surfactina, variável dependente. Desta forma, foi empregado ferramentas estatísticas para alcançar as melhores condições operacionais, obtendo o máximo de informação do sistema em estudo com um número mínimo de experimentos realizados.²⁸

Foi utilizado a ANOVA, análise de variância, de forma a resumir um modelo de regressão linear múltipla, utilizando o método dos mínimos quadrados. Os resultados foram obtidos pelo uso do software Microsoft Excel. A comparação de variâncias foi realizada empregando um teste “F” para avaliar igualdade entre duas variâncias.²⁸

2.4. Purificação da surfactina

A recuperação do biosurfactante (extração da surfactina) foi realizada em 5 etapas³⁴: a) Recolhimento do sobrenadante (primeira centrifugação); b) Segunda centrifugação; c) Extração líquido-líquido; d) Terceira centrifugação; e) Roto evaporação e Ressuspensão.

Após a 1ª centrifugação, o precipitado que continha *Bacillus sp.* mortos e outros resíduos foi descartado, sendo recolhido o sobrenadante, livre de células.

O sobrenadante foi submetido a uma precipitação ácida sendo o pH ajustado para 2,0 com HCl 3,0 mol L⁻¹. Após o ajuste do pH, as amostras foram deixadas em repouso “overnight” no refrigerador a 4 °C. Posteriormente, foi realizada a 2ª centrifugação refrigerada e a ressuspensão dos precipitados em 5 ml de água destilada, com a correção para pH 7,0 com a solução de NaOH 1,0 mol L⁻¹. Em seguida, a correção do pH, foi feita a extração líquido-líquido, adicionando 5 mL de uma mistura clorofórmio: metanol (2:1, v/v), em cada um dos tubos contendo o precipitado neutralizado. A solução de cada tubo agitada por 1 minuto em agitador de vórtex, em seguida, foi feita a 3ª centrifugação

Após a 3ª centrifugação, a fase orgânica (fase inferior), foi retirada e transferida para tubos de vidro com tampa, e levados ao roto evaporador para ser concentrado a temperatura de 40 °C. Posteriormente, o extrato foi ressuspensionado com 5,0 mL de acrilonitrila: metanol (1:1, v/v).

Para quantificação da surfactina utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), as amostras foram colocadas em “vials”, previamente filtrada com filtro PTFE, 0,2 µ, 13 mm e, posteriormente, submetidas às análises cromatográficas. Todo o processo de fermentação e purificação ocorreu em duplicata.

2.5. Determinação da surfactina utilizando CLAE-DAD

A análise para identificação e quantificação da surfactina nas amostras foi feita por meio da adaptação do método descrito por Wey.³⁵ A concentração da surfactina foi determinada utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu Co. 20A, Japão), com detector de arranjo de diodos SPD-M20A, operando a 190 nm.

A separação cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa Restek Roc C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm). A composição da fase móvel foi de 20% de ácido fórmico (0,2%) e 80% de acetonitrila de forma isocrática. O fluxo da fase móvel foi de 1 mL.min⁻¹ a 28 °C e o volume de injeção das amostras foi de 20 µL. O tempo total das corridas foi de 22 minutos.

A determinação da surfactina nas amostras analisadas foi realizada por meio da comparação entre os tempos de retenção obtidos pela injeção de solução-padrão do analito diluído em 5,0 mL de acrilonitrila:metanol (1:1, v/v) e os tempos de retenção dos picos das isoformas da

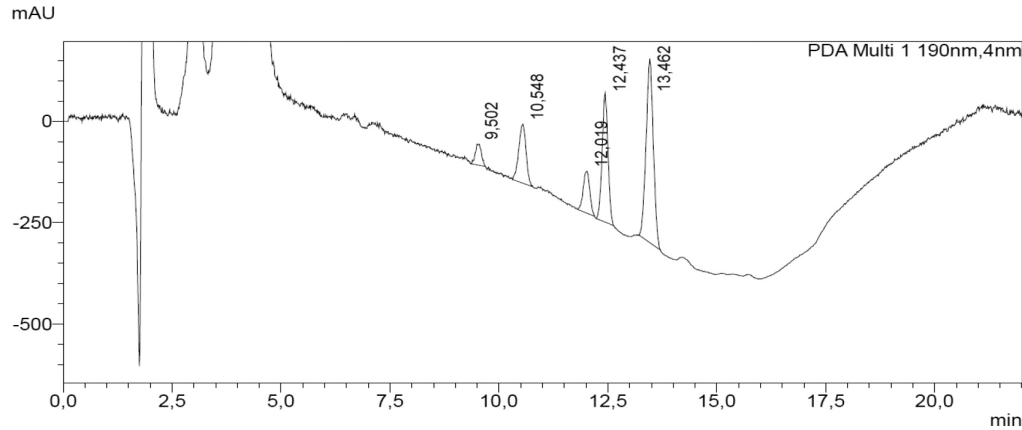


Figura 1. Cromatograma, obtido por CLAE-DAD, da solução padrão de surfactina (125 mg L⁻¹), contendo a identificação dos picos cromatográficos das cinco isoformas do analito. Eixo X o tempo de retenção em min. Eixo Y a altura do pico em mAU

surfactina obtidos nas amostras. Foram obtidos cinco picos cromatográficos com a solução-padrão de surfactina, os quais corresponderam às cinco isoformas desta substância. Os tempos de retenção dos picos das isoformas A, B e C e seus 2 homólogos, referentes à solução-padrão foram, respectivamente: 9,502; 10,548; 12,019; 12,437 e 13,462 minutos (Figura 1).

Para as análises foi adquirido um padrão analítico da surfactina (Sigma-Aldrich), com pureza de 95% e feito sucessivas diluições em metanol.

Para a quantificação da surfactina, uma curva analítica foi construída por meio de diluições sucessivas da solução-padrão de surfactina, sendo consideradas as seguintes concentrações: 75, 100, 125, 150, 175 e 200 mg L⁻¹. A construção da curva analítica foi realizada pela soma das médias das áreas dos picos das cinco isoformas presentes na solução-padrão. O limite de detecção (LD), calculado para esta curva, foi de 11 mg L⁻¹ e o limite de quantificação (LQ) de 36 mg L⁻¹. Como a menor concentração da curva foi de 75 mg L⁻¹, para minimizar os erros de leitura na extrapolação da curva, foi considerado 75 mg L⁻¹ o limite de quantificação (LQ).

2.6. Cálculo do fator de conversão de biomassa e substrato em surfactina

Complementando a análise quantitativa dos resultados, foram calculados os fatores de conversão, que possibilitam medir o rendimento da fermentação, conforme equações abaixo³⁶.

- Fator de conversão de substrato em biomassa:

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

onde $Y_{x/s}$ = fator de conversão de substrato em biomassa (g de biomassa seca obtida por g de substrato consumido), X = concentração de biomassa seca (g L⁻¹) no tempo t de cultivo, X_0 = concentração de biomassa seca (g L⁻¹) no

início do cultivo, S_0 = concentração de substrato (g L⁻¹) no início do cultivo e S = concentração do substrato (g L⁻¹) no tempo t de cultivo.

- Fator de conversão de biomassa em produto:

$$Y_{p/x} = \frac{P - P_0}{X - X_0}$$

onde $Y_{p/x}$ = fator de conversão de biomassa em produto (g de biomassa seca por mg de produto obtido), P = concentração de produto (mg L⁻¹) no tempo t de cultivo, P_0 = concentração de produto (mg L⁻¹) no início do cultivo, X_0 = concentração de biomassa seca (g L⁻¹) no tempo t de cultivo e X_0 = concentração de biomassa seca (g L⁻¹) no início do cultivo.

- Fator de conversão de substrato em produto:

$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

onde $Y_{p/s}$ = fator de conversão de substrato em produto (g de substrato por mg de produto obtido), P = concentração de produto (mg L⁻¹) no tempo t de cultivo, P_0 = concentração de produto (mg L⁻¹) no início do cultivo, S_0 = concentração de substrato (g L⁻¹) no início do cultivo e S = concentração do substrato (g L⁻¹) no tempo t de cultivo.

- A produtividade em produto que representa a velocidade média de formação de produto pelo tempo de cultivo

$$P_p = \frac{P_t - P_0}{t_f}$$

onde P_p = produtividade do produto (mg L⁻¹ h⁻¹), P_t = concentração volumétrica de produto (mg L⁻¹) no tempo t de cultivo, P_0 = concentração volumétrica de produto (mg L⁻¹) no início do cultivo e t_f = tempo de cultivo (h).

O rendimento do produto é expresso pela quantidade de surfactina produzida (mg) pelo volume total do meio de crescimento e solução basal (L).³⁷

O método para quantificar a biomassa seca e determinação da concentração do substrato está descrito em Bezerra.³⁸

3. Resultados e Discussão

3.1. Análise da Borra

A seguir os resultados das análises físico químicas da borra oleosa utilizada no experimento. Todas as análises foram feitas em triplicata.

Foram analisados o % de óleo neutro, pH, teor de resíduos saponificáveis e % de umidade. Os resultados apresentados na Tabela 3:

Tabela 3. Resultados das análises físico químicas da borra oleosa

Parâmetros	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	Desvio Padrão
% de Óleo Neutro	6,44	6,81	8,13	7,13	0,89
pH	9,29	9,36	9,35	9,33	0,10
Teor de Resíduos Saponificáveis (mg L ⁻¹)	33,56	31,5	31,85	32,3	1,10
% Umidade	53,04	52,5	52,19	52,57	3,81

Fonte: Autoria própria (2022)

Tabela 4. Resultados da análise cromatográfica da borra oleosa

Mz	Composto	RT	% m	Desv. Padr.
158	Octanoato de Metilo	5,827	0,00	0,00
186	Decanoato de Metilo	6,523	0,43	0,06
214	Laurato de Metilo	7,759	1,88	0,19
242	Tetradecanoato de Metilo	9,499	0,84	0,02
268	Palmitoleato de Metilo	12,260	0,44	0,17
270	Palmitato de Metilo	12,589	35,21	0,06
294	Linoleato de Metilo	15,864	45,08	0,02
292	Linolenato de Metilo	15,950	1,06	0,01
296	Cis-9-éster de Metilo Oléico	15,980	5,90	0,08
298	Octadecanoato de Metilo	16,447	6,67	0,02
326	Araquidato de Metilo	20,256	0,86	0,32
352	Erucato de Metilo	23,330	0,00	0,00
354	Docosanoato de Metilo	23,783	0,76	0,01
382	Lignocerato de Metilo	27,009	0,30	0,01

Fonte: Autoria própria (2022)

Tabela 5. Comparativo com resultado da análise cromatográfica da borra e dados da literatura

Ácidos graxos	Estrutura	Óleo de algodão: valores de referência (%)	Óleo de soja: valores de referência (%)	Borra oleosa: Resultados da GC (%)
Ácido Palmítico	C16:0	17,0 - 31,0	7,0 - 14,0	35,2
Ácido Palmitoleico	C16:1	0,5 - 2,0	< 0,5	0,4
Ácido Esteárico	C18:0	1,0 - 4,0	1,4 - 5,5	0,0
Ácido Oleico	C18:1	13,0 - 44,0	19,0 - 30,0	5,9
Ácido Linoleico	C18:2	33,0 - 59,0	44,0 - 62,0	45,1
Ácido Linolênico	C18:3	0,1 - 2,1	4,0 - 11,0	1,1

Fonte: Ramalho,³⁹ adaptado.

A Tabela 4 mostra os resultados da cromatografia gasosa para os ésteres dos ácidos graxos correspondentes analisados.

A Tabela 5 mostra um comparativo dos dados de literatura, Ramalho.³⁹ Nas duas primeiras colunas são apresentados os dados obtidos por Ramalho³⁹ e na terceira coluna os resultados apresentados neste estudo. Observa-se nesta terceira coluna os resultados dos ésteres de ácidos graxos estão na faixa dos valores de referência dos graxos dos óleos de algodão e soja observada por Ramalho,³⁹ em destaque para o ácido palmítico (cadeia C₁₆, saturada), em faixa de maior % para o óleo de algodão e o ácido oleico (cadeia C₁₈ simples insaturação) e o ácido linoléico (cadeia C₁₈, dupla insaturação), presente em ambos os óleos.

Tabela 6. Resultados das Amostras analisadas via CLAE

# amostra	Glicose (%)	Borra(%)	Conc. (mg L ⁻¹)	
1	1	2	49,15	Planejamento fatorial
2	5	2	74,21	
3	1	10	128,15	
4	5	10	110,77	
5	3	6	125,08	Ponto Central
6	3	6	126,80*	Repetição
7	3	6	128,52	Ponto Central
8	0,2	6	83,23	Pontos Axiais
9	3	0,4	41,58	
10	5,8	6	82,76	
11	3	11,6	107,48	

Fonte: Aatoria própria (2022)

Os resultados das análises físico-químicas e cromatográfica mostram que a borra é um adequado substrato para fermentação pelo *B. subtilis*, principalmente por apresentar cadeias carbônicas de 16 e 18 átomos, presentes nos ácidos graxos.

3.2. Análise da surfactina via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os resultados de concentração de surfactina das 11 amostras analisadas, em duplicata, via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, estão apresentados na Tabela 6.

A Tabela 6 está dividida em 3 sessões, correspondentes aos pontos do planejamento estrela onde existem os pontos do Planejamento Fatorial, em pontos equidistantes do Ponto Central, repetido duas vezes e os Pontos Axiais, que se situam nos extremos. Destaca-se que no substrato contendo 3% de glicose e 6% de borra oleosa, foi obtida maior produção de surfactina (128,52 mg L⁻¹), no caldo fermentado. Observou-se ainda que as amostras que resultaram menor concentração de surfactina foram dos

substratos que tinham menor concentração de borra oleosa em relação a glicose.

A amostra 7 apresentou o seguinte resultado: 5 picos das isoformas A, B e C e seus 2 homólogos, nos tempos de retenção respectivos (min): 9,6; 10,5; 12,0; 12,5 e 13,5, referentes à surfactina produzida, na concentração de 128,52 mg L⁻¹

As outras amostras com melhores resultados foram, na seguinte ordem decrescente: 3, 6, 5, 4, 11, 8 e 10, com as concentrações, respectivamente: 128,15; 126,80; 125,08; 110,77; 107,48; 83,23 e 82,76 mg L⁻¹, todas apresentando maior percentual de borra que glicose.

A Figura 3 apresenta a concentração de surfactina, (em verde) nas 11 amostras, combinado com o percentual de borra (vermelho) e glicose (azul) de cada amostra.

Na análise da correlação, observa-se o valor muito maior de correlação do % de borra que % de glicose com relação a concentração de surfactina. A interpretação é que a variável dependente, concentração de surfactina, está fortemente correlacionada com a variável borra e fracamente correlacionada com a variável glicose, conforme relação de

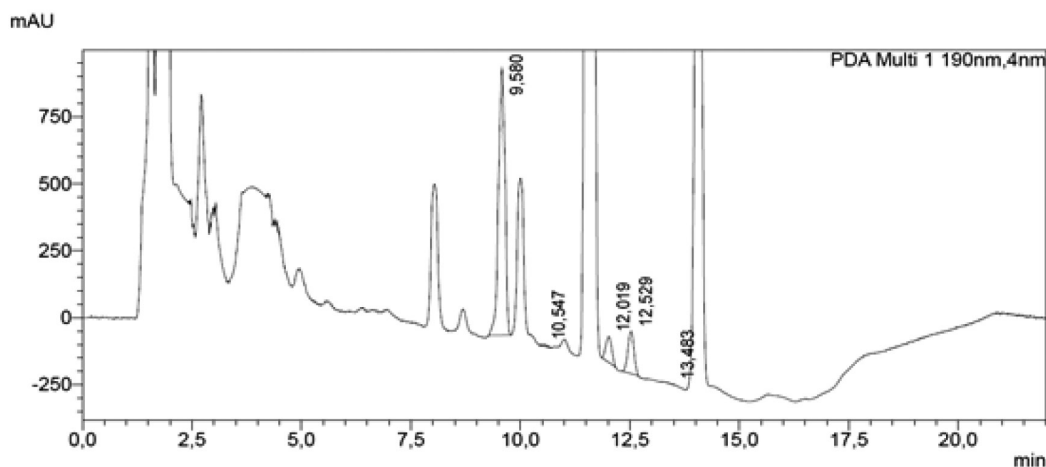


Figura 2. Cromatograma da amostra 7, apresentando os 5 picos das isoformas A, B e C e seus 2 homólogos, referentes à surfactina produzida, na concentração de 128,52 mg L⁻¹. Eixo X o tempo de retenção em min. Eixo Y a altura do pico em mAU

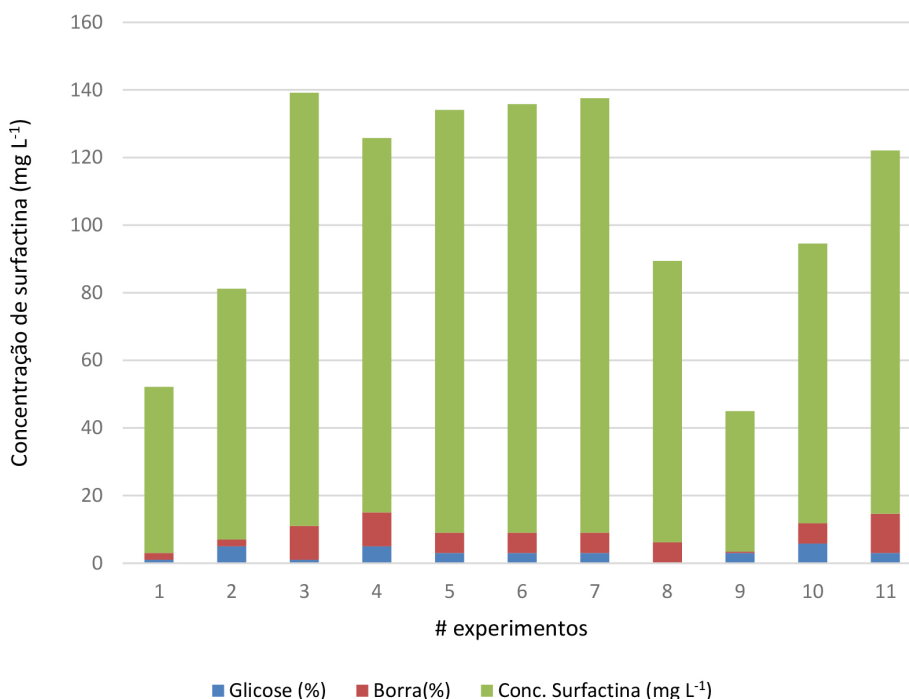


Figura 3. Comparativo da concentração de surfactina das 11 amostras

correlação na Tabela 7. As correlações são positivas, o que significam que as variáveis estão positivamente relacionadas e caminham no mesmo sentido.

Tabela 7. Resultados da análise de correlação

	%G	%B	mg L ⁻¹
%G	1	-	-
%B	0	1	-
mg L ⁻¹	0,0247	0,7310	1

Fonte: Autoria própria (2022)

Na regressão linear múltipla com nível de confiança de 95% (Tabela 8), o coeficiente de determinação para o modelo foi igual a 0,7314, o que representa que as variáveis “% de borra” e “% de glicose” explicam 73,14% das alterações ou modificações ocorridas na concentração de surfactina. Os outros 26,86% podem estar relacionados com as demais variáveis aleatórias como a temperatura, pH, agitação, aeração e erros envolvidos, não consideradas na formulação do modelo. Um modelo mais realístico para explicar as diferentes concentrações obtidas de surfactina poderia incluir estas variáveis. Porém, foram fixadas estas variáveis para analisar no modelo apenas o comportamento das variáveis independentes, borra e glicose, com objetivo de melhor explicar e prever o comportamento da variável dependente (concentração de surfactina).

Na correlação ANOVA, a estimativa da variável independente “borra” foi significativamente elevada (Tabela 9). O teste “F” rejeitou a hipótese de nenhum efeito provocado pela variável independente, e teve a evidência de que o fator correspondente teve influência sobre a variável

Tabela 8. Regressão linear múltipla com nível de confinação de 95%

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,7314
R-Quadrado	0,5349
R-quadrado ajustado	0,4187
Erro padrão	24,3550
Observações	11

Fonte: Autoria própria (2022)

dependente (concentração de surfactina).

A Tabela 9 apresenta o fator o valor-P para glicose que foi 0,9209 e maior que “ α ” (-9,5350). Deste modo, admite-se que não existe regressão de concentração de surfactina com relação a variável “% de glicose”. O valor-P para borra foi de 0,0163 e menor que “ α ” (1,5780). Admite-se que existe regressão de concentração da surfactina com relação a variável % de borra. O Valor P representa a verdadeira probabilidade à direita do t stat = 3,0320, dispensando a consulta à tabela t de Student para definir t stat crítico. Com 95% de confiança, o intervalo da interseção [9,8719;101,0630] contém o verdadeiro parâmetro populacional “ α ” referente a concentração da surfactina. Com 95% de confiança, o intervalo [-9,5350;10,4216] contém o verdadeiro parâmetro populacional % glicose, ou seja, existe a possibilidade de esse parâmetro assumir o valor zero, o que vem ao encontro do resultado do teste de existência de regressão da concentração sobre o % de glicose. Com 95% de confiança, o intervalo [1,5708;11,5491] contém o verdadeiro parâmetro populacional % de borra, ou seja, não existe a possibilidade de esse parâmetro assumir o valor zero, o que vem confirmar o resultado do teste de

Tabela 9. Resultados da ANOVA

	Coefficientes	Erro padrão	Stat t	valor-P	95% inferiores	95% superiores
Interseção	55,4675	19,7725	2,8052	0,0230	9,8719	101,0630
%G	0,4433	4,3271	0,1024	0,9209	-9,5350	10,4216
%B	6,5599	2,1635	3,0320	0,0162	1,5708	11,5491

existência de regressão da concentração de surfactina sobre % de borra.

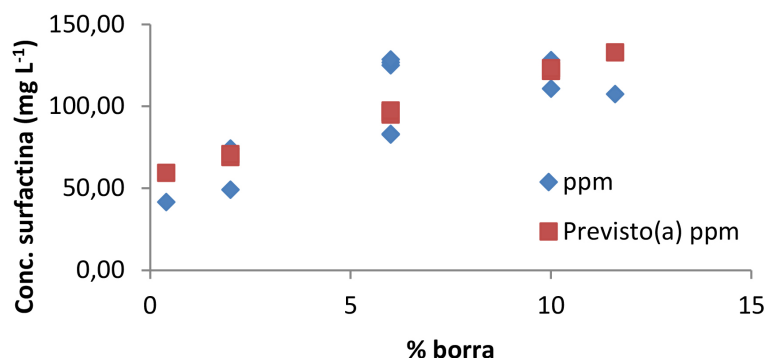
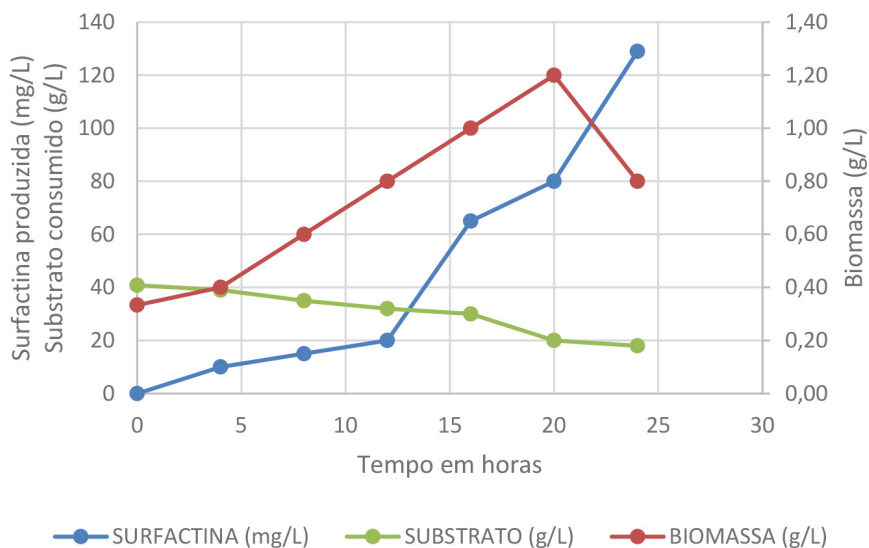
Como o verdadeiro parâmetro populacional, % de borra, comprova a existência de regressão da concentração de surfactina sobre este parâmetro, pode-se plotar o ajuste da linha de concentração de surfactina com o % de borra, conforme Figura 4.

3.3. Fatores de conversão e rendimento da surfactina.

Com os resultados de concentração de surfactina analisados, via CLAE, em que a amostra 6 apresentou o maior resultado de concentração de surfactina, foram simuladas as mesmas condições de fermentação desta amostra, para o cálculo dos fatores de conversão e rendimento.

No processo fermentativo as variáveis temperatura, pH e velocidade de rotação foram mantidas constante e os valores foram assumidos conforme trabalhos dos autores Sen e Swaminathan³³ que identificaram a temperatura ótima de 37,4 °C para produção de surfactina utilizando *B. subtilis*. Estudos experimentais desenvolvidos por Shaligram e Singhal³², mostraram que o pH 6,8 produziu maior quantidade de surfactina. Os melhores rendimentos foram atingidos com velocidade de rotação entre 200 e 250 rpm por 24 h, conforme apresentado em Yeh.⁴⁰ Dessa forma, estas mesmas condições experimentais foram adotadas neste experimento.

Ao final de um processo fermentativo é esperado a queda da concentração de biomassa, devido a queda de massa de substrato, sinalizando o final do processo com à escassez do substrato, conforme a Figura 5.

**Figura 4.** Gráfico do % de borra Versus concentração de surfactina**Figura 5.** Curvas de crescimento da biomassa, consumo de substrato e produção de surfactina simulado para a amostra 7

Fator de conversão de substrato em biomassa:

$$Y_{x/s} = (0,80 - 0,33)/(40,8 - 18,0)$$

$Y_{x/s} = 0,02$ (g biomassa seca obtida por g de substrato consumido)

Fator de conversão de biomassa em produto:

$$Y_{p/x} = (129-0)/(0,80-0,33)$$

$Y_{p/x} = 276,43$ (mg de produto por g de biomassa seca).

Fator de conversão de substrato em produto:

$$Y_{p/s} = (129-0)/(40,8-18,0)$$

$Y_{p/s} = 5,66$ (mg de produto por g de substrato consumido).

Produtividade em produto:

$$P_p = (129 - 0) / 24$$

$P_p = 5,37$ (mg L⁻¹ h⁻¹).

O maior valor de concentração de surfactina obtido na amostra 6 foi de 128,52 mg L⁻¹ no caldo fermentado.

Não foi encontrado na literatura nenhum trabalho de produção de surfactina através de *Bacillus subtilis*, que utilizasse um substrato combinado da borra oleosa de soja e algodão. Deste modo, a comparação de resultados foi feita com trabalhos utilizando outros substratos, como: melaço de cana-de-açúcar, melaço de soja, suco de caju, que tiveram condições semelhantes de fermentação, ou seja: temperatura de 37,4 °C, pH 6,8, com rotação de 200 rpm e razão de aeração variando entre 0,4 a 0,5 do espaço vazio.

Rocha³⁴ obteve o melhor resultado experimental utilizando o melaço de cana-de-açúcar, e no seu experimento foi obtido concentração de surfactina de 199 mg L⁻¹; produtividade de produto, $P_p = 8,18$ mg L⁻¹ h⁻¹ e fator de conversão de substrato em produto de $Y_{p/s} = 0,046$ g g⁻¹ com esses resultados portanto, obteve um melhor resultado experimental. Lima⁴² utilizou melaço de soja, e obteve 91 mg L⁻¹ de concentração de surfactina e produtividade de produto, $P_p = 3,79$ mg L⁻¹ h⁻¹. Hu *et al.*¹² utilizaram meio formulado com glicose, e obtiveram 250 mg L⁻¹ de surfactina. Oliveira *et al.*⁴³, a partir do substrato de suco de caju, observaram a concentração de 215 mg L⁻¹ de surfactina. E Makkar e Cameotra¹⁶ utilizaram como substrato o meio mineral suplementado com melaço e obtiveram surfactina na concentração de 200 mg L⁻¹.

4. Conclusão

Com base nos experimentos realizados em escala laboratorial, verificou-se que há a possibilidade de utilização do resíduo da borra oleosa como substrato alternativo para produção da surfactina, tendo em vista que, mantendo as condições fixas de temperatura, agitação e pH, foi observado que as condições onde as concentrações da borra foram maiores que a glicose, houve maior produção de surfactina.

Destaca-se que no substrato contendo 3% de glicose e 6% de borra oleosa foi obtida em média maior produção de

surfactina (126,80 mg L⁻¹) no caldo fermentado. Na análise de variância, a estimativa da variável independente, borra, foi significativamente elevada, sendo esta preponderante sobre a variável glicose nos resultados da concentração de surfactina (variável dependente). Observou-se que as amostras que resultaram menor concentração de surfactina foram dos substratos que tinham menor concentração de borra oleosa em relação a glicose.

Com relação ao fator de conversão de substrato em produto foi obtido um resultado de 5,66 (mg de produto por g de substrato consumido) e uma produtividade em produto de 5,37 (mg L⁻¹ h⁻¹). Estes resultados demonstram que a borra originada do resíduo do refino da mistura de óleo vegetal de soja e algodão pode ser um substrato adequado para produção de surfactina pelo *Bacillus subtilis*.

Agradecimentos

Agradeço à FAPESB, bolsa 0232/18, pelo apoio financeiro ao projeto.

Referências Bibliográficas

1. Mohamadd, A.; Mawgoud, A.; Lépine, F.; Déziel, E.; Rahmoolipids: diversity of structures microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology* **2010**, *86*, 1323. [[Crossref](#)]
2. Antunes, A. A.; Araújo, H. W. C.; Silva, C. A. A.; Albuquerque, C. D. C.; Campos, T. G. M.; Produção de biosurfactante por *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 utilizando milhocina e óleo de milho pós-fritura como nutrientes UFPE. *Arquivos do Instituto Biológico* **2013**, *3*, 334. [[Crossref](#)]
3. Phulpoto, I. A.; Yu, Z.; Hu, B.; Wang, Y.; Ndayisenga, F.; Li, J.; Liang, H.; Qazi, M. A.; Production and characterization of surfactin-like biosurfactant produced by novel strain *Bacillus nealsonii* S2MT and its potential for oil contaminated soil remediation. *Microbial Cell Factories* **2020**, *19*, 1. [[Crossref](#)]
4. Jahan, R.; Bodratti, A. M.; Tsianou, M.; Alexandridis, P.; Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: Physicochemical properties and applications. *Advances in Colloid and Interface Science* **2020**, *275*, 102061. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
5. Gidudu, B.; Chirwa, E. M. N.; Biosurfactants as demulsification enhancers in bioelectrokinetic remediation of petroleum contaminated soil. *Process Safety and Environmental Protection* **2020**, *143*, 332. [[Crossref](#)]
6. Dibya, J. H.; Gunajit, G.; Trishnamoni, G.; Assma, P.; Pompei, D.; Madhumita, B.; Robin, C. B.; Lipopeptide mediated biocontrol activity of endophytic *Bacillus subtilis* against fungal phytopathogens. *BMC Microbiology* **2019**, *19*, 71. [[Crossref](#)]
7. Fan, H.; Zhang, Z.; Li, Y.; Zhang, X.; Duan, Y.; Wang, Q.; Biocontrol of bacterial fruit blotch by *Bacillus subtilis* 9407 via surfactin-mediated antibacterial activity and colonization. *Journal Frontiers in Microbiology* **2017**, *8*, 1973. [[Crossref](#)]

8. Kaspar, F.; Neubauer, P.; Gimpel M.; Bioactive secondary metabolites from *Bacillus subtilis*: a comprehensive review. *Journal of Natural Products* **2019**, *82*, 2038. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
9. Chen, W. C.; Juang, R. S.; Wei, Y. H.; Applications of a lipopeptide biosurfactant, surfactin, produced by microorganisms. *Biochemical Engineering Journal* **2015**, *103*, 158. [[Crossref](#)]
10. Huang, X.; Liu, J.; Wang, Y.; Liu, J.; Lu, L.; The positive effects of Mn²⁺ on nitrogen use and surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Biotechnology & Biotechnological Equipment* **2015**, *29*, 381. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
11. Liu, Q.; Lin, J.; Wang, W.; Huang, H.; Li, S.; Production of surfactin isoforms by *Bacillus subtilis* BS-37 and its applicability to enhanced oil recovery under laboratory conditions. *Biochemical Engineering Journal* **2015**, *93*, 31. [[Link](#)]
12. Yang, Z.; Zu Y.; Zhu J.; Jin M.; Cui T.; Long X.; Application of biosurfactant surfactin as a pH-switchable biodemulsifier for efficient oil recovery from waste crude oil. *Chemosphere* **2020**, *240*, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
13. Bastrzyk, A.; Fiedot-Toboła, M.; Polowczyk, I.; Legawiec, K.; Plaza, G.; Effect of a lipopeptide biosurfactant on the precipitation of calcium carbonate. *Colloids and Surfaces: Biointerfaces* **2019**, *174*, 145. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
14. Umar, A.; Aneeqa, Z.; Hasina, W.; Meh, P. S.; Muneer, A. Q.; Afshan, H. N.; Zulfqar, A. M.; Safia, A.; Low-cost production and application of lipopeptide for bioremediation and plant growth by *Bacillus subtilis* SNW3. *AMB Express* **2021**, *11*, 165. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
15. Brumano, L. P.; Soler, M. F.; Silva, S. S.; Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America. *Industrial Biotechnology* **2016**, *12*, 31. [[Crossref](#)]
16. Makkar, R. S.; Cameotra, S. S.; An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2002**, *58*, 428. [[Crossref](#)]
17. Nitschke, M. A.; Costa, S. G. V. A. O.; Haddad, R.; Gonçalves, L. A. G.; Eberlin, M. N.; Contiero, J.; Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnology Progress* **2005**, *5*, 62. [[Crossref](#)]
18. Banat, I. M.; Satpute S. K.; Cameotra S. S.; Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' productions. *Frontiers in Microbiology* **2014**, *5*, 697. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
19. Jimoh, A. A.; Lin, J.; Biosurfactant: a new frontier for greener technology and environmental sustainability. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2019**, *184*, 109607. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
20. Camerini, F. V.; Chanin, C. A.; Borba, C. M.; Costa, J. A. V.; Burkert, C. A. V.; Burkert, J. F. M.; Biosurfactant production by *Phialemonium* sp. using agroindustrial wastes: influence of culture conditions. *Acta Scientiarum Biological Sciences* **2019**, *41*, e43484. [[Crossref](#)]
21. Vera, E. C. S.; de Azevedo, P. O. S.; Domínguez, J. M.; Oliveira, R. P. S.; Optimization of biosurfactant and bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) production by *Lactococcus lactis* CECT-4434 from agroindustrial waste. *Biochemical Engineering Journal* **2018**, *1333*, 168. [[Crossref](#)]
22. Marcelino, P. R. F.; Peres, G. F. D.; Terán-Hilares, R.; Pagnocca, F. C.; Rosa, C. A.; Lacerda, T. M.; dos Santos, J. C.; da Silva, S. S.; Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. *Industrial Crops e Products* **2019**, *129*, 212. [[Crossref](#)]
23. Sena, H. H.; Sanches, M. A.; Rocha, D. F. S.; Filho, W. O. P. Souza, E. S.; Souza, J. V. B.; Production of biosurfactants by soil fungi isolated from the Amazon forest. *International Journal of Microbiology Article* **2018**, 5684261. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
24. Lotfabad, T. B.; Evaluation of a recycling bioreactor for biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* MR01 using soybean oil waste. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* **2016**, *91*, 1368. [[Crossref](#)]
25. da Silva, M. C. P.; Almeida, E. S.; Vieira, E. D.; Ferreira, I. R.; Em *Ciência, Tecnologia e Inovação: Desafio para um Mundo Global*, Winkler, I.; Guarieiro, L. L. N.; Barbosa, J. D. V.; Santos, A. A. B.; dos Anjos, J. P.; Amparo, Figueiredo, I. S., eds. Editora Atena: Paraná, 2019, cap. 1. [[Link](#)]
26. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais; Estatísticas Safra 2020 – produção de óleos e grãos. Disponível em: <<https://abiove.org.br/estatisticas/>> Acesso em: 01 abril 2022.
27. Companhia Nacional de Abastecimento; Acompanhamento da safra brasileira. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>>. Acesso em: 01 abril 2022.
28. Martins, G. A., Domingues, A.; *Estatística Geral e Aplicada*, 6a ed. Editora Atlas: São Paulo, 2017.
29. American Oil Chemists Society. [[Link](#)]
30. Volkmann, G. C. M.; Jenske, G.; Kremer, L. C.; Determinação de ácidos graxos em alimentos por cromatografia gasosa, 2017. [[Link](#)]
31. Hu, F.; Liu, Y.; Li, S.; Rational strain improvement for surfactin production: increasing yield and generating new structures. *Microbial Cell Factories* **2019**, *18*, 42. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
32. Shaligram, N. S.; Singhal, R. S.; Surfactin; a review on biosynthesis fermentation, purification and applications. *Food Technology and Biotechnology* **2010**, *48*, 119. [[Link](#)]
33. Sen, R.; Swaminathan, T.; Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for the small-scale recovery of surfactin. *Process Biochemistry* **2005**, *40*, 2953. [[Crossref](#)]
34. Rocha, P. M.; *Tese Doutorado*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2017. [[Link](#)]
35. Wei, Y. H.; Wang, L. F.; Chang, J. S.; Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Biotechnology Progress* **2004**, *20*, 979. [[Crossref](#)]
36. Schimidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. R.; *Biotechnology Industrial*, Edgard Blucher: São Paulo, 2001. [[Link](#)]
37. Ghribi, D.; Ellouze C. S.; Enhancement of *Bacillus subtilis* lipopeptide biosurfactants production through optimization of medium composition and adequate control of aeration. *Biotechnology Research International* **2011**, 653654. [[Crossref](#)]

38. Bezerra, M. S.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012. [[Link](#)]
39. Ramalho, H. F.; Suarez, P. A. Z.; A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. *Revista Virtual de Química* **2013**, 5, 2. [[Crossref](#)]
40. Souza, M. O.; Rainha, K. P.; Castro, E. V. R.; Carneiro M. T. W. D.; Ferreira. R. Q. Análise exploratória das concentrações dos metais Na, Ca, Mg, Sr e Fe em extrato aquoso de petróleo, determinados por ICP OES, após otimização, empregando planejamento de experimentos. *Química Nova* **2015**, 38, 980. [[Crossref](#)]
41. Yeh, M.; Wei, Y.; Chang, J.; Bioreactor design for enhanced carrier assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochemistry* **2006**, 41, 1799. [[Crossref](#)]
42. Lima, J. G. A.; *Dissertação Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, 2012. [[Link](#)]
43. Oliveira, D. W. F.; França. I. W. L.; Félix, A. K. N.; Martins, J. J. L.; Giroa M. E. A.; Melo, V. M. M.; Gonçalves, L. R. B.; Kinetic study of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* LAMI005 grown in clarified cashew apple juice. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2013**, 101, 34. [[Crossref](#)]